T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOGLİSEMİK OLARAK KULLANILAN BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİOKSİDANT VE ANTİDİABETİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevil EMEN TANRIKUT

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık 2014

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOGLİSEMİK OLARAK KULLANILAN BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİOKSİDANT VE ANTİDİABETİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevil EMEN TANRIKUT

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık 2014

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Sevil EMEN TANRIKUT tarafından yapılan "Hipoglisemik Olarak Kullanılan Bazı Bitki Türlerinin Antioksidant ve Antidiabetik Aktivitelerinin Araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN

Üye : Prof. Dr. Halit DEMİR

Üye : Prof. Dr. Murat KIZIL (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 26/12/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan büyük onur duyduğum, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek aldığım değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Murat KIZIL'a çok teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesinde yer alan ve çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım süresince özveriyle bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan motivasyonumu artıran, pozitif enerjisiyle moral kaynağım olan değerli hocam, Doç. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan ve tez savunma jürisinde bulunan hocam Prof. Dr. Halit DEMİR'e katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Tez savunma jürisinde yer alan hocalarım Prof. Dr.Necmettin PİRİNÇÇİOĞLU ve Prof. Dr. Mehmet DOĞRU'ya teşekkür ederim.

Başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Recep ZİYADANOĞULLARI olmak üzere Prof.Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI'na ve Kimya Bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan bitki örneklerinin teşhis edilmesinde yardımcı olan Prof.Dr. Selçuk ERTEKİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmasında kullanılan bitki örneklerinin HPLC analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Abdulselam Ertaş'a teşekkür ederim.

Başta Hayrettin DİNÇ olmak üzere Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Bircan ÇEKEN, Sevcan ALTAŞ, Veysel GÜZEL, Süleyman ÖZAKIN ve Nesrin İNCEÖREN'e teşekkür ederim.

Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarımıza teknik desteklerinden dolayı İhsan ZEYREK ve Askeri YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP-10-FF-99 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan beni her zaman koşulsuz destekleyen ve hep arkamda olan annem Aysel EMEN ve babam Şeyhmus EMEN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında kolaylık ve huzur sağlayan, çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan bana rehberlik yapan sevgili eşim Dr. Mehmet TANRIKUT'a teşekkür ederim.

Varlığıyla hayatımı taçlandıran, neşe kaynağım, biricik oğlum Arjen'e beni böylesine mutlu ettiği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
TEŞEKKÜR		I
İÇİNDEKİLER		II
ÖZET		VI
ABSTRACT		VII
ŞEKİL LİSTESİ		VIII
TABLO LİSTESİ		XIV
RESİM LİSTESİ		XV
KISALTMA ve SİMGELER		XVI
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Diabetes Mellitus	1
1.1.1.	Tip I Diabet (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus, IDDM)	2
1.1.2.	Tip II Diabet (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus, NIDDM)	2
1.2.	İnsülin	2
1.3.	Tip II Diabetin Tedavisi	3
1.4.	Diabetes Mellitus Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	4
1.5.	Hipoglisemik Tıbbi Bitkiler	6
1.6.	Hiperglisemi Kaynaklı Oksidatif Stres	7
1.7.	Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	8
1.8.	Hiperglisemi Kaynaklı Oksidatif Streste Antioksidantların Önemi	9
1.9.	Non-enzimatik Glikolizasyon ve AGE Oluşumu	12
1.10.	Maillard Reaksiyonu	14
1.11.	AGE'lerin Genel Özellikleri	22
1.12.	AGE Oluşumunun İnhibisyonu	22
1.13.	Sentetik AGE İnhibitörleri	24
1.14.	Doğal Ürünlerden AGE İnhibitörleri	26
1.15.	Doğal Ürünlerin Aktivitesindan Sorumlu Olan Sekonder Metabolitler	31
1.15.1.	Fenoller ve fenolik asitler	32
1.15.2.	Quinonlar	32
1.15.3.	Flavonler, flavanoidler ve flavonoller	33
1.15.4.	Tanninler	33
1.15.5.	Kumarinler	34
1.15.6.	Terpenoidler	34
1.15.7.	Alkoloidler	35

1.16.	Çalışmanın Amacı, Önemi ve Hedefleri	36
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**	39
3.	**MATERYAL ve METOT**	43
3.1.	Materyal	43
3.1.1.	Kullanılan Bitki Türleri	43
3.1.2.	Kullanılan kimyasal Maddeler	43
3.1.3.	Kullanılan Aletler	44
3.2.	**METOT**	45
3.2.1.	Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	45
3.2.2.	Toplam Fenolik Bileşen Miktar Tayini	45
3.2.3.	Toplam flavanoid Bileşen Miktar Tayini	46
3.2.4.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	47
3.2.5.	İndirgeme Gücü	48
3.2.6.	ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi	48
3.2.7.	Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi	49
3.2.8.	Lipid Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi	50
3.2.8.1.	Karaciğer Homojenatının Hazırlanması	50
3.2.9.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	51
3.2.9.1.	Plazmid DNA saflaştırma	52
3.2.10.	SDS-PAGE Protein Jel Elektroforezi	52
3.2.10.1.	Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması	52
3.2.11.	*İn vitro* olarak BSA'nın Glikasyonu	53
3.2.11.1.	BSA'nın Glukoz ile Glikasyonu	53
3.2.11.2.	BSA'nın Glioksal (GO) ile Glikasyonu	53
3.2.11.3.	Total AGE Floresans Ölçümü	53
3.2.11.4.	Fruktozamin Testi	54
3.2.11.5.	α-Dikarbonil Bileşiklerinin Tayini	54
3.2.11.6.	Protein Glikasyonunun SDS-PAGE Karakterizasyonu	54
3.2.11.6.1.	Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması	55
3.2.12.	α-Amilaz İnhibisyon Test	55
3.2.13.	α-Glukozidaz İnhibisyon Test	55
3.2.14.	İstatiksel Analiz	56
3.3.	HPLC Cihazı ve Analitik Şartlar	56
4.	**ARAŞTIRMA BULGULARI**	59
4.1.	Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	59

4.2.	Toplam Fenolik ve Flavanoid Bileşen Miktar Tayini	60
4.3.	DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi	62
4.4.	İndirgeme Gücü	63
4.5.	ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi	64
4.6.	Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi	66
4.7.	Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi	67
4.8.	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	68
4.9.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	73
4.10.	*In vitro* Olarak BSA'nın Glikolizasyonu	83
4.10.1.	Total AGE Floresans Ölçümü	83
4.10.2.	Fruktozamin Testi	85
4.10.3.	α-Dikarbonil Tayini	87
4.10.4.	Glikolizlenmiş Proteinin SDS-PAGE karakterizasyonu	90
4.11.	α-Amilaz inhibisyon Test	95
4.12.	α-Glukozidaz inhibisyon Test	96
4.13.	HPLC Analizi Sonuçları	97
5.	**TARTIŞMA VE SONUÇ**	101
5.1.	Antioksidant Aktivite	102
5.1.1.	Total Fenolik ve Flavanoid Bileşen Miktarları	102
5.1.2.	DPPH Radikalini Söndürme Etkisi	104
5.1.3.	ABTS Radikalini Söndürme Etkisi	105
5.1.4.	İndirgeme Gücü	106
5.1.5.	Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi	106
5.1.6.	Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi	107
5.1.7.	DNA Kesimi Önleme Etkisi	108
5.1.8.	Protein Oksidasyonunu Önleme Etkisi	109
5.2.	Antiglikasyon Aktivite	110
5.2.1.	Total AGE Floresan Yoğunluğu	111
5.2.2.	NBT İndirgenmesi	112
5.2.3.	α-Dikarbonil Oluşumunun İnhibisyonu	113
5.2.4.	Glikolizlenmiş Proteinin SDS-PAGE Karakterizasyonu	114
5.3.	Anti-diabetik Aktivite	114
5.3.1.	α-Amilaz ve α-Glukozidaz Enzim Aktivitesi	114
5.4.	HPLC Sonuçları	118
5.5.	Polifenollerin Anti-Diabetik Mekanizması	119

6. **KAYNAKLAR** 123

ÖZGEÇMİŞ 137

ÖZET

HİPOGLİSEMİK OLARAK KULLANILAN BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİOKSİDANT VE ANTİDİABETİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
Sevil EMEN TANRIKUT

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2014

Diabetes mellitus (DM) hatalı glukoz homestazisinden kaynaklanan çok önemli bir kronik hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) yaptığı bir açıklamaya göre Dünya çapında 171 milyon diyabetli insan vardır. Bu sayı 2030 yılında iki katından fazla olacaktır. Her yıl yaklaşık 3.2 milyon insan diyabet ve onun komplikasyonlarından hayatını kaybetmektedir ve bu her bir dakikada 6 ölüm demektir.

Bu tez çalışmasında halk arasında hipoglisemik olarak kullanılan *Juglans regia* (ceviz yaprağı), *Teucrium polium* (acıyavşan, meryemhort), *Piperis longum* (darıfülfül), *Rheum ribes* (uçkun ,ışgın), *Apium graveolens* (kereviz tohumu), *Artemissia absinthium* (acı pelin otu), *Cuscuta babylonica* (mardin küşütü), *Artemissia millefolium* (civanperçemi) bitkilerinin etenol:su ekstraktlarının antioksidant ve antidiyabetik etkileri incelendi. Her bitki ekstraktının toplam fenolik, flavonid ve antioksidant aktiviteleri incelendiğinde fenolik ve flavonoid miktarları ile toplam antioksidant aktivitenin *J. regia, T. polium, R. ribes, C. babylonica, A. graveolens, A. millefolium, P. longum, A. absinthium* sıralamasıyla arttığı bulundu.

Diyabette okdidatif stresin artmasıyla serbest radikallerin miktarında artış meydana gelmektedir. Bundan dolayı bu çalışmada öncelikli bitkilerin serbest radikalleri söndürme etkileri araştırıldı. Bu amaçla bitki ekstraktlarının hidroksi radikali gibi reaktif oksijen türlerini, DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil), ve ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzoditiazolin-6-sülfonik asit) gibi sentetik radikalleri söndürme etkileriyle beraber lipid peroksidasyonu, DNA ve protein oksidasyonu üzerine etkileri de incelendi. Ayrıca *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin antidiabetik etkileri araştırıldı. Bu amaçla yapılan çalışmada bitki ektraktlarının BSA-glukoz model sisteminde glikasyon ürünleri olan AGE'ler üzerine inhibe edici özellikleri ve karbohidrat sindiriminde görev alan α-amilaz ve α-glukozidaza karşı inhibisyon etkileri araştırıldı. Sonuç olarak *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin etanol:su ektraktlarının hem reaktif oksijen türlerini, lipid peroksidasyonunu, DNA ve protein oksidasyonunu inhibe ederek gösterdikleri antioksidant etki hem de AGE ürünlerini ve α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri ile diyabet tedavisinde etkili olabilecekleri saptandı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidant, Antidiabetik, Diabetes Melitus, AGE, *Juglans regia*, *Teuricum polium*

ABSTRACT

SCREENING OF ANTIOXIDANTS AND ANTI-DIABETIC ACTIVITIES OF SOME HYPOGLISEMIC PLANTS

Ph.D. THESIS

Sevil EMEN TANRIKUT

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2014

Diabetes mellitus (DM) is a very important disease initially characterized by disturbance in glucose homeostasis balance. There are 171 million people in worldwide with diabetes. This number will be more than double in 2030. Each year approximately 3.2 million people die due to diabetes and its complications. It means that six deaths every minutes.

In this thesis, the antioxidant and antidiabetic effects of ethanol:water extracts of plants, which are used traditionally to treat diabetes, *Juglans regia*, *Teucrium polium*, *Piperis longum*, *Rheum ribes*, *Apium graveolens*, *Artemissia absinthium*, *Cuscuta babylonica* and *Artemissia millefolium* were investigated. These plants are used by local herbalists to ameliorate diabetes complications. When total phenolics, flavonoids and antioxidant activities of each plant extract are examined, it was found that the quantities total phenolics, flavonoids and antioxidant activities increase by the order of *J. regia*, *T. polium, R. ribes*, *C. babylonica*, *A. graveolens*, *A. millefolium*, *P. longum* and *A. absinthium.*

Diabetes induce oxidative stres, which increases free radical production. Therefore, because of free radicals levels are high in diabetes mellitus, in the present study, our first aim was to investigate the radical scavenging activities of plant extracts. For this purpose, the radical scavenging activities of plant extracts on reactive oxygen species such as hydroxyl radical, and synthetic types such as DPPH and ABTS radicals were examined. The protective ability of plant extract against lipid peroxidation, DNA and protein oxidation were also investigated. We also investigated of antidiabetic effects of *J. regia* and *T. polium* extracts. For this purpose, an *in vitro* BSA-glucose model system was used to evaluate glycation reaction. The inhibition activities of *J. regia* and *T. polium* extracts on advanced glycation end products formation were examined. α-Amylase and α-glucosidase are key enzymes involved in the digestion of carbohydrates. Therefore, α-amylase and α-glucosidase enzyme inhibitory effects of *J. regia* and *T. polium* extracts were also studied. Consequently, it was found that the ethanol:water extracts of *J.regia* and *T.polium* have inhibated reactive oxygen species, lipid peroxidation, DNA and protein oxidation and also both AGE products and α-amylase and α-glucosidase enzymes respectively. Therefore, they can be effective in the treatment of diabetes.

Keywords: Antioxidant, Antidiabetic, Diabetes Mellitus, AGE, *Juglans regia*, *Teuricum polium*

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa No
Şekil 1.1.	Bir glikoproteine bağlı oligosakkaritlerin α-D-glikozidaz I ve II tarafından hidrolizi	4
Şekil 1.2.	Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizmaları	6
Şekil 1.3.	Diabetes Mellitus tedavisinde kullanılan bitkilerin etki mekanizmaları	7
Şekil 1.4.	Hiperglisemi kaynaklı oksidatif stresin oluşumunu katalizleyen yolaklar	8
Şekil 1.5.	Reaktif oksijen türlerinin antioksidantlarla etkisiz hale getirilmesi	11
Şekil 1.6.	AGE oluşumunun kimyasal yolakları	15
Şekil 1.7.	Schiff bazı oluşumu	15
Şekil 1.8.	Amadori yeniden düzenlenmesi	16
Şekil 1.9.	Reaktif dikarbonil ara ürünlerinin oluşumu	16
Şekil.1.10.	MGO türevli AGE oluşumu	17
Şekil 1.11.	AGE'lerin kimyasal yapısı	18
Şekil 1.12.	Glikasyon sürecinde oluşan reaktif karboniller	19
Şekil 1.13.	*In vivo* AGE oluşumunun farklı yolakları	20
Şekil 1.14.	Lizin ve arjinin aminoasitlerinden türeyen AGE molekülleri	21
Şekil 1.15.	AGE inhibitörlerinin antiglikasyon mekanizmaları	23
Şekil 1.16.	Glikasyonun erken basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri	24
Şekil 1.17.	Glikasyonun ileri basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri	26
Şekil 1.18.	AGE oluşumunun önlenmesinde Antioksidantların etki mekenizması	28
Şekil 1.19.	Karbonil söndürücü özelliği olan bazı çay polifenollerinin kimyasal yapıları	30
Şekil 1.20.	Genel flavonoidlerin kimyasal yapıları	31
Şekil 1.21.	Tipik fenoliklerin kimyasal yapıları	32
Şekil 1.22.	Quinonların kimyasal yapıları	33
Şekil 1.23.	Bilinen bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları	33
Şekil 1.24.	Bazı Tanninlere örnekler	34

Şekil 1.25.	Bazı genel kumarinler	34
Şekil 1.26.	Bitkilerde bulunan bazı genel terpenoidler	35
Şekil 1.27.	Farmakolojik olarak aktif olan bazı alkoloidlerin kimyasal yapıları	36
Şekil 3.1.	Gallik asitin yapısı	45
Şekil 3.2.	Quercetinin yapısı	46
Şekil 3.3.	DPPH radikalinin indirgenmesi	47
Şekil 3.4.	ABTS'nin yapısı	49
Şekil 3.5.	Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu	49
Şekil 4.2.1.	Bitki ekstraktlarının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları.	61
Şekil 4.2.2.	Bitki ekstraktlarının içindeki quercetine eşdeğer toplam flavanoid bileşen	61
Şekil 4.3.	Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının DPPH radikali üzerindeki söndürücü etkisi.	62
Şekil 4.4.1.	*J. regia, T. polium, A. absinthium ve A. millefolium* bitkilerinin etanol:su ekstraktının farklı konsantrasyonlarının $Fe^{3+'}$ü $Fe^{2+'}$ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi	63
Şekil 4.4.1.	*R. ribes, P. longum, A. graveolens* ve *C. babylonica* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının $Fe^{3+'}$ü $Fe^{2+'}$ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi	64
Şekil 4.5.1.	*J. regia* ve *T. polium,* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi.	65
Şekil 4.5.2.	*A. millefolium, R. ribes, P. longum., A. graveolens, A. absinthium* ve *C. babylonica* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi	65
Şekil 4.6.	Bitki ektraktlarının farklı konsantrasyonlarının Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi	66
Şekil 4.7.	Bitki ektraktlarının farklı konsantrasyonlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktiviteleri.	67
Şekil 4.8.1.	BHT ve BHA'nın supercoiled DNA'yı OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	68

Şekil 4.8.2.	*J. regia* ve *T. polium*'un supercoiled DNA'yı OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	69
Şekil 4.8.3.	*R. ribes* ve *A. graveolens*'in supercoiled DNA'yı OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	70
Şekil 4.8.4.	*P. longum* ve *C. babylonica*'nın supercoiled DNA'yı OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	71
Şekil 4.8.5.	*A. millefolium* ve *A. absinthium*'un supercoiled DNA'yı OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi	72
Şekil 4.9.1.	BSA oksidatif hasarının BHT ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	73
Şekil 4.9.2.	BSA oksidatif hasarının BHA ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	74
Şekil 4.9.3.	BSA oksidatif hasarının *J. regia* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	75
Şekil 4.9.4.	BSA oksidatif hasarının *T. polium* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	76
Şekil 4.9.5.	BSA oksidatif hasarının *A. graveolens* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	77
Şekil 4.9.6.	BSA oksidatif hasarının *P. longum* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	78
Şekil 4.9.7.	BSA oksidatif hasarının *C. babylonica* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	79
Şekil 4.9.8.	BSA oksidatif hasarının *A. millefolium* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	80
Şekil 4.9.9.	BSA oksidatif hasarının *R. ribes* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili.	81

Şekil 4.9.9.	BSA oksidatif hasarının *R. ribes* bitkisinin etanol:su ektraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili	82
Şekil 4.10.1.1.	BSA-glc ve BSA-glc-AG sistemlerinin total floresans yoğunluğu	83
Şekil 4.10.1.2.	BSA-GO ve BSA-GO-AG sistemlerinin total floresans yoğunluğu	83
Şekil 4.10.1.3.	BSA-glc, BSA-glc-*T. polium* ve BSA-glc-*J. regia* sistemlerinin total floresans yoğunluğu	84
Şekil 4.10.1.4.	*J. regia*, *T. polium* ve AG'nin, BSA-Glc/GO glikasyon sistemlerinde AGE inhibisyon aktiviteleri	85
Şekil 4.10.2.1.	BSA'nın Aminoguanidin (AG) ve Quercetine (QUE) varlığında, glikoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi.	85
Şekil 4.10.2.2.	BSA'nın, Aminoguanidin (AG) varlığında, glioksal (GO) ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi	86
Şekil 4.10.2.3.	*J. regia* bitkisinin, BSA'nın glikoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi	86
Şekil 4.10.2.4.	*T. polium* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi.	87
Şekil 4.10.3.1.	BSA'nın Aminoguanidin (AG) ve Quercetine (QUE) varlığında, glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünlerinin oluşumu üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi.	87
Şekil 4.10.3.2.	BSA'nın, Aminoguanidin (AG) varlığında, glioksal (GO) ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünlerinin spektroskopik olarak tayini.	88
Şekil 4.10.3.3.	*J. regia* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi.	88

Şekil 4.10.3.4.	*T. polium* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi	89
Şekil 4.10.4.1.	Glikolizlenmiş proteinin AG varlığında SDS-PAGE profili	90
Şekil 4.10.4.2.	Glikolizlenmiş proteinin *J. regia* varlığında SDS-PAGE profili.	91
Şekil 4.10.4.3.	Glikolizlenmiş proteinin *T. polium* varlığında SDS-PAGE profili.	92
Şekil 4.10.4.4.	BSA'nın AG (aminoguanidin) varlığında ve yokluğunda GO (glioksal) ile glikolizlenmesinin SDS-PAGE profili.	93
Şekil 4.10.4.4.	Glikolizlenmiş proteinin QUE varlığında ve yokluğunda SDS-PAGE profili.	94
Şekil 4.11.	*J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin α-amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri.	95
Şekil 4.12.	*J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin α-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri.	96
Şekil 4.13.1.	Standart kromatogram	97
Şekil 4.13.2.	*J. regia'nın* HPLC kromatogramı	97
Şekil 4.13.3.	*T. polium'un* HPLC kromatogramı	98
Şekil 5.1.1.	Polifenollerin antioksidant mekanizmaları	104
Şekil 5.1.2.	MDA'nın proteinlerle etkileşmesi	107
Şekil 5.2.1.	AGE oluşumu	110
Şekil 5.2.2.	Metilglioksal'ın Pirogallol ile Reaksiyonu	113
Şekil 5.3.1.	Flavanoidlerin α-amilaza bağlanma etkisi gösteren potensiyel grupları. Yukarı doğru olan oklar artan inhibisyonu; aşağı doğru olan oklar azalan inhibisyonu göstermektedir	116

Şekil 5.3.2.	Flavanoidlerin α-glukozidaza bağlanma etkisi gösteren potansiyel grupları. Yukarı doğru olan oklar artan inhibisyonu; aşağı doğru olan oklar azalan inhibisyonu göstermektedir.	117
Şekil 5.3.3.	Metforminin α-dikarbonil bileşikleri ile olası reaksiyon basamakları	118
Şekil 5.4.1.	Polienollerin farklı anti-diyabetik mekanizmaları	120

TABLO LİSTESİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 3.1.	HPLC cihazının analitik şartları	57
Tablo 4.1.	Bitkilerin ektraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt miktarları	59
Tablo 4.2.	Bitki ekstraktlarının içindeki toplam fenolik ve flavanoid bileşen miktarları	60
Tablo 4.3.	BHT ve BHA'nın DNA kesim önleme etkileri	68
Tablo 4.4.	*J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri	69
Tablo 4.5.	*R. ribes* ve *A. graveolens* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri	70
Tablo 4.6.	*P. longum* ve *C. babylonica* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri	71
Tablo 4.7.	*A. millefolium* ve *A. absinthium*'un bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri	72
Tablo 4.8.	*J. regia* ve *T. polium*'un yapısında bulunan fenolik bileşenlerin konsantrasyonu	98

RESİM LİSTESİ

Resim No		Sayfa No
Resim 3.1.	Tez çalışmasında kullanılan bitkiler	44

KISALTMALAR

ABTS	:2,2'-azinobis-(3-etilbenzoditiazolin-6-sülfonik asit)
AGEs	:Advanced glycation endproducts
Acb	:Akarboz
AG	:Aminoguanidine
BSA	:Bovine serum albumin
BHA	:Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	:Bütillenmiş hidroksitoluen
CEL	:N^{ε}-(karboksietil) lizin
CML	:N^{ε}-(karboksimetil) lizin
3-DG	:3-deoxyglucosone
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DM	:Diabetes Mellitus
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
Med	:Medformin
MDA	:Malondialdehit
Ori	:Orjinal
GO	:Glyoxal
MG	:Methylglyoxal
RAGE	:Receptor for AGEs
RCS	:Reactive carbonyl species
ROS	:Reactive oxygen species
SDS-PAGE	:Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel
TBA	:2-Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

RA	:Rosmarinik asit
Glc	:Glukoz
SOD	:Süperoksit dismutaz
CAT	:Katalaz
GSH	:Glutatyon
g	:Gram
mg	:Miligram
μg	:Mikrogram
l	:Litre
ml	:Mililitre
M	:Molarite

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) insülin sekresyonu yokluğuna veya dokuların insüline duyarlığında azalmaya bağlı karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulması ile karakterize bir sendromdur. İki tip DM bilinmektedir;

1) Tip I diyabet, insülin salınımı yokluğuna bağlıdır. İnsüline bağımlı diyabet adını alır (IDDM).

2) Tip II diabet, hedef dokuların insülinin metabolik etkilerine duyarlılıklarının azalmasına bağlı olarak gelişir ve insüline bağımlı olmayan diyabet adını alır. (NIDDM). Bu azalmış duyarlılığa insülin resistansı da denir (ADA 2011).

Diabetes mellitus tedavi edildiğinde komplikasyonların azaldığı, tedavi edilmediğinde komplikasyonların arttığı bir hastalıktır. Diyabetin komplikasyonlarından bazıları şu şekilde sıralanabilir (Guyton ve Hall 2001).

- Kalp hastalığı riski 2-4 kat fazladır.
- Kalp krizi için 2.5 kat fazla risk söz konusudur.
- Körlük nedenleri arasında 1.sırada yer alır.
- %60-65 oranında yüksek kan basıncına, % 60-70 oranında vasküler ve sinir sistemi hasarına yol açar.
- Amputasyonların en önemli nedenidir.
- Yaşam süresi 10-15 yıl daha kısadır ve erken ölüm riski 3-4 kat fazladır.
- Diabetes mellitus hastalığı aynı zamanda koroner kalp hastalığı olarak da kabul edilmektedir.

1.1.1. Tip I Diabet (İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus, IDDM)

Diyabetin bu formu β-hücre kitlesinde bir azalma ile insülinin ciddi ve mutlak kaybından kaynaklanır. Tip I diyabet genellikle çocuklukta gelişir ve ergenlikte ortaya çıkar ciddileşir. Hastalar hayatta kalmak için insüline gereksinim duyarlar bundan dolayı insüline bağımlı Diabetes Mellitus terimi kullanılır. İnsülin olmaksızın akut

ketoasidoz ve koma gibi ciddi metabolik komplikasyonlar gelişir (Robbins ve ark. 1995).

1.1.2. Tip II Diabet (İnsüline Bağımlı Olmayan Diabetes Mellitus, NIDDM)

Diyabetiklerin çoğu bu gruptandır. Virüsler veya otoimmün antibiyotiklerden çok genetik faktörler sebebiyle gelişir. NIDDM'de pankreasın β-hücrelerinin bir kısmı fonksiyonlarını kaybederler ve glikoz homeostazını korumak için yeterli olmayan düzeylerde insülin salgılarlar. Genellikle hedef dokuda insülin direnci vardır ve bu hem endojen hem de eksojen insüline yanıtı azaltır. Bazı hastalarda insülin rezistansının sebebi insülin reseptörlerinde mutasyon veya sayılarında azalmadır. Tip II diyabetin en yaygın akut komplikasyonu hiperglisemiden kaynaklı metabolik bozukluklar ve infeksiyondur. NIDDM, retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz gibi komplikasyonlara neden olan bir geçiş hastalığıdır (Mycek ve ark. 1998)

1.2. İnsülin

Normal şartlar altında pankreatik β-hücreleri yeterli düzeyde insülin salgılayarak kan glikoz seviyesini normal aralıklarda tutarlar (72-126 mg/dl) (Yu ve ark. 2005). Diyabetik hastalarda pankreatik β-hücrelerinin apoptozisi veya insülin intoleransı sonucu insülin üretimi olmaz (Hui ve ark. 2004).

Pankreas β-hücrelerinden salınan insülin, iki peptit zincirinden oluşan ve suda çözünen bir hormondur. β-hücrelerinden önce proinsülin olarak üretilir. Bu proinsülin golgi aygıtında c peptitini kaybeder ve insülin oluşur. İnsülin veziküllerde çinko iyonu ile birlikte depolanır. Salınımında en önemli mekanizma ATP'ye bağımlı potasyum kanallarıdır. Bu kanallar salınımı kontrol eder ve bu salınım bifazik bir olaydır. Hedef hücrelerdeki insülin reseptörleri Tirozin kinaz etkinliğine sahiptir, insülinin plazma ömrü 10 dakikadır.

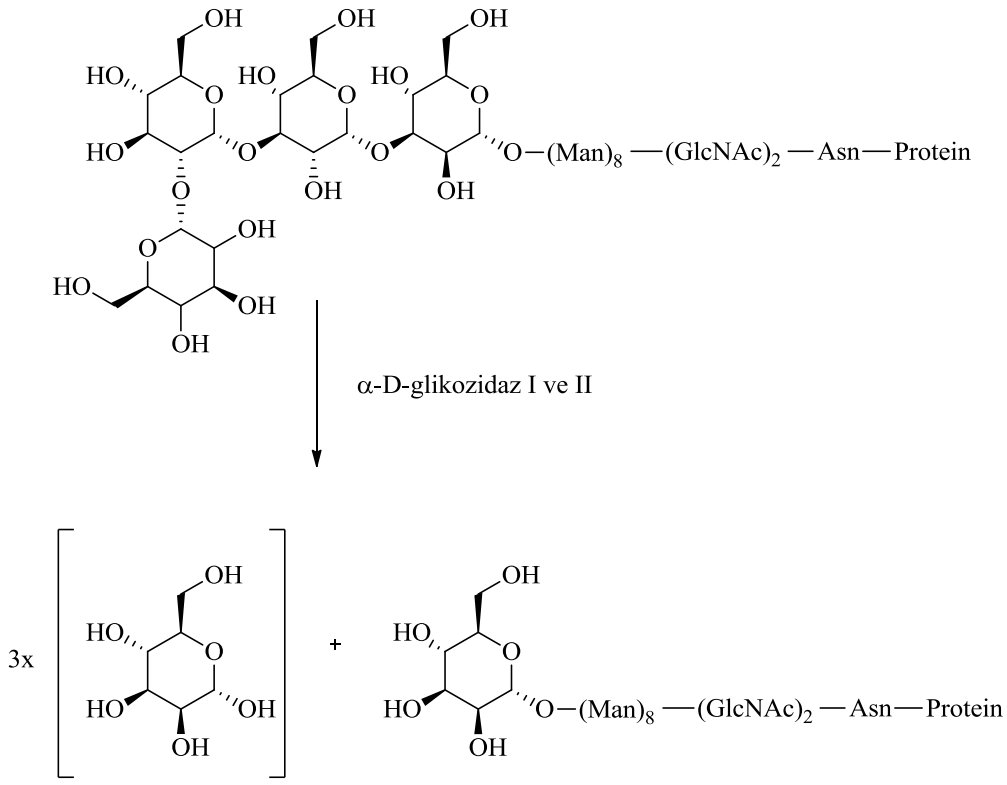
İnsülin salınımını artıran etkenler; karbohidratlar, amino asitler, yağ asitleri, bağırsak hormonları (gastrik inhibitör polipeptit, gastrin, sekretin, kolesistokinin) vagal uyarı, β_2 adrenarjik uyarı.

İnsülin salınımını azaltan etkenler; somatostatin, α_2 adrenerjik uyarı, bazı ilaçlar (diazoksit, vinblastin, kolşisin, fenitoin, streptozosin ve alloksan).

1.3. Tip II Diabetin Tedavisi

Tip II diyabettin tedavisinde amaç plazma glukoz konsantrasyonunu normal sınırlarda tutmak ve hastalığa bağlı uzun dönem komplikasyonları önlemektir. Postprandial hiperglisemiyi azaltmak için terapötik yaklaşımlardan birisi sindirim organlarında bulunan α-amilaz ve α-glukozidaz gibi karbohidrat hidroliz enzimlerini inhibe ederek glukozun absorpsiyonunu yavaşlatmaktır (Kim ve ark. 2004).

Akarboz, tip II Diyabetin tedavisinde kullanılan ilaçlardandır. Akarboz, karbohidratların sindirilmesi için gerekli olan glikozit hidrolaz enzimlerini inhibe eder. Özellikle ince bağırsakların iç yüzeyinde bulunan fırça kenar enzimleri ve pankreastan salgılanan α-amilaz enzimlerini inhibe eder. Pankreastan salgılanan α-amilaz enzimi ince bağırsak lümeninde kompleks nişastaları oligosakkaritlere parçalar. α-glukozidaz enzimi ise yine ince bağırsaklarda bu oligosakkaritleri, trisakkarit, disakkarit ve sonuçta glukoz ve öteki monosakkaritlere parçalar (Bischoff 1994) (Şekil 1.1.). Bu enzimlerin inhibe edilmeleri kompleks karbohidratların sindirimlerini büyük ölçüde azaltır. Bu sayede dolaşıma katılan glukoz miktarı azalır çünkü besinle alınan karbohidratlar glukoz moleküllerine yıkılamazlar (Nickavar ve ark. 2008). Diyabetik hastalarda bu ilaçların kullanılması, kısa zaman dilimleri için kan glikoz seviyesinin düşmesine (özellikle tokluk kan şekeri değerlerinin), uzun zaman zarfında ise hemoglobin A_{1c} seviyesinin hafifçe azalmasına neden olur. Akarboz diyabetik hastalarda kullanılan oral hipoglisemik ilaçların (sülfonilüreler, insülin ya da metformin gibi) etkinlikleri arttırmak amacıyla genellikle bu ilaçlarla kombine halde kullanılır.



Şekil 1.1. Bir glikoproteine bağlı oligosakkaritlerin α-D-glikozidaz I ve II tarafından hidrolizi

1.4. Diabetes Mellitus Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Birkaç tür oral hipoglisemik ilaçlar mevcuttur bunlar insülin salınımını artıranlar (sülfonilüreler, meglitinidinler gibi) ve insülin duyarlaştırıcı ilaçlardır. (Biguanidin, Metformin, Tiazolidindionlar gibi) (Şekil 1.2.).

Sülfonilüreler; Pankreas β- hücrelerinden ATP'ye bağımlı potasyum kanallarını bloke ederek depo insülin salınımına sebep olurlar (fakat yeni insülin sentezini etkilemezler) ve hedef hücrelerde insülin reseptör sayısını ve duyarlılığını artırırlar. Ayrıca antilipolitik etki de gösteririler (örn; Tolbutamide).

Yan etkileri: Gastrointestinal Sistem (GİS) iritasyonu, hipoglisemi, kilo artışı, guatrojenik etki (troide iyot girişini azaltırlar), kardiyotoksik etki, su zehirlenmesi ve dilusyonel hiponatremi, disülfiran benzeri reaksiyon yapar, teratojenisite (ilk üç ayda kontroendikedir), bebekte hipoglisemi (gebelikte son haftalara kontroendikedir).

Biguanidler: Glukoz kullanımını artırılar ve GİS'den glikozun absorbsiyonunu azaltırlar, glikojenolizi azaltarak karaciğerden kana glikoz geçişini azaltırlar. Hiperglisemiyi azaltır ama hipoglisemi yapmazlar. İnsülin salınımına neden olmazlar.

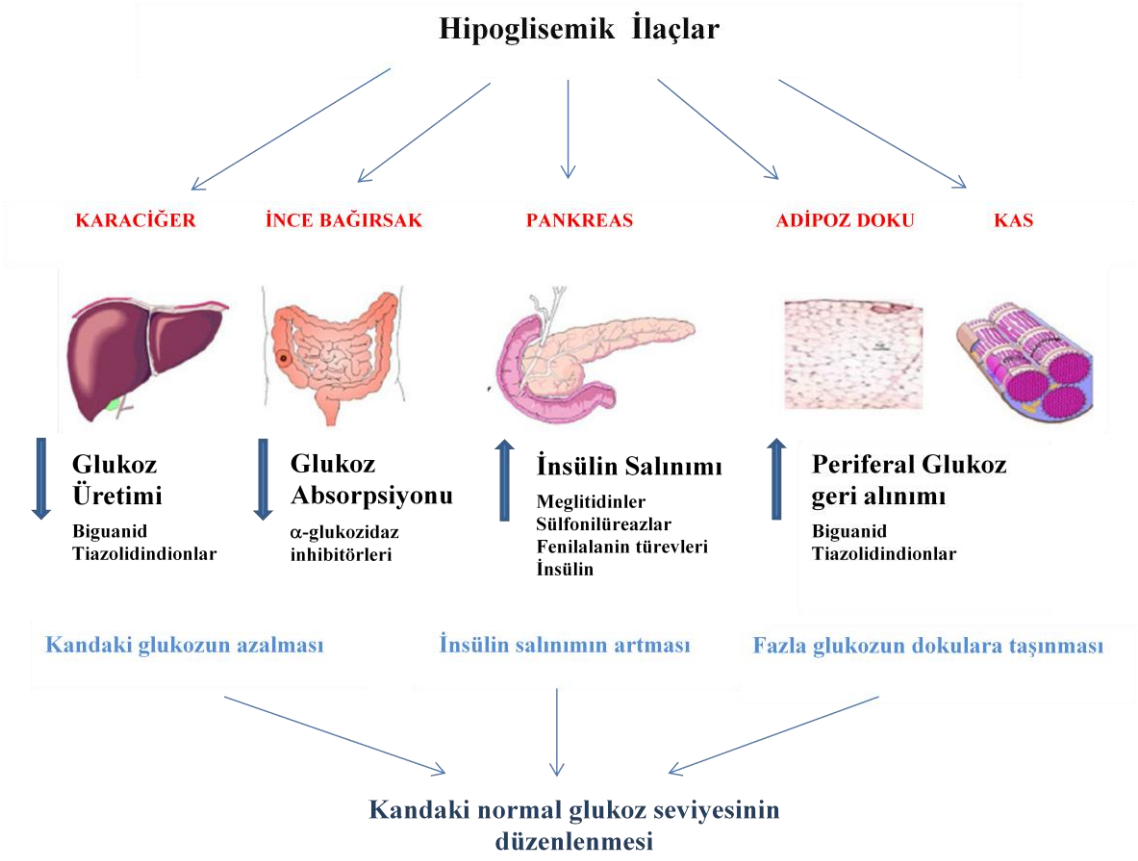
Yan etkileri: En ciddi yan etkileri laktik asidoz, ketonüri, vitamin B_{12} eksikliği, ve teratojenisite.

Aldoz redüktaz inhibitörleri: Glikozun sorbitole dönüşümünü engelleyerek retinopati gibi diabetes mellitus (DM) koplikasyonlarını önleyen ilaçlardır. (ör; Tolrestat, Sorbinil, Statil)

Tiazolidindionlar: Hedef hücrelerde insülin reseptör duyarlılığını artırarak etki ederler. Pankreastan insülin salınımına neden olmaksızın periferik dokularda etki gösterirler (Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon).

Yan etkileri: Sıvı tutulması, ödem, anemi (kansızlık), transaminaz yüksekliği.

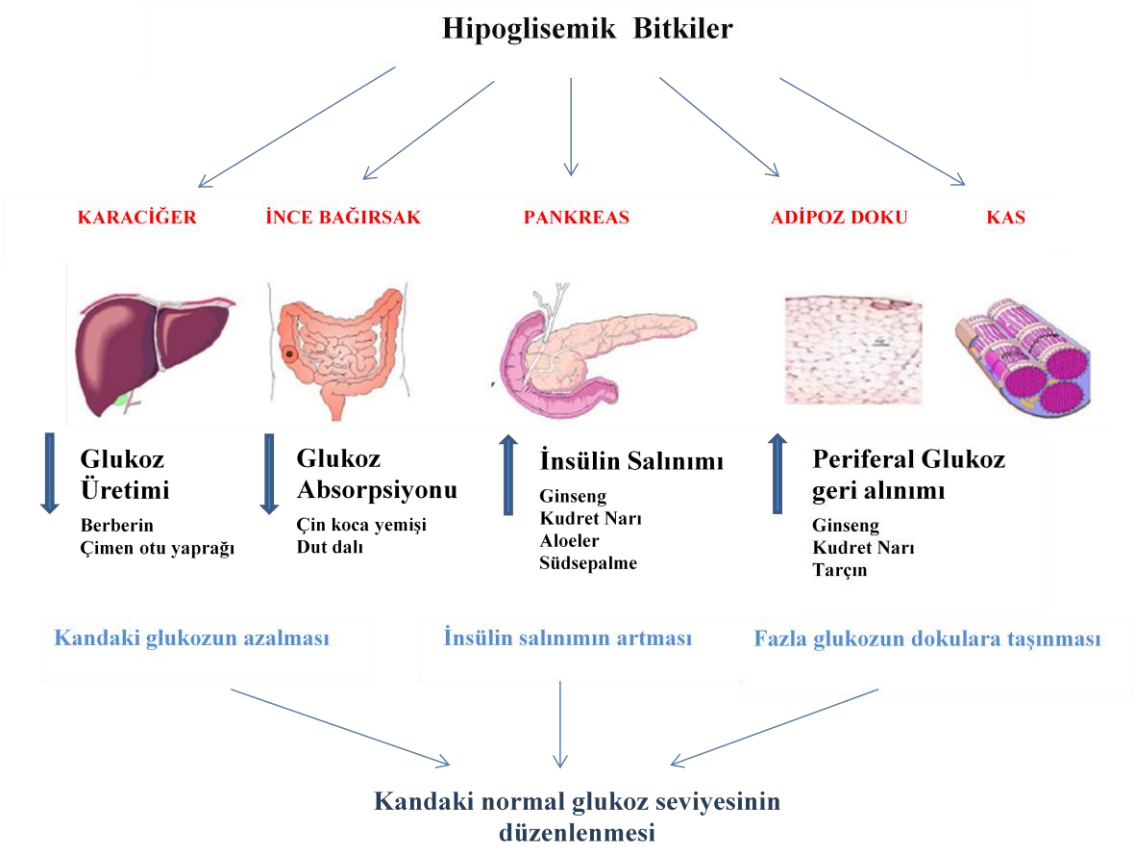
α-Glukozidaz İnhibitörleri: Gastrointestinal sistemden (GİS) glikozun emilimini engelleyerek post prandial hiperglisemiyi önlerler ancak emilmemiş karbohidratlar nedeniyle hastaların yaklaşık %78'inde çeşitli gaz sorunları ve şişkinlik hissi ile %14'ünde ise diyare görülür (örn; Akarboz, Miglitol).



Şekil 1.2. Diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların etki mekanizmaları

1.5. Hipoglisemik Tıbbi Bitkiler

Tıbbi bitkiler antik çağlardan beri birçok kültürde diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır (Heinrich ve ark. 2004, Gurib ve Fakim 2006, Jung ve ark. 2006). Dünya'nın farklı bölgelerinden en çok çalışılan ve yaygın kullanılan *Allium cepa* (soğan), *Allium sativum* (sarımsak), *Aloe vera, Cinnamon tamala, Coccinia indica, Gymnema sylvestre* (Gurmar), *Momordica charantia* (kudret narı), *Ginseng, Trigonella foenum-graecum* (çemen otu), *Berberine* gibi tıbbi bitkilerin kan glukoz seviyesini düşürücü etkileri olduğu rapor edilmiştir (Bailey ve Day 1989, Grover ve ark. 2002, Bnouham ve ark. 2006, Hui ve ark. 2009) (Şekil 1.3.).



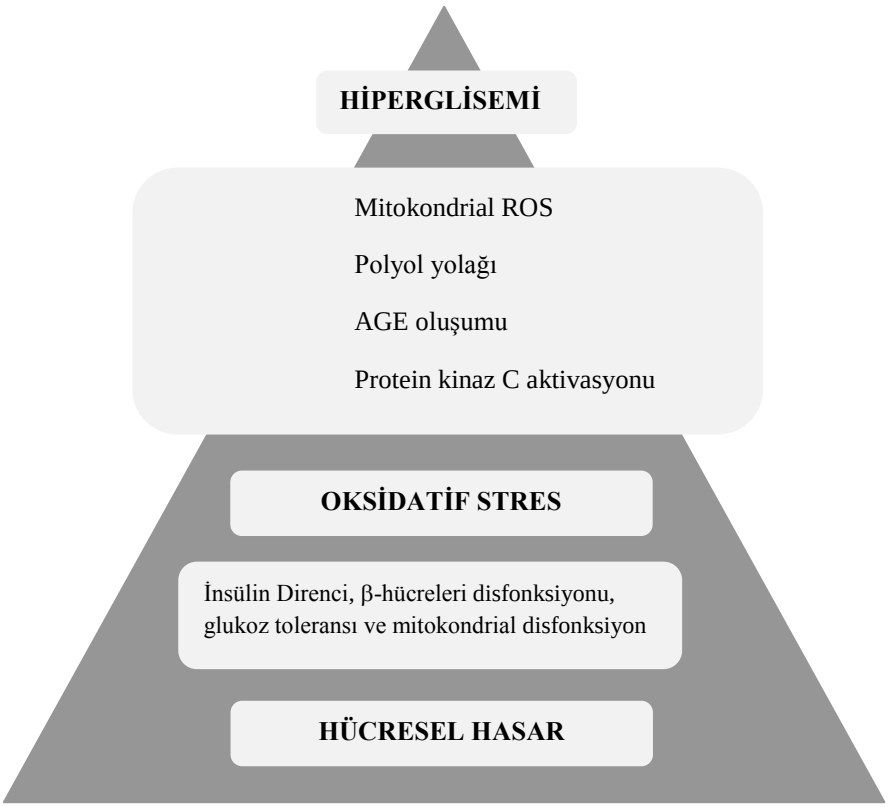
Şekil 1.3. Diabetes Mellitus tedavisinde kullanılan bitkilerin etki mekanizmaları

1.6. Hiperglisemi Kaynaklı Oksidatif Stres

Glukoz konsantrasyonunun artması; serbest yağ asitlerinin artışına ve bununla birlikte mitokondrial reaktif oksijen türlerinin artışına sebep olarak oksidatif stresin başlamasına öncülük eder. Hiperglisemi, polyol yolağını aktive ederek aldoz redüktazın indüksiyonuna ve sorbitol üretimine neden olur. Sorbitol ise NADPH aktivasyonuna neden olarak ROS ve reaktif azot türlerinin oluşumunu (RNS) artırır. Hiperglisemi kaynaklı ROS oluşumu AGE oluşumuna ve protein kinaz C aktivasyonuna sebep olur (Kassab ve Piwowar 2012, Edwards ve ark. 2008, Lin ve ark. 2012) (Şekil 1.4).

Sitokrom P450E1 (CYP2E1) potansiyel ROS kaynağıdır. Oksidatif streste anahtar rol oynar. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hiperglisemi kaynaklı CYPE1 indüksiyonu reaktif serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Bu reaktif serbest radikaller önemli hücresel makromoleküllerle reaksiyona girerek hücresel hasarlar meydana getirirler (Videla ve ark. 2004, Chandrasekaran ve ark. 2012). Oksidatif stres plazma GSH miktarını ve SOD aktivitesini azaltarak immün yanıtı azaltır. Oksidatif

çevrenin sürekliliği ile insülin direnci, glukoz toleransı, β-hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve mitokondrial fonksiyon bozukluğu gelişerek diyabet hastalığı ortaya çıkar (Evans ve Maddux 2005) (Şekil 1.20).



Şekil 1.4. Hiperglisemi kaynaklı oksidatif stresin oluşumunu katalizleyen yolaklar

1.7. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran organik veya inorganik moleküllerle tepkimeye girebilme yeteneğine sahip reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. $Cu^{2+,}$ $Fe^{3+,}$ $Mn^{2+,}$ Mo^{5+} gibi geçiş metallerinde eşleşmemiş elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar tepkimeleri katalizlediklerinden, serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller hücrelerimizde sürekli bir oluşum halindedir ve bu oluşum üç grupta toplanabilir; (Halliwell ve Gutteridge 1989, Halliwell 1994)

a) Normal hücre metabolizması sırasındaki oksijen içeren biyokimyasal tepkimelerde (trikarboksilik asit döngüsü gibi),

b) Enfeksiyonların neden olduğu olaylarda, fagositler tarafından hücre içine alınan bakteri ve diğer canlıların öldürülmesi amacı ile,

c) İyonize radyasyon, UV, çevre kirliliği, sigara dumanı, hiperoksi, aşırı egzersiz ve iskemi sırasında serbest radikaller meydana gelmektedirler.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Aerob canlılar yaşamlarının devamı için oksijene gereksinim duyarlar. Ancak yüksek derişimlerdeki oksijen hücre hasarına yol açmaktadır (Halliwel 1991).

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) iyonlaştırıcı radyasyon ile sulu ortamda ve hidrojen peroksidin indirgenmesiyle oluşmaktadır. Süperoksit ve askorbik asit gibi indirgeyici türlerin bulunduğu ortamlarda hidrojen peroksitten hidroksil radikali üretimi sürekli duruma gelmektedir. Hidroksil radikalinin başlıca hedefi zardaki yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu ise hücre ölümlerine yol açmaktadır.

Hidrojen peroksit, singlet oksijen, hidroksil ve süperoksit radikallerini içeren reaktif oksijen türlerinden (ROS) bazılarının *in vivo* sistemde enerji üretiminde, fagositozda, hücre içi sinyal iletiminde ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde veya biyolojik önemli bileşiklerin sentezinde pozitif rolleri bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge 1989, Halliwell 1994). Reaktif serbest radikaller, lipitler, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi hücresel bileşenlere zarar verirler. (Cerutti 1994, Dean ve ark. 1993, Diplock ve ark. 1994). Kardiyolojik ve nörolojik hastalıkların, astım, diyabet, romatoid artrit, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Parejo ve ark. 2002).

1.8. Hiperglisemi Kaynaklı Oksidatif Streste Antioksidantların Önemi

Antioksidantlar, hücresel proses için hayati önem oluşturan moleküllerin oksidasyonunu inhibe ederek hücreleri oksidatif stres kaynaklı hasara karşı korurlar (Mari ve ark. 2010, Reuter ve ark. 2010).

Reaktif oksijen türlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere biyolojik sistemimizde kendiliğinden mevcut olan antioksidantlar bulunmaktadır (Şekil

1.5.). Antioksidantlar doğal (endojen) ve eksojen kaynaklı antioksidantlar veya enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidantlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Mitokondrial sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve hidroperoksidaz enzim kaynaklı antioksidantlara örnek verilebilir. Enzim olmayan antioksidantların başında lipid fazda yer alan α-tokoferol (E vitamini), β-karoten ile suda çözünebilen askorbik asit (C vitamini), melatonin, sistein, seruloplazmin, hemoglobin, bilirubin vb. sayılabilir (Lee ve ark. 2001).

Antioksidantlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Memişoğulları 2005);

1) Serbest radikal oluşumunu engellerler bunu da üç şekilde gerçekleştirirler:

a) Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırarak,

b) Oksijeni uzaklaştırarak veya derişimini azaltarak,

c) Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak.

2) Oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirirler. Bu özelliklerinden dolayı antioksidantlar için genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırma yapılmaktadır: (Memişoğulları, 2005).

a) Süpürücü (Scavenging) etki gösterenler: Yeni radikal oluşumunu engellerler ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak; Süperoksit dizmutaz (SOD) ve Glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinleri verebiliriz.

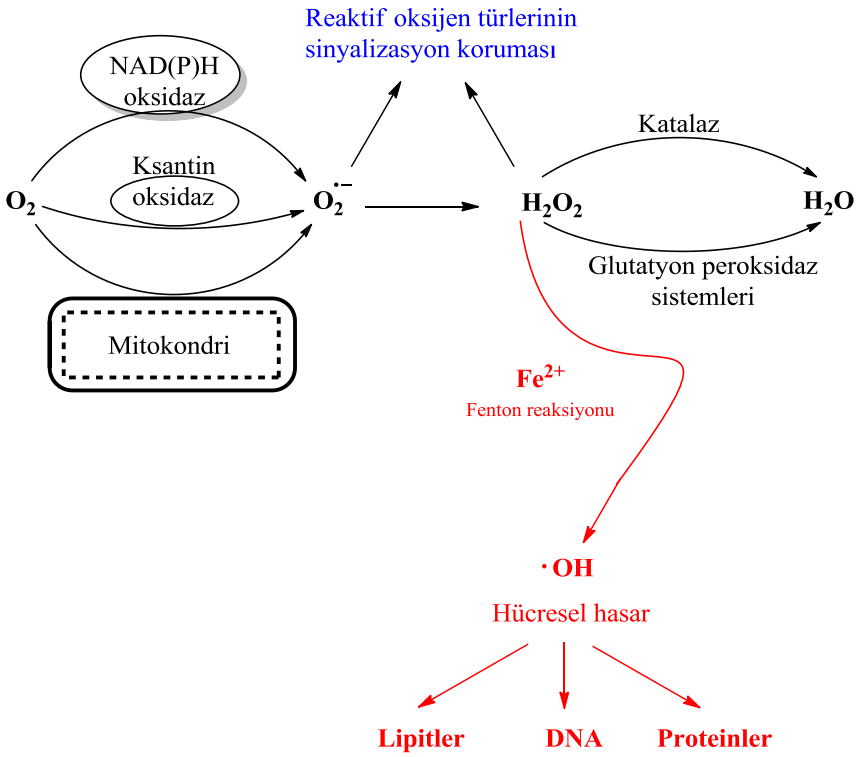
b) Söndürücü (Quencher) etki gösterenler: Oksidantlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, A vitamini (β-karoten), C vitamini (askorbat), E vitamini (α-tokoferol), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.

c) Zincir kırıcı (Chain breaking) etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidant etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.

d) Tamir edici (Repair) etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan

bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi bileşiklerin antioksidant özelliğini gösteren birçok çalışma mevcut olmasına karşın bunların, karaciğer hasarına sebep oldukları ve karsinojenik özellik gösterdikleri saptanmıştır. Bu nedenle doğal antioksidantlara olan ilgi son yıllarda artmaktadır (Wanasundara ve Shahidi 1998).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidant enzimlerin ve antioksidant kapasitenin karaciger, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi dokularla kıyaslandığında, pankreas adacık hücrelerinde en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle diğer dokulara göre oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu bilinen β-hücrelerinde gözlenen hasarın hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Beppu ve ark. 2003).



Şekil 1.5. Reaktif oksijen türlerinin antioksidantlarla etkisiz hale getirilmesi

Diyabette oluşan oksidatif stresin etkisiyle artan serbest radikal miktarına karşın antioksidant üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Böylece, artmış olan serbest radikal derişimi, diyabetin önemli komplikasyonlarından birisi olarak kabul edilmektedir (Maritim ve ark. 2003). Antioksidant savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda

diyetle ek antioksidant alınması vücudun oksidatif strese karşı savunma mekanizmasını güçlendirir ve patofizyolojik durumların ve hastalıkların oluşumunu azaltır.

Vitamin E, alfa lipoik asit ve *N*-asetil sistein gibi antioksidantların insülin hassasiyeti üzerine faydalı etkileri olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Evans ve Maddux 2005). Tip II diyabetli laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar antioksidant takviyesinin oksidatif stres kaynaklı glukoz metabolizması bozukluğunu azalttığını göstermektedir. Doğal antioksidant bileşikler olan resveratrol, epigallokatekin gallat ve quercetin, AMP-protein kinazı (AMPK) aktive ederek metabolik bozuklukları önlemektedirler (Hwang ve ark. 2009). Flavanoidler, polifenolik bileşenler, vitaminler ve üzüm çekirdeği gibi kompleks antioksidant kaynaklar hiperglisemi kaynaklı oksidatif stresi ve karaciğer hasarını azaltırlar.

Polifenoller açısından zengin yiyecekler ve içkilerin, hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda post prandial hiperglisemiyi azalttığı gözlemlenmiş ve olası mekanizmaların; karbohidratların ince bağırsakta sindiriminin ve glukoz absorpsiyonunun inhibisyonu veya pankreatik β-hücrelerinden insülin salınımının uyarılması ve insülin reseptörlerinin aktivasyonu olabileceği ileri sürülmüştür (Hannineva ve ark. 2010).

Hiperglisemi Diabetes mellitustaki devamlı metabolik bir anormallik olduğundan, hiperglisemiyi uzun süreli diyabet komplikasyonlarına bağlayan pekçok mekanizma açıklanmıştır. En önemli mekanizma **non-enzimatik glikasyon** mekanizmasıdır (Robbins ve ark. 1995).

1.9. Non-enzimatik Glikolizasyon ve AGE Oluşumu

Glikolizasyon, şeker molekülünün proteine non-enzimatik olarak bağlanmasıdır. Örneğin Hemoglobin A (HbA)'nın non-enzimatik glikasyonu HbA_{1c} oluşumuna neden olur; bu normal eritrositlerdeki hemoglobinin % 4' üdür. Nonenzimatik glikasyon hızı direkt olarak glukoz salınımı ile ilgilidir ve bundan dolayı Diabetes mellituslu hastalarda HbA_{1c} seviyeleri oldukça yüksektir. HbA 'nın nonenzimatik glikasyonu eritrositlerin 120 günlük hayat süresince devam ettiğinden tek bir HbA_{1c} seviyesi son iki ile dört aylık ortalama kan glikoz seviyeleri hakkında bilgi verir. Gerçekten de HbA_{1c} seviyeleri Diabetes mellitus tedavisinde faydalı bir ek bulgudur. HbA_{1c} en çok

araştırılan glikolizlenmiş protein olmasına rağmen çeşitli yapısal ve düzenleyici proteinlerin aşırı glikasyonu ile glikolizlenmiş ileri son ürünler denilen AGE ürünleri oluşur. Buna örnek serum albümini, kollajen ana miyelin proteini ve düşük yoğunluklu proteinler (LDL) verilebilir. Örneğin damar duvarındaki kollajene bağlanan AGE'ler plazma proteinleri (LDL gibi) ile geri dönüşümsüz kompleksler meydana getirir. Daha büyük damarlarda bu bağlanma damar duvarına giren LDL'lerin normal akımını engelleyerek kan damarlarının iç kısmında kolesterol birikmesine neden olarak ateroskleroz gelişimini artırır (Robbins ve ark. 1995).

Parçalanmaya dirençli AGE ürünleri bazal membranda albümin ve IgG birikimine neden olurlar. Non enzimatik glikasyon hipergliseminin yüksekliğine ve devam süresine bağlı olarak gelişen yavaş bir reaksiyondur. Serbest radikal oluşumunu artırırlar. 3 tip nonenzimatik glikasyon (NEG) reaksiyonu vardır.

Tip I NEG Reaksiyonu

A. Plazma proteinleri (CDL, Alb, Hb) glikolize olur.

B. Glikolize CDL kollejen kompleksi gelişir.

C. Proteoglikanlar glikolize olur.

D. AGE ürünleri artar, bu da bazal membran kalınlaşmalarına yol açar.

E. Vasküler hücrelerde sinyal iletimi bozulur.

Tip II NEG Reaksiyonu

A. AGE ürünleri makrofajlara bağlanır.

B. INF, K-1 ve diğer sitokinler salınır.

C. Vasküler permeabilite bozulur.

D. Endotelde koagülasyon artar.

E. Bazal membranda albümin ve IgG birikir.

Tip III NEG Reaksiyonu

A. DNA onarımı azalır.

B. Mutasyon sıklığı artar.

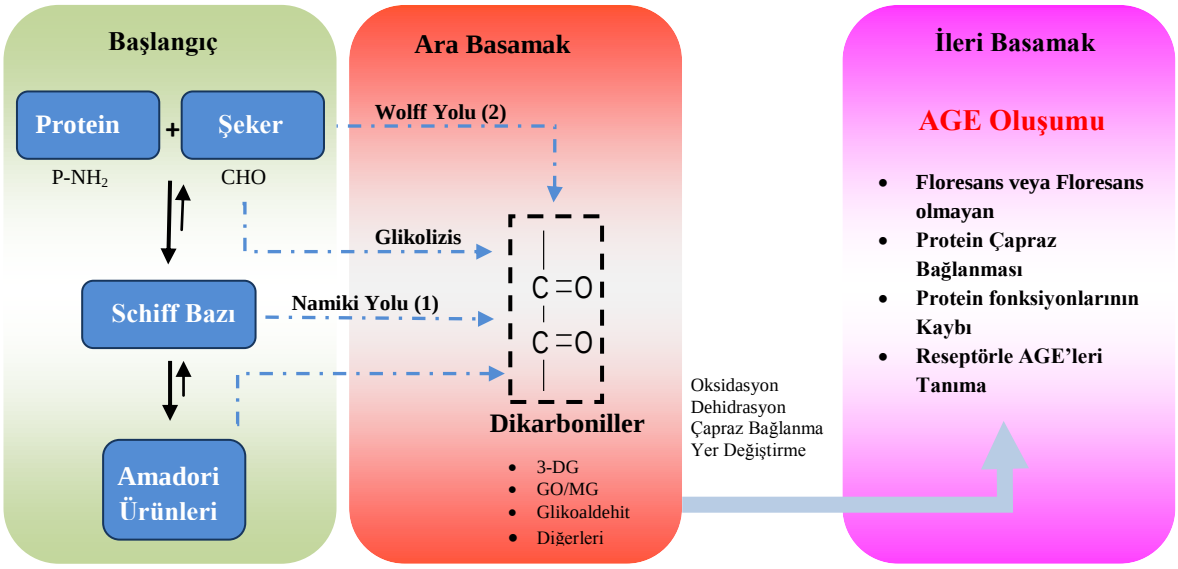
C. Gen ekspresyonu değişikliğe uğrar.

AGE'ler ilk kez gıda kimyasında kullanılmış, daha sonraları ise 1968 yılında HbA_{1c}'nin diyabetik hastalarda keşfi ile AGE'ler ile glikolizasyon sürecinin Maillard Reaksiyonu ile benzer olduğu bulunmuştur (Fayle ve Gerrard 2002, Nursten 2005). Protein glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGE'lere dönüşmektedir. Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken, daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür. Glikasyon, özellikle erken dönemlerde daha fazla olmak üzere konsantrasyon bağımlıdır, bu sebeple diyabette yapımı artar (Singh ve ark. 2001).

1.10. Maillard Reaksiyonu

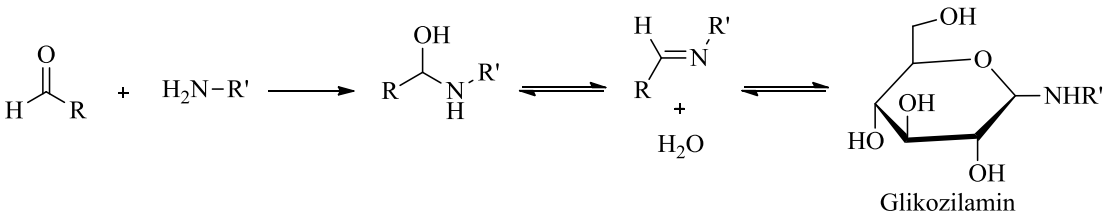
Şekerlerin aminoasitler ile ısıtılması işlemi sonucunda sarı-kahve renkli bir ürün oluştuğu görüşünü ilk kez 1912 yılında Louis Camille Maillard ortaya atmıştır (Maillard 1912). Şeker-aminoasit reaksiyonu daha sonra Maillard reaksiyonu olarak adlandırılmıştır. Renk oluşumu Maillard reaksiyonunun karakteristik bir özelliğidir. Maillard reaksiyonunun en çok çalışılan ürünü kahve renkli, büyük molekül ağırlıklı pigmentler olan melanoidinslerdir, kahvede, ekmekte ve birada bol miktarda bulunurlar (Delgado ve ark. 2005). Maillard Reaksiyonu aynı zamanda furan, pirol ve piridin gibi uçucu bileşikler de verir. Kahvenin ve fırınlanmış ekmeğin ve etin kokusundan bu bileşikler sorumludur.

Maillard reaksiyonu, fruktoz, glukoz, veya glukoz-6-fosfat gibi indirgen şekerlerin karbonil grubu ile proteinlerin, lipidlerin, ve nükleik asitlerin N-terminal amino grubu veya epsilon amino grubu arasındaki bir dizi kompleks tepkimeleri içerir. Bu reaksiyon süreci serbest radikal zincir reaksiyonuna benzer ve başlangıç, ara basamak ve ileri basamak olmak üzere üç basamakta incelenir (Şekil 1.6.).

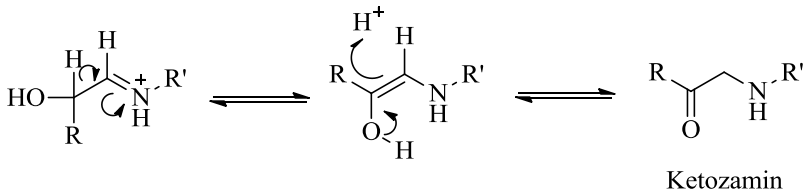


Şekil 1.6. AGE oluşumunun kimyasal yolakları

Başlangıç basamağında; glukoz gibi bir indirgen şeker, aminoasitlerin, peptitlerin veya proteinlerin serbest amino grubu ile reaksiyona girerek kararsız schiff bazı oluşturur (Şekil 1.7.) Bu schiff bazları daha sonra kararlı amadori ürünlerine ve ketoaminlere dönüşür (Şekil 1.8.). Bu reaksiyonların tümü geri dönüşümlüdür ancak eşitliğin yönü substrat konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlıdır. Schiff bazları oksidasyon yapma ve serbest radikal oluşturma eğilimindedirler aynı zamanda reaktif karbonil ara ürünlerinin oluşmasına neden olurlar (Bonnefont 2001). Gkukozun geçiş metalleri varlığında oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit ve keto aldehitler oluşur (Wolff yolağı). Bu da AGE'lerin oluşumunu hızlandırır. Oksidasyon ve glikasyon arasında kompleks bir ilişki vardır.

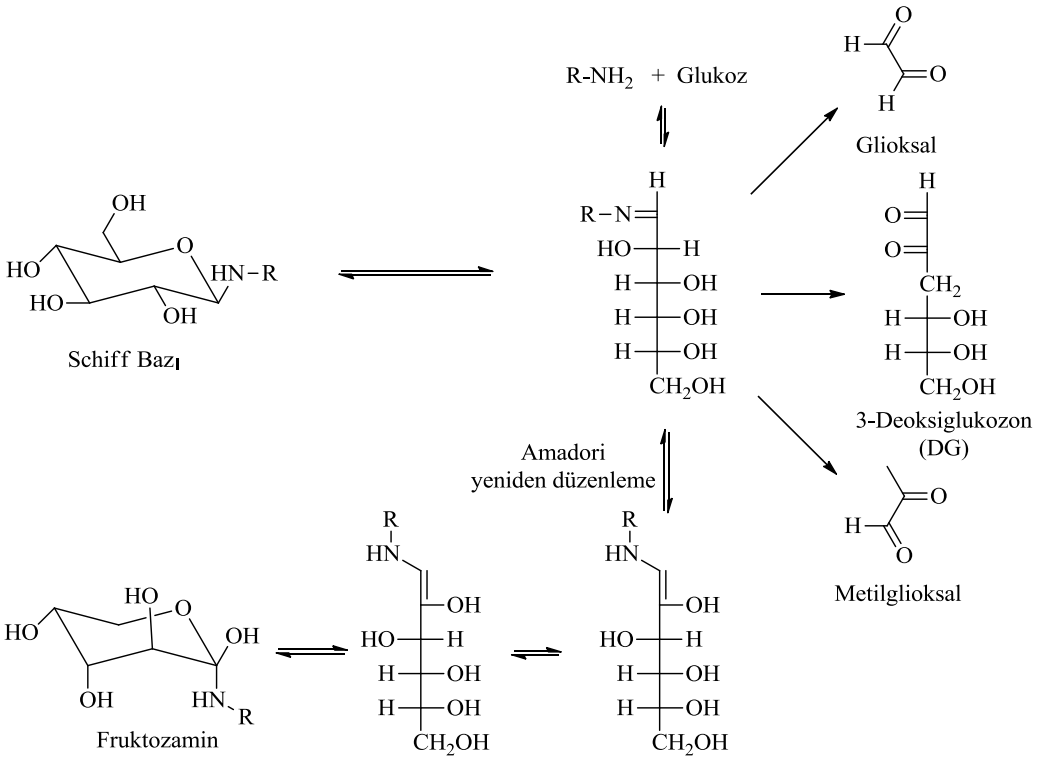


Şekil 1.7. Schiff bazı oluşumu



Şekil 1.8. Amadori yeniden düzenlenmesi

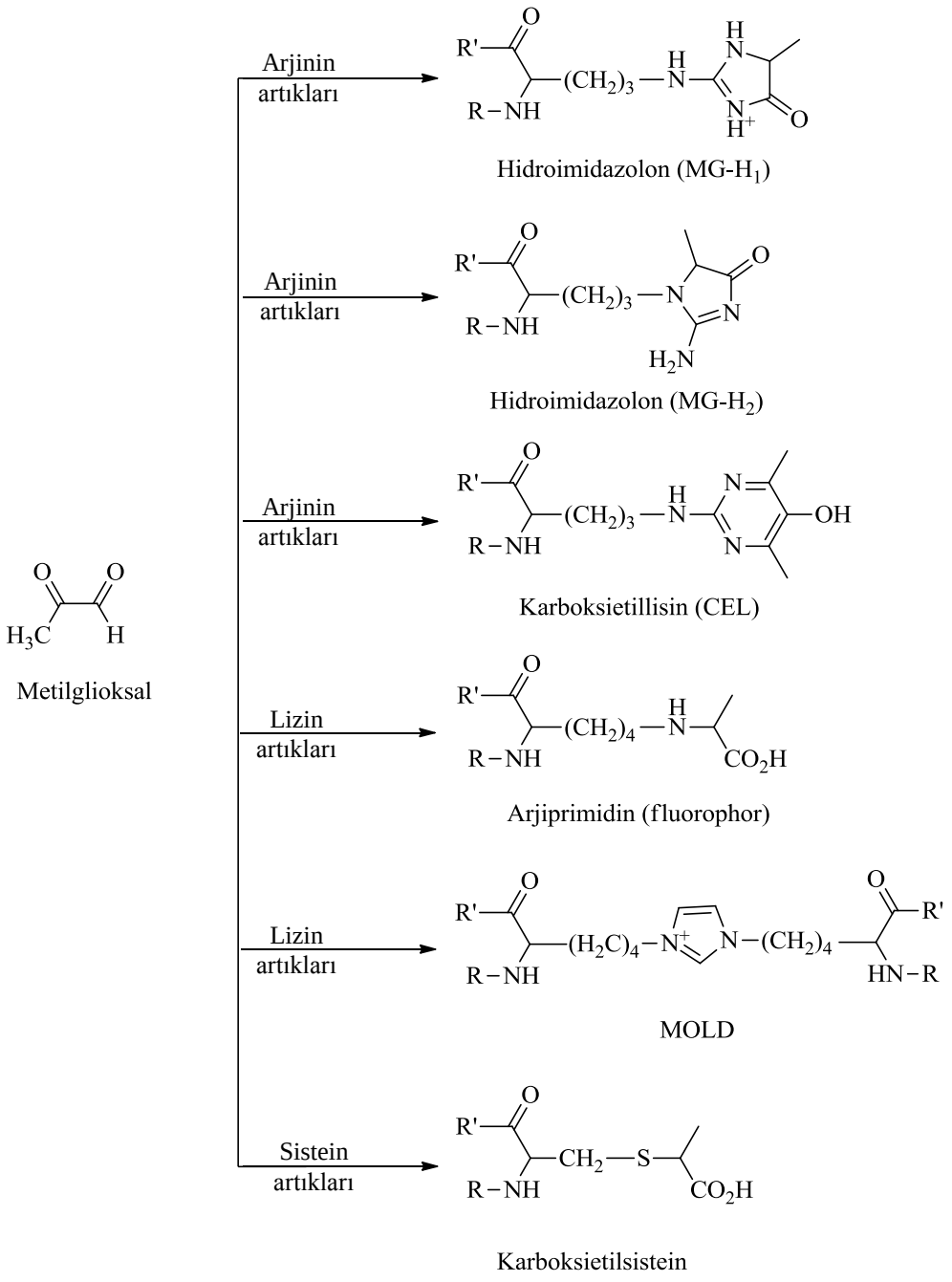
Ara basamakta; Amadori ürünlerinin yeniden düzenlenmesiyle oldukça reaktif karbonil bileşikleri olan glioksal (GO), metilglioksal (MG) ve 3-deoksiglukazon (3-DG) oluşur (Şekil 1.9.). Amadori ürünleri aminoasitlerle reaksiyona girerek metal-iyon katalizi ve oksijen kaynaklı oksidasyon üzerinden N^{ε}-(karboksimetil) lizin (CML) veya yeni jenerasyon aminler oluştururlar.



Şekil 1.9. Reaktif dikarbonil ara ürünlerinin oluşumu

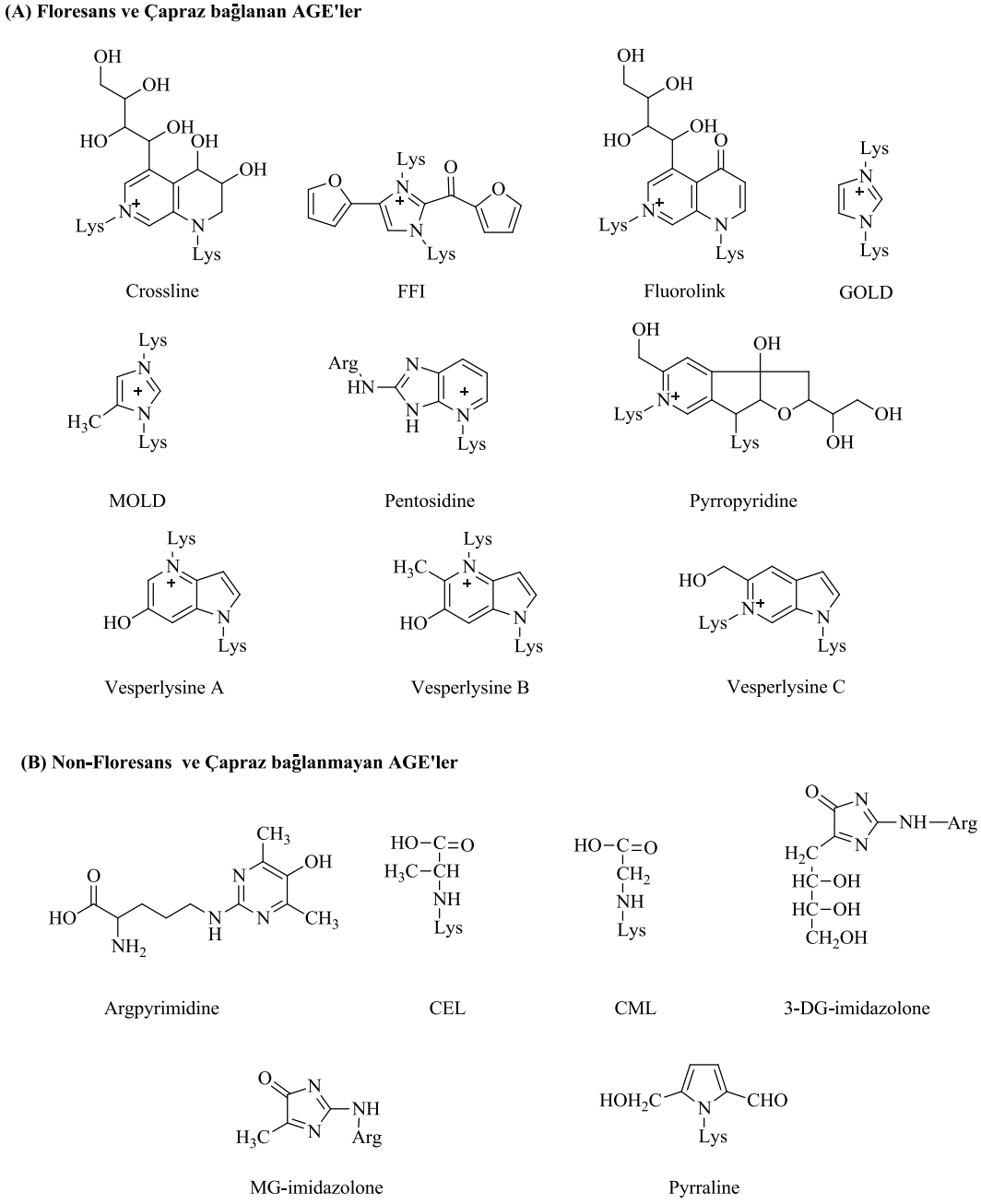
İleri basamakta; oldukça reaktif olan DG, proteinde lizin kalıntısı ile reaksiyona girerek oluşturduğu piralin veya bir pentoz tekrar proteindeki lizin veya arjinin kalıntısı ile reaksiyona girerek pentosidin veya diğer AGE'leri oluşturur. Sonuç olarak proteinde intermoleküler ve intramoleküler heterosiklik çapraz bağlanmalar ve parçalanma meydana gelir, geri dönüşümsüz protein hasarı ve denatürasyonu oluşur.

(Şekil 1.10.). Pentosidin ve piraline ek olarak Amadori ürünlerinden geri dönüşümsüz meydana gelen diğer AGE ürünleri; N^{ε}-(karboksimetil) lizin (CML), N^{ε}-(karboksietil) lizin (CEL), 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole (FFI), glioksal-lizin dimer (GOLD) ve metil-glioksal dimer (MOLD)'dır.



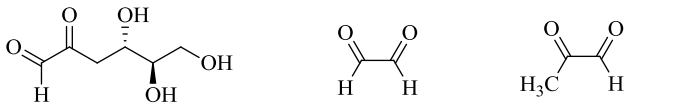
Şekil 1.10. MGO türevli AGE oluşumu

Kimyasal yapılarına göre iki tür AGE vardır: (**A**) Floresans ve çapraz bağlanan AGE'ler; FFI, GOLD, MOLD, fluorolink, pentosidin ve vesperlizin A, B ve C gibi. (**B**) Non-Floresan ve çapraz bağlanmayan AGE'ler; argiprimidin, CML, CEL ve prialin gibi (Şekil 1.11.).



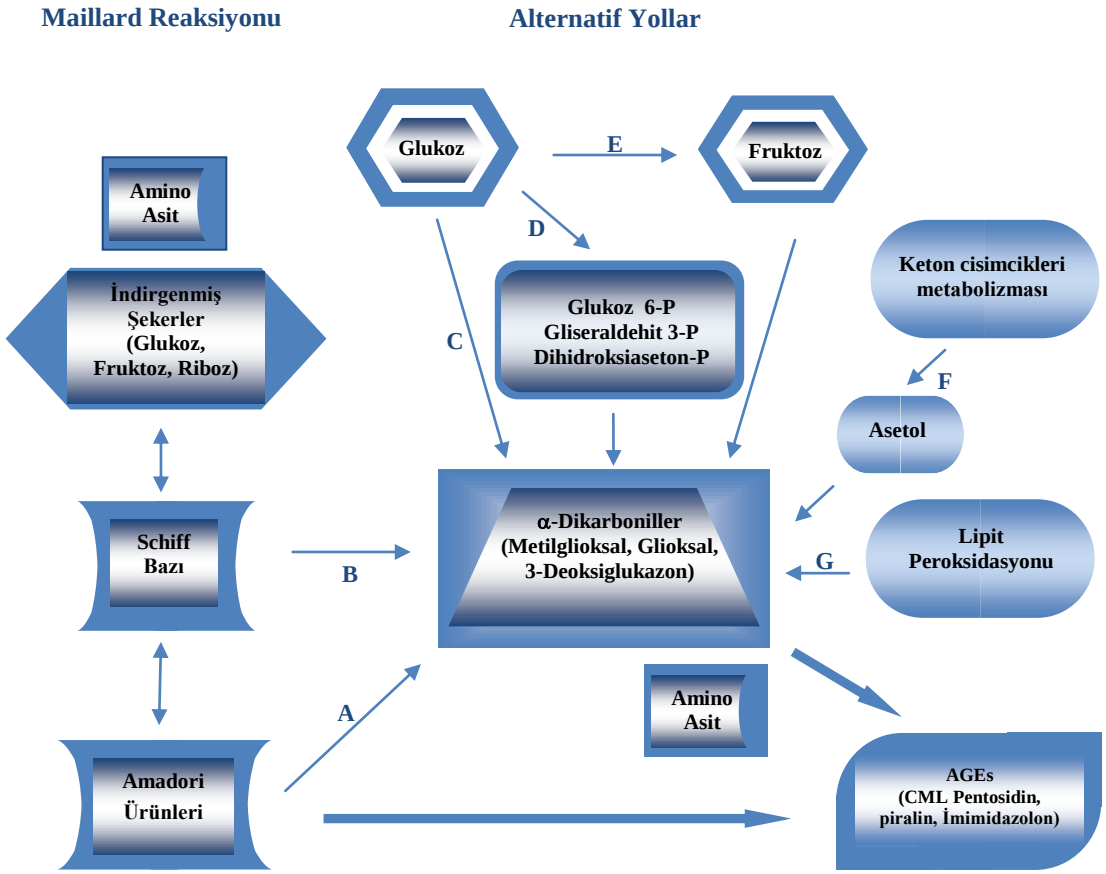
Şekil 1.11. AGE'lerin kimyasal yapısı

AGE oluşumunda diğer bir mekanizma diyabette artmış olan oksidatif strese bağlı olarak şeker veya lipidlerin oksidasyonu sonucunda, ara ürün olarak reaktivitesi yüksek 3-deoksiglukozon, glioksal ve metilglioksal (Şekil 1.12.) gibi düşük molekül ağırlıklı dikarbonil bileşiklerinin oluşumudur. Dikarbonil bileşikler genel olarak glikoliz ara ürünlerinden, glikasyona uğramış proteinlerin degridasyonundan ve lipidlerin peroksidasyonundan oluşabilmektedir. Bu yollara ilave olarak metilglioksal, keton cisimciklerinin metabolizması ve treonin katabolizması yollarıyla da az miktarda oluşabilmektedir (Şekil 1.13.). Dikarbonil bileşikleri yüksek kimyasal aktiviteye sahip olup çok küçük konsantrasyonlarda bile direkt olarak proteinlerin terminal aminoasit artıklarıyla reaksiyona girerek AGE oluşumuna yol açabilirler (Turk 2010).



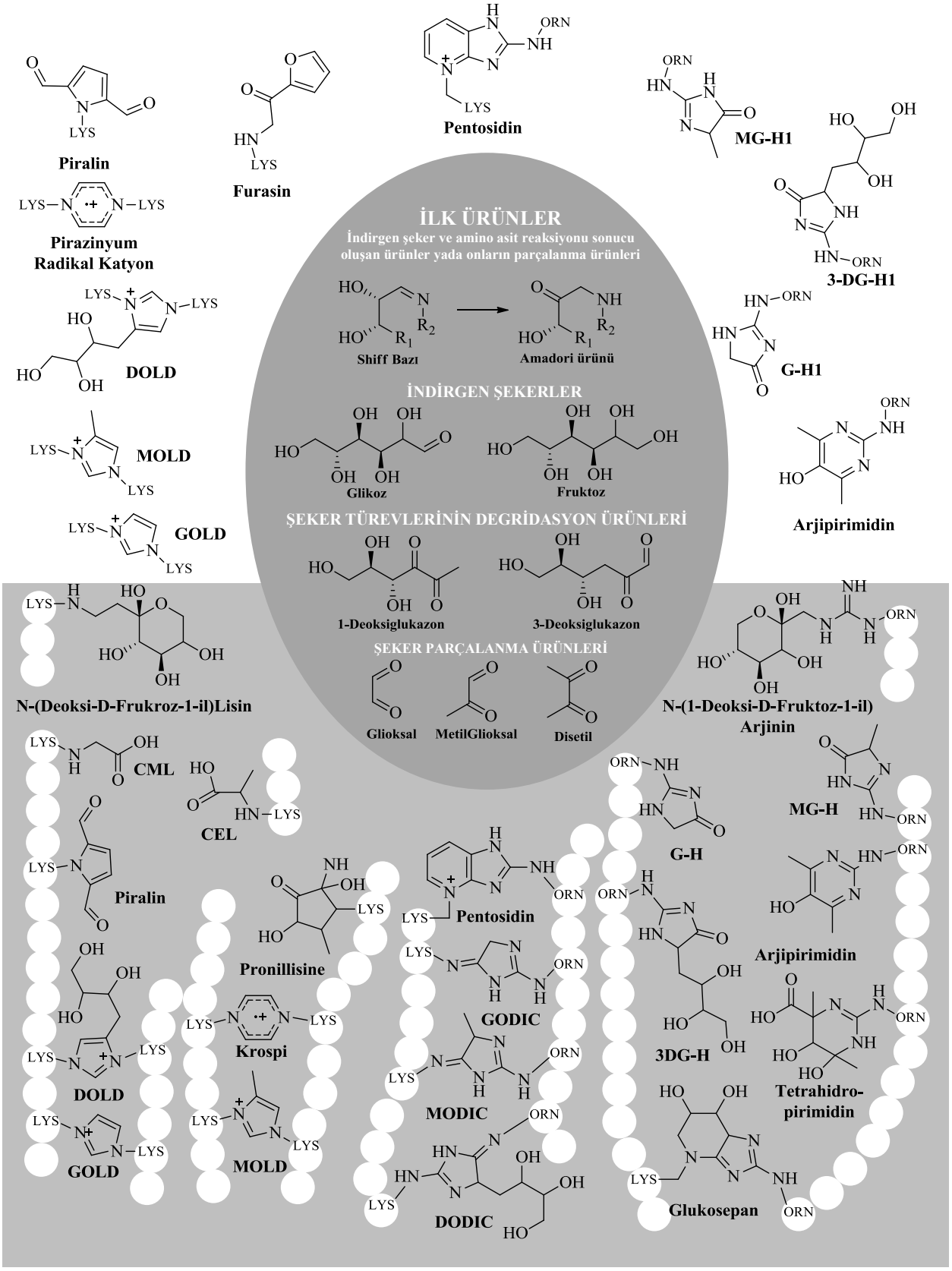
Şekil 1.12. Glikasyon sürecinde oluşan reaktif karboniller

AGE oluşumunda önemli diğer bir mekanizma ise poliol yolağıdır. Glukoz transportu için insülin gerektirmeyen bazı dokularda (sinirler, lensler, böbrekler ve kan damaları) hiperglisemi intrasellüler dokuda glukoz artışına neden olur. Bu fazla glukoz aldoz redüktaz enzimi ile bir poliol olan sorbitole ve daha sonra fruktoza metabolize olur. Bu değişiklik iki istenmeyen etkiye sebep olur; birincisi sorbitol ve fruktoz intrasellüler osmolariteyi artırarak su akımına ve sonunda hücre hasarına neden olur. Lensten osmotik olarak çekilen su şişme ve opaziteye neden olur. İkinci olarak sorbitol birikimi myoinozitol içeriğinde azalma ve Na^+/K^+ adenozin trifosfataz (ATPaz) da bozulmaya neden olur. Bu mekanizma periferik nöropati ve mikroanevrizmalara neden olur. Bu yol, diyabetin nörolojik komplikasyonlarına katkıda bulunur örneğin aldoz redüktazın inhibisyonu katarakt ve nöropati gelişimini engeller (Robins ve ark. 1995).



Şekil 1.13. *İn vivo* AGE oluşumunun farklı yolakları: (**A**) nonoksidatif Amadori ürünlerinin kesimi, (**B**) Namiki yolağı, (**C**) Wolff yolağı, glukoz otooksidasyonu, (**D**) Glikolitik yolak (**E**) Poliol yolağı, (**F**) Keton cisimciklerinin ve treonin metabolizması, (**G**) Lipit peroksidayonu

Maillard reaksiyonunda, proteinlerin veya aminoasitlerin amin artığı indirgen şekerin karbonil grubuyla reaksiyona girerek lipitleri, vitamin C ve quinonları oksitler (Hidalgo ve Zamaro 2005). Primer aminler, sekonder aminlerden daha reaktiftir buna karşın tersiyer aminler inaktiftir. Bundan dolayı lizin aminoasitinin yan zincirinde bulunan amin, proteinlerdeki en reaktif amindir. Arjininin *N*-terminal amino grubu da aynı şekilde reaktiftir. Yiyeceklerle aldığımız aminoasitlerin serbest amino grupları da reaktiftir (Ledl ve Schleicher 1990). Amin kısmının kimyasal yapısı, Maillard reaksiyonu sonucu oluşan AGE'lerin yapısını belirler (Finot ve Magnenat 1981). Amin kısmı bir proteine bağlandığında, reaksiyon geri dönüşümsüz protein modifikasyou ile sonuçlanır. Pentosidin, proteinin lizin ve arginin kalıntısının bir pentoz ile reaksiyonu sonucu oluşur (Van Ngyuyen 2006). İki lizin yan zinciri ve iki molekül glioksal, metilglioksal ve 3-deoksiglukazon arasındaki reaksiyon sonucunda ise sırasıyla, GOLD, MOLD ve DOLD, arginin ve lizin arasındaki çapraz bağlanma ile de GODIC, MODIC ve DODIC oluşur (Şekil 1.14.).



Şekil 1.14. Lizin ve arjinin aminoasitlerinden türeyen AGE molekülleri

1.11. AGE'lerin Genel Özellikleri

AGE oluşumunda etkili faktörler; proteinlerin yapım yıkım hızı, hiperglisemi derecesi ve çevresel oksidan stresin miktarı ve yaygınlığıdır (Goldin ve ark. 2006). AGE oluşumu haftalar süren bir süreç olduğu için genellikle uzun ömürlü proteinleri etkiler. Proteinlerdeki lizin, histidin, arginin amino asitleri glikolizasyonda daha hassastır. Son dönem böbrek yetmezliği gibi yüksek düzeyde AGE oluşumunun olduğu durumlarda nükleik asit ve lipid bileşenler de AGE oluşumuna katılırlar. Glikolizasyon miktarı hiperglisemi derecesine bağlı olduğundan hem hücre içinde, hem de hücre dışında oluşabilir. Vücut sıvılarında en çok bulunan indirgeyici şeker glukozdur ve bu nedenle glikolizlenmeden sorumlu başlıca moleküldür. Fruktoz, treoz, gliseraldehit-3-fosfat ve glukoz-6-fosfat gibi şekerleri glukozdan daha reaktif glikasyon ajanlarıdır (Bierhaus ve ark. 1998).

AGE'ler proteinlerin fonksiyonunun ve yapısının bozulmasına yol açarak Diyabetin ileri komplikasyonları olan nöropatiye, nefropatiye, retinopatiye, Alzhheimer’s hastalığına, vasküler hastalıklara, ateroskleroza ve yaşlanmaya sebep olurlar (Harding ve Ganea 2006).

1.12. AGE Oluşumunun İnhibisyonu

Genellikle anti-glikasyon reaksiyonlarının biyokimyasal mekanizmaları, glikolizlenme sürecini önleyen veya erteleyen *in vivo* reaksiyonları içerir (Şekil 1.15.) (Zieman ve Kass 2004). Bunları şöyle sıralayabiliriz;

1) Serbest radikaller glikolizasyonun erken basamaklarında oluşurlar. Schiff bazları, serbest radikaller ve reaktif karbonil türleri oluşturarak oksidasyon yapma eğiliminde olup aynı zamanda glikolizlenmiş protein serbest radikallerin oluşumunu katalizler. Bu yüzden reaktif karbonil ve dikarbonil gruplarının oluşması oksidatif metabolizmayla ilişkilidir. Erken basamaklarda, antiglikasyon stratejileri; hidroksi radikali ve süperoksit radikalini söndürme ve reaktif karbon ve dikarbonil gruplarını indirgeme olarak sayılabilir.

2) Glikasyon süreci esnasında indirgen şekerlerdeki karbonil veya dikarbonil gruplarının bloke edilmesiyle schiff bazı veya Amadori ürünlerinin oluşumu engellenebilir.

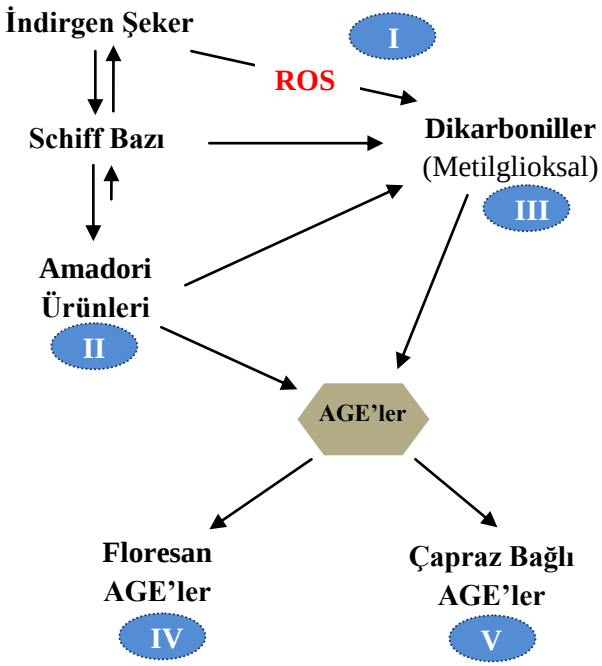
3) AGE oluşumu geçiş metallerinin varlığıyla da ilişkilidir. Bu yüzden metal iyonlarının şelatlanması AGE oluşumunu inhibe edebilir.

4) Son basamakta oluşan Amadori ürünlerinin oluşumunu inhibe etmek.

5) AGE oluşumunda çapraz yapıları kırmak glikasyonu inhibe edebilir.

6) İleri basamaklarda AGE reseptörlerinin (RAGE) bloke edilmesi oksidatif stresi ve biyolojik sistemlerdeki inflamasyonu baskılayabilir.

İlk dört strateji doğal ürünlerin anti-glikasyon özellikleri ile gerçekleşebilir. Son ikisi ise farmakolojik ilaçların supresyon stratejileridir. Birçok antioksidant; glikasyon aşamasında oluşan serbest radikallere karşı koruma sağlayarak Amadori ürünlerinin oksidayonunu önler ve AGE oluşumunu inhibe ederler.

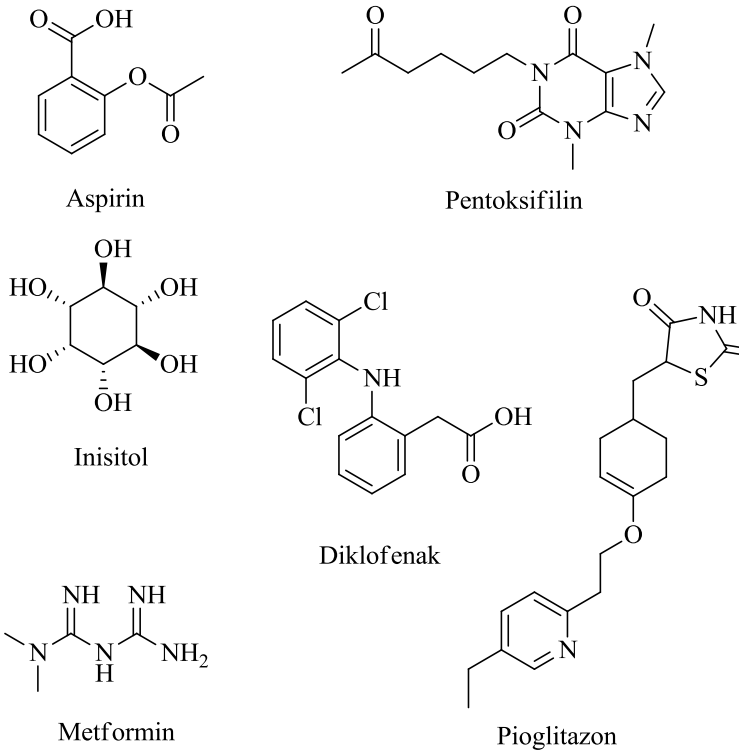


Şekil 1.15. AGE inhibitörlerinin antiglikasyon mekanizmaları: **Tip I** inhibitörler, ROS oluşumunu inhibe ederek glikooksidatif reaksiyonları önlerler. **Tip II** inhibitörler, Amadori ürünlerinin oluşumunu inhibe ederek glikasyonun başlangıç basamağını önlerler. **Tip III** inhibitörler Reaktif Karbon Türleri (RCS) söndürücüleridir. **Tip IV ve V** inhibitörleri ise glikasyonun ileri basamağında oluşan floresans olan AGE'ler ile çapraz bağlanabilen AGE'lerin oluşumunu inhibe ederler

AGE inhibitörlerinin keşfi ve araştırılması diyabetin veya diğer patolojik komplikasyonların önlenmesinde potansiyel terapötik bir yaklaşımdır. Bu amaçla bazı AGE inhibitörleri geliştirilmiştir ve bunlardan birkaçı klinik faza geçebilmiştir (Williams 2004, Giannoukakis 2005). AGE inhibitörleri sentetik bileşikler ve doğal ürünler olmak üzere iki sınıfta incelenir.

1.13. Sentetik AGE İnhibitörleri

Sentetik AGE inhibitörlerinden sadece birkaçı glikasyonun erken basamaklarında, indirgen şeker ve amino grubu arasındaki reaksiyona müdahale ederek schiff bazı ve AGE'lerin oluşumunu inhibe ederler (Şekil 1.16). Örneğin aspirin diğer adıyla asetilsalisilik asit proteinin serbest amino grubunu asetilleyerek glikasyonu engeller (Malik ve Meek 1994, Caballero ve ark. 2000) ve diyabetin ileri komplikasyonlarını önler. Anti-inflamatuar ilaç olan diklofenak proteinle örneğin serum albumin ile non-kovalent bağlanma yaparak, proteini indirgen şekerin saldırısına karşı koruyarak glikasyonu engeller (Van Boekel ve ark. 1992). İnositol güçlü antiglikasyon özelliğe sahip olup insan lens proteinlerinin glikasyonunu % 57-67 azaltmaktadır (Ramakrishnan ve ark. 1999). Metformin, pioglitazon ve pentoksifilin gibi bazı AGE inhibitörleri glikasyonun erken basamaklarında ılımlı inhibisyon gösterirler (Rahbar ve ark. 2000).

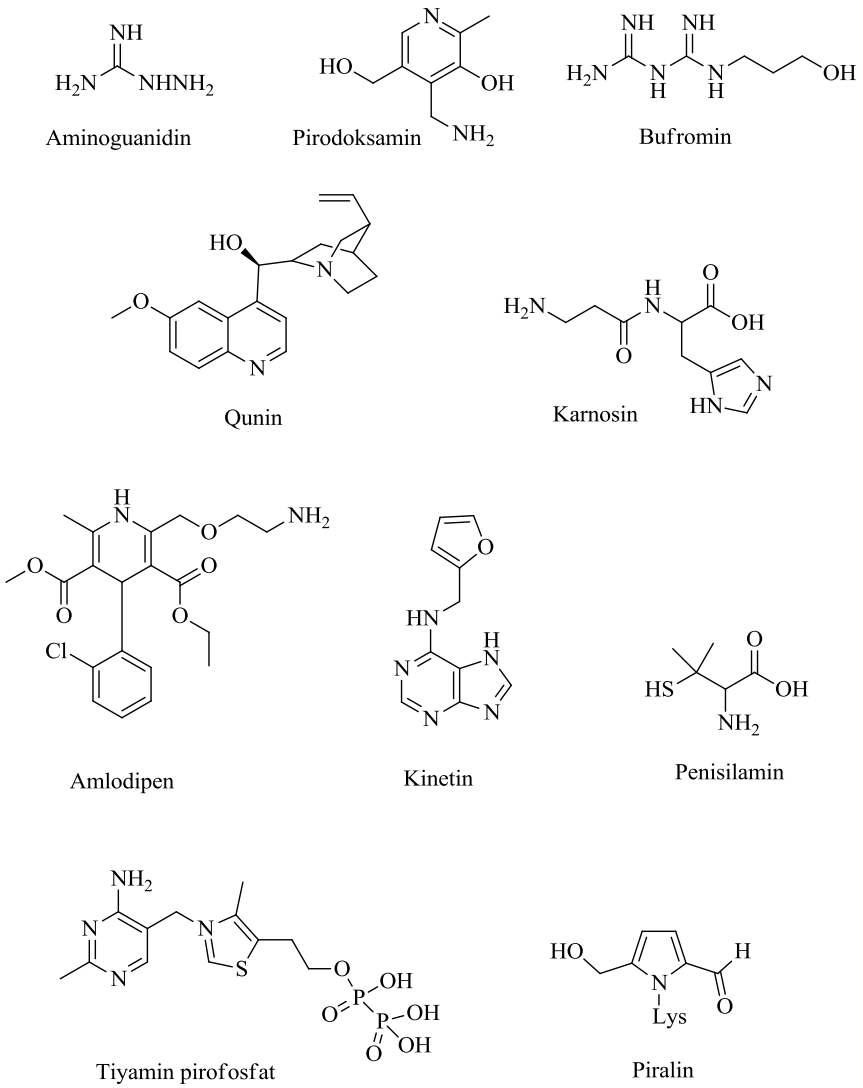


Şekil 1.16. Glikasyonun erken basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri

Sentetik inhibitörlerin çoğu glikasyonun ileri basamağında oluşan AGE'lerin önlenmesinde çok önemli rol alırlar (Şekil 1.17.). Glikasyon esnasında oluşan reaktif karbonilleri inhibe edip ve radikalleri söndürerek Amadori ürünlerinin oluşmasını bloke

ederler. Aminoguanidin (AG) ve piridoksamin karbonil söndürme özelliklerden dolayı en çok araştırılan tipik AGE inhibitörleridir. AG nükleofilik bir hidrazin türevidir, glikasyon kaynaklı β-dikarbonil araürünleri ile reaksiyona girme özelliğinden dolayı diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde rol alır (Thornalley 2003). AG, piridoksamin ile kıyaslandığında bovine serum albumin modelde daha etkili AGE inhibitörü olduğu bulunmuştur (Voziyan ve ark. 2002). Diğer bir dikarbonil söndürücü olan tiyamin pirofosfat da piridokamine kıyasla daha güçlü antiglikasyon özelliğe sahiptir (Booth ve ark. 1997). Metformin (Beisswenger 1999, Ruggiero-Lopez 1999), buformin (Kiho ve ark. 2005) ve karnosin (Hipkiss ve ark. 1994, Yan ve Harding 2005) *in vitro* glikasyonda reaktif karbonil türlerini indirgeyerek proteini korumaya alırlar (Hipkiss 1998, Bonnefont-Rousselot 2001).

Sentetik bileşikler güçlü AGE inhibitörü olmalarına karşın aynı zamanda yan etkilere de neden olmaktadırlar. AG'nin klinik denemelerde gastrointestinal bozukluğa anemiye ve grip benzeri septomlara neden olduğu bilinmektedir (Freedman ve ark. 1999, Williams 2004).



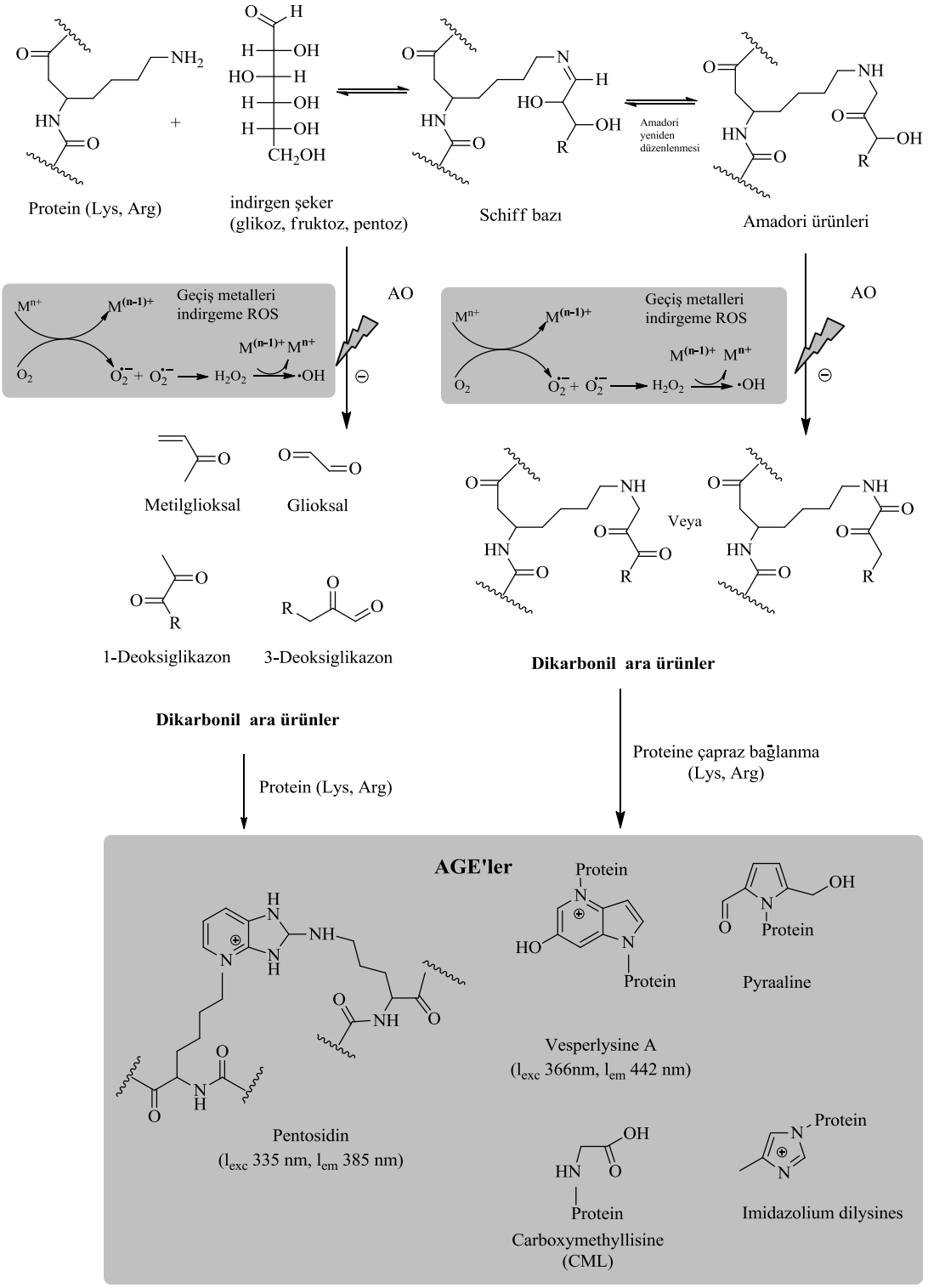
Şekil 1.17. Glikasyonun ileri basamaklarında etkili olan sentetik AGE inhibitörleri

1.14. Doğal Ürünlerden AGE İnhibitörleri

Sentetik bileşiklerle kıyaslandığında doğal bileşiklerin tüketiminin insan sağlığı için daha güvenli olduğu kanıtlanmıştır. Bazı bitki ekstraktlarından elde edilen, fraksiyonların ve bileşiklerin AGE oluşumu üzerine inhibisyon aktiviteleri son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaya başlanmıştır. Oksidatif stres, AGE oluşumunu artırmakta ve hızlandırmaktadır. Antioksidant bileşikler AGE oluşumunu önleyen ajanlar olarak davranırlar. Bitkilerin yapısında bulunan fenolik bileşiklerin antiglikasyon aktiviteleri araştırılmıştır. Antiglikasyonun sürecinde, antioksidantların en yaygın etki mekanizması serbest radikalleri söndürmeleridir (Şekil 1.18.) Vitamin C ve E, karetenoid, selenyum ve fenolik bileşen olarak antosiyanin, flavanoid, katekin ve lipoik asit içeren gıdalar

antioksidant bakımından da zengindir. Bu bileşenler meyve ve sebzelerde (vitamin C, antosiyanin, flavanoid), kabuklu yemiş tohumları ve yağlarında (vitamin E), şarap ve çikolatada (flavanoid), ıspanak, karaciğer, brokoli ve patateste (lipoik asit) bulunurlar (Wu ve ark. 2011).

Allium Sativum (sarımsak); kardiyovasküler ve yaşlılıkla ilişkili hastalıkların önlenmesinde çok önemli rol oynar. Kolesterol ve trigliserit seviyelerini düşürür, hipertansiyonu önler ve lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe eder. Sarımsak ekstraktının en önemli aktif bileşeni olan *S*-allilsistein güçlü bir antioksidant ve radikal söndürücüdür. Katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi *in vivo* antioksidant enzimlerin de etkilerini artırmaktadır (Wu ve ark. 2011). *İn vitro* çalışmalar sarımsak ekstraktının AGE (CML) gibi oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir (Ahmad 2006). Hayvan modellerinde *S*-etilsistein ve *S*-propilsisteinin plazma HbA1c seviyesini azalttığı gözlemlenmiştir (Lin ve Yin 2008). Başka bir *in vitro* modelde sarımsak ekstraktından elde edilen 6 organik sülfür bileşiğinin LDL glikasyonu önleme aktiviteleri araştırılmıştır; *S*-allilsistein, *S*-etilsistein, *S*-propilsistein, *S*-metilsistein bileşikleri diallilsülfid ve diallildisülfid bileşiklerinden daha güçlü antiglikasyon aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Huang ve Horng 2004). *In vivo* çalışmalarda sarımsak ekstraktının diyabetik farelerde (STZ kaynaklı) hipoglisemik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Rajani ve ark. 2008).



Şekil 1.18. AGE oluşumunun önlenmesinde antioksidantların etki mekanizması (AO: Antioksidant)

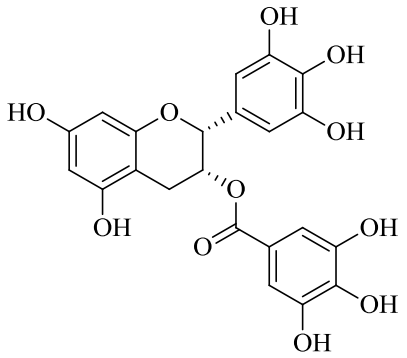
Ilex paraguariensis mate çayı olarak da bilinir, Güney Amerika bölgesinde yetişmektedir. Birçok çalışma göstermektedir ki, mate çayı yalnızca vitamin ve mineral açısından zengin değil aynı zamanda yeşil çaydan üç kat daha fazla polifenol katekin ve flavanoid içermektedir (Heck ve Mejia 2007). Günümüzde de Güney Amerika'daki milyonlarca insan mate çayını günlük tüketmektedirler. Son yıllarda bu geleneksel çay Dünyanın başka büyük kentlerine de yayılmıştır. Lunceford ve Gugliucci (2005), mate çayı eksraktının, *in vitro* MG kaynaklı BSA glikasyonunu, yeşil çay ekstraktından daha fazla inhibe ettiğini ileri sürmektedirler. Kafeik asit ve klorogenik asit, *I. paraguariensis* ekstraktının en önemli aktif bileşenleridir (Gugliucci ve ark. 2009).

Tarçın Lauraceae ailesine aittir. Geleneksel baharattır, yaprakları ve kabukları aroma verici olarak kullanılır. Tüm tarçın veya su ekstraktının, metabolik sendromların semptomlarını azalttığı, obeziteye karşı koruduğu, inflamasyon ve protein glikasyonunu önlediği ileri sürülmüştür (Qin ve ark. 2010). Peng ve ark (2008), farklı çözücülerle hazırlanmış tarçın kabuğu ekstraktının antiglikasyon aktivitesini araştırmışlar ve etil asetat ekstraktının en iyi antiglikasyon aktivite gösterdiği sonucuna varmışlar. Etil asetat ekstraktından, CML ve pentosidin oluşumunu inhibe eden katekin ve prosiyanidin B2 fraksiyonlarını elde etmişler. Prosiyanidin B2 aynı zamanda RCS (Reaktif Karbon Türleri) söndürücü özelliğine sahiptir ve AG ile benzer mekanizmayla glikasyonu önler (Peng ve ark. 2010).

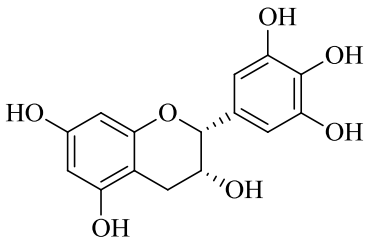
Rosmarinus officinalis (biberiye), Akdeniz Bölgesinde yetişen küçük aromatik çalıdır. Uçucu yağ bakımından oldukça zengindir. Yaprakları sıklıkla baharat olarak kullanılır, ana bileşenleri karnosik asit ve karnasoldur. İlk kez Kim ve Kim (2003), *R. officinalis* ekstraktının antiglikasyon aktivitesi olduğunu tespit etmişler ve bunun antioksidant aktivitesiyle yakından ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Hsieh ve ark. (2007) daha sonraki çalışmalarda, kardiyovasküler hastalıklarda ve nörodejeneratif bozukluklarda *R. officinalis*'in olası glikasyon önleyici rolünü araştırmışlar. MG kaynaklı kollajen glikolizasyonu model sisteminde biberiye ekstraktı, AG'e eşdeğer antiglikasyon aktivite göstermiştir. Aynı zamanda LDL oksidasyonunu ve glukoz kaynaklı glikasyonu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Camellia sinensis (yeşil çay), Dünya çapında uzun geçmişi olan çok popüler bir içecektir. Yeşil çay bol miktarda tannin (flavonoid) içermektedir ve çok güçlü bir

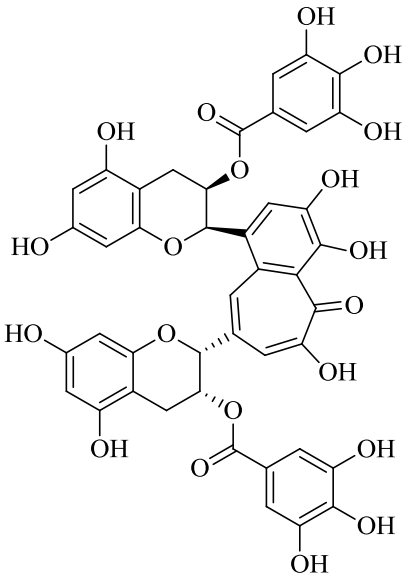
antioksidandır. Nakagawa ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışma, yeşil çayın su ekstraktının antiglikasyon aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu özelliği yapısında bulunan epigallokatekin, epigallokatekin gallat (Şekil 1.19.) gibi çay polifenolleri ile ilişkilendirilmiştir. Hayvan çalışmalarında yeşil çay ekstraktının 14 günlük C57BL/6 fare modelinde kollajen glikasyonunu ve floresans AGE ürünlerinin oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Kathryn ve ark. 2003). Başka bir çalışmada yeşil çay veya siyah çay (% 1.25) içirilen diyabetik sıçanlarda katarakt oluşumunun önlendiği gözlemlenmiştir (Vinson ve Zhang 2005).



Epigallokatekin gallat (EGCG)



Epigallokatekin (EGC)

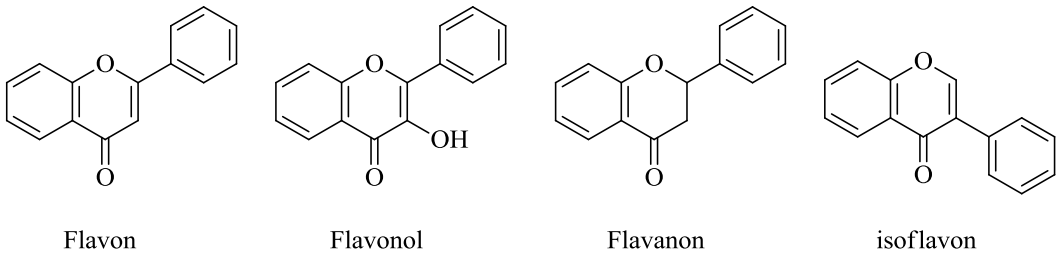


Teaflavin-3-3'-digallat (TF3)

Şekil 1.19. Karbonil söndürücü özelliği olan bazı çay polifenollerinin kimyasal yapıları

Doğal kaynaklı on flavonoidin hiperglisemi kaynaklı protein modifikayonunu *in vitro* önleme etkileri çalışılmıştır. Luteolinin protein glikasyonunu her basamağında önlediği bulunmuş, diğer flavonoidlerden daha etkili antiglikasyon aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Bunun yanısıra radikal söndürme özelliği ile glikasyon inhibisyonu arasında çok güçlü pozitif bir ilişki olduğu belirtilmiştir.

Genel olarak flavonlar; flavanol, flavanon ve izoflavon ile kıyaslandığında daha güçlü inhibisyon etkisi gösterirler (Vinson ve Zhang 2005) (Şekil 1.20). İnhibisyon etkilerini flavon> flavanol>flavanon olarak sıralanmaktadır (Wu ve Yen 2005).



Şekil 1.20. Genel flavonoidlerin kimyasal yapıları

Bir hayvan modeli çalışmasında, fenolik asitler, kafeik asit ve elajik asit her 100 g fare diyetine 2.5 veya 5 g eklenerek diyabetik farelere 12 hafta boyunca veriliyor. HbA_{1c}, glikolizlenmiş albumin ve renal karboksimetillizin (CMC) seviyelerinde bir azalma olduğu gözlemleniyor. Bir başka hayvan modeli çalışmasında; yeşil çay ekstraktı 4 hafta boyunca hergün kg başına 300 mg ekstrakt olacak şekilde diyabetik farelere veriliyor. 4 haftanın sonunda farelerde kan glukoz seviyesinde, total AGE floresans yoğunluğunda ve Hb1Ac seviyesinde anlamlı düşüş gözlemleniyor. Aynı çalışmada yeşil çay farelerin içtikleri suya eklenerek veriliyor fakat kontrol grubuyla kıyaslandığında kan glukoz seviyesinde çok anlamlı değişiklik olmuyor ancak lens floresans yoğunluğunda düşüş gözlemleniyor (Mustata ve ark. 2005).

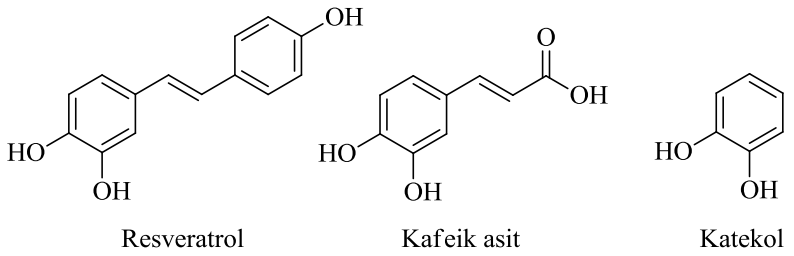
1.15. Doğal Ürünlerin Aktivitesindan Sorumlu Olan Sekonder Metabolitler

Dünya üzerinde 750.000 – 1.000.000 arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan 500.000 kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir. Her yıl 2.000 kadar yeni tohumlu bitki türü tanımlanıp isimlendirilmektedir (Baytop 1999). Bitkiler, ekosistemde büyümek, gelişmek ve korunmak için farklı sekonder metabolitler üretirler (Edwards ve Gatehouse 1999, Kutchan 2001). Şimdiye kadar aydınlatılan 100.000'e yakın bitki sekonder metaboliti vardır. Sekonder metabolitler, sağlık üzerine sayısız pozitif biyolojik aktivite sergilerler. Antibakteriyel, antikanser, antifungal ve antioksidant aktiviteler bunlardan önemli olanlarıdır. Bitki sekonder metabolitlerinin farmakolojik değeri, sağlık üzerindeki önemli rollerinin keşfedilmesiyle artar ve yeni ilaçların gelişmesine öncülük eder (Wink 1999).

Bu sekonder metabolitlerin en önemli kimyasal grupları; terpenler, fenolikler, flavanoidler, quinonlar, tanninler, kumarinler ve alkoloidlerdir.

1.15.1. Fenoller ve fenolik asitler

Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar (Moure ve ark. 2001). Fitoaleksin ve resveratrol fenoliklere örnek sekonder metabolitlerdir. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidantlar flavonoidler, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan koruduğu bilinmektedir (Shahidi ve Naczk 1995) (Şekil 1.21.).

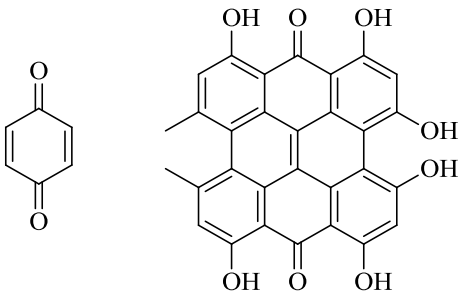


Resveratrol Kafeik asit Katekol

Şekil 1.21. Tipik fenoliklerin kimyasal yapıları

1.15.2. Quinonlar

Quinonlar iki keton içeren aromatik halkalardır, proteinlerdeki nükleofilik amino asitlerle dönüşümsüz kompleks oluştururlar. Mikrobiyal hücrelerdeki hedef bölgeleri, membrana bağlı enzimler ve hücre duvarında bulunan polipeptitlerdir. Hiperisin, bir antraquinondur, antidepresan ve antimikrobiyal olarak kullanılır (Duke 1985) (Şekil 1.22.).

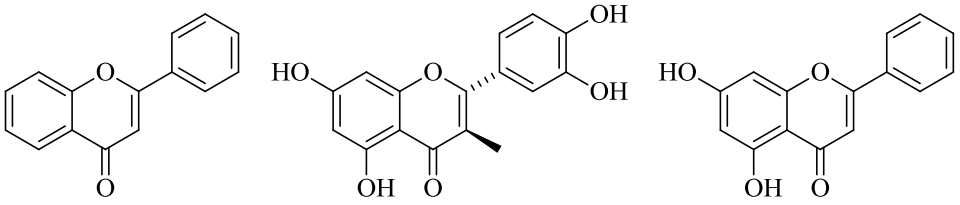


Quinon Hiperisin

Şekil 1.22. Quinonların kimyasal yapıları

1.15.3. Flavonler, flavanoidler ve flavonoller

Flovenler bir karbonil grup içeren fenolik yapılardır, 3-hidroksi grubun eklenmesiyle flavonoller oluşur. Flavanoidler ise hidroksillenmiş fenolik bileşenlerdir, antioksidant özelliğin yanında mikrobiyal infeksiyonlara karşı koruma için bitkiler tarafından üretilir. Antimikrobiyal aktiviteleri, ekstrasellular proteinlerle ve bakteriyal hücre duvarlarıyla kompleks oluşturmalarından kaynaklanır. Katekinler, flavanoidlerin indirgenmiş formudur, yeşil çayda bulunur antimikrobiyal ve antioksidant özellik gösterirler (Toda 1989) (Şekil 1.23.).

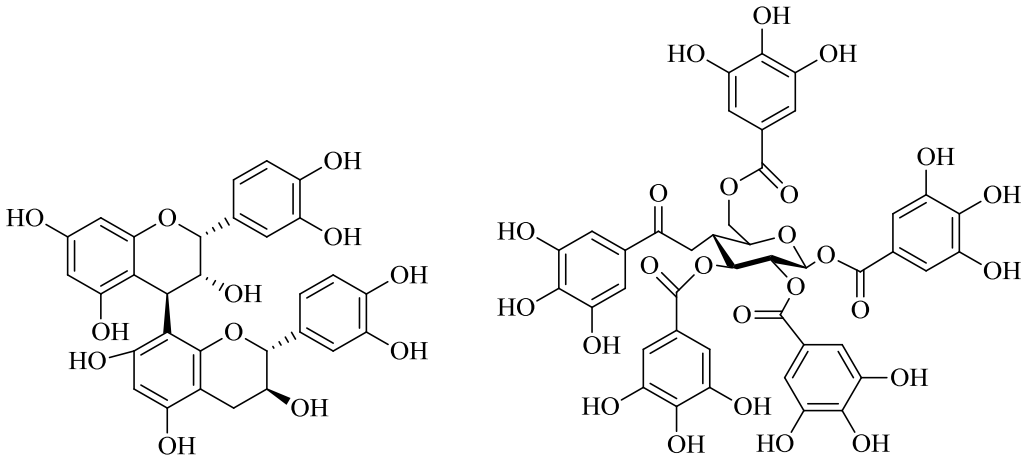


Flavon Katekin Krisin

Şekil 1.23. Bilinen bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları

1.15.4. Tanninler

Tanin polimerik fenolik grupların genel tanımlayıcı bir adıdır. Hemen hemen tüm bitkilerde bulunur. Fagositik hücreleri uyarma, geniş antiinfektif aktivite ve antitümör aktivite fizyolojik aktiviteleri olarak sayılabilir. (Okuda 1993) (Şekil 1.24.)

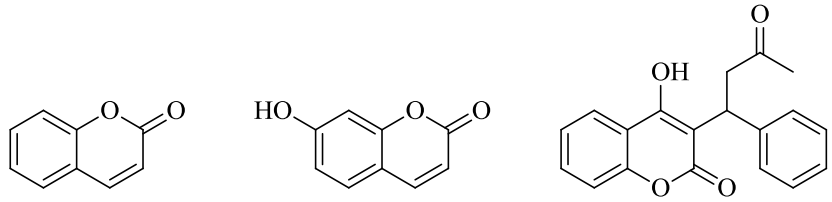


Prosiyanidin B2 Pentagalloyglukoz

Şekil 1.24. Bazı Tanninlere örnekler

1.15.5. Kumarinler

Kumarinler, benzen ve α-piron halkasından meydana gelmiş fenolik bileşenlerdir. Warfarin iyi bilinen bir kumarindir, antikoagulant olarak kullanılır. Kumarinler makrofajları uyararak infeksiyon üzerinde indirekt negatif etki yapar (Casley-Smith 1997) (Şekil 1.25).



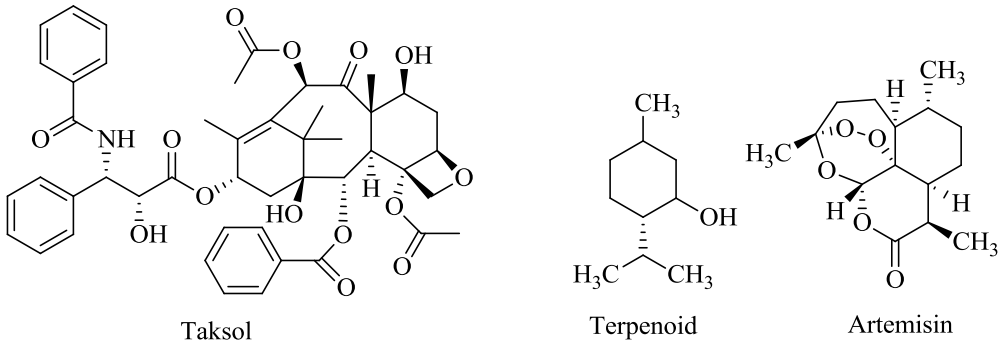
Kumarin 7-hidroksi kumarin Warfarin

Şekil 1.25. Bazı genel kumarinler

1.15.6. Terpenoidler

Terpenler olarak adlandırılırlar, genel kimyasal yapıları $C_{10}H_{16}$'dır. Diterpen, triterpen ve tetraterpen (C_{20}, C_{30}, C_{40}), hemiterpen (C_5) ve sesquiterpen (C_{15}) olarak bulunurlar. Bileşik, ek bir element genellikle oksijen içerdiğinde terpenoid olarak adlandırılır. Genel terpenoidlere, mentol ve kamfor (monoterpenler) ve farnesol ve artemisin (sesquiterpenler) örnek verilebilir. Terpenler ve terpenoidler, bakteri mantar

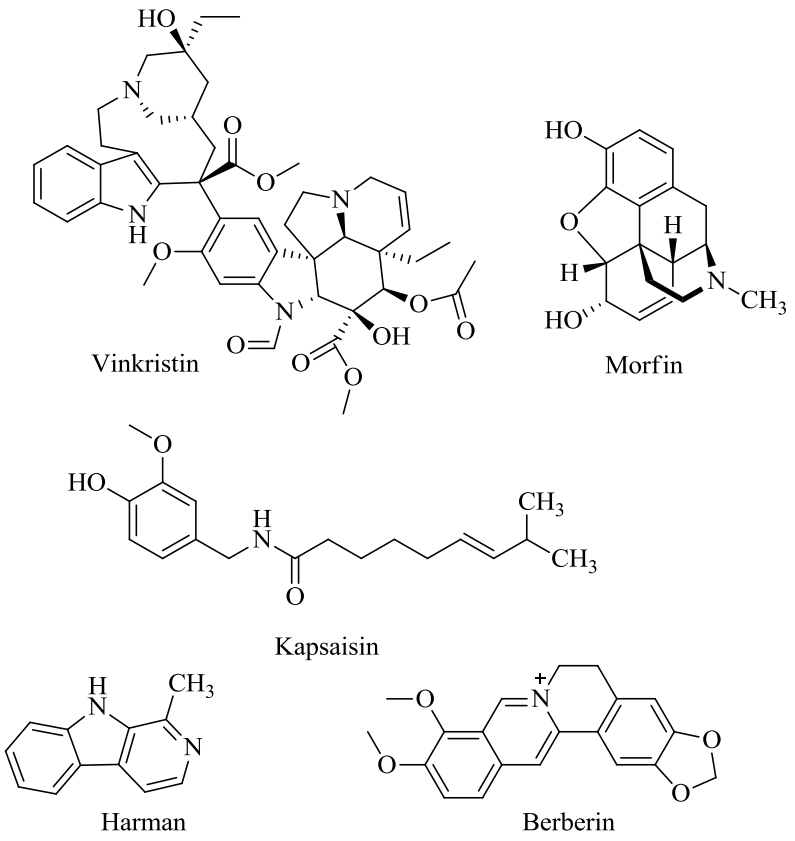
ve virüslere karşı aktivite gösterirler. Güçlü bir antikanser ilaç olan taksol bir terpen yapısındadır. (Ayoola 2008) (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. Bitkilerde bulunan bazı genel terpenoidler

1.15.7. Alkoloidler

Alkolidler heterosiklik azot bileşikleridir. Alkolidler tıbbi olarak kullanılan bitki sekonder metabolitlerinin en önemli sınıfıdır. Hücre membranını hızlı bir şekilde geçebilme yeteneklerinden dolayı güçlü farmakolojik etki gösterirler Berberin gibi aromatik quarterner alkoloidler DNA ile interkalasyon yaparak aktivite gösterirler. (Davis 1998). Nikotin, fizyolojik bağımlılık yapan önemli ticari bir alkoloiddir. Kafein, çay ve çikolata merkezi sinir sisteminde uyarıcı etkiye sahip alkoloidlerdir. Afyon bitkisi morfin ile birlikte 25'in üzerinde alkoloid içerir ve çok etkili ağrı kesicidir. Vinkristin ve vinblastin güçlü antineoplastik etki gösteren alkolidlerdir, Hodkins hastalığının ve diğer lenfomaların tedavisinde kullanılır. (Kittakoop 2014) (Şekil 1.27.).



Şekil 1.27. Farmakolojik olarak aktif olan bazı alkoloidlerin kimyasal yapıları

1.16. Çalışmanın Amacı, Önemi ve Hedefleri

1. Bu tez çalışmasının amacı halk arasında hipoglisemik olarak yaygın kullanılan *Juglans regia (ceviz yaprağı), Teucrium polium (acıyavşan, meryemhort), Piperis longum (darıfülfül), Rheum ribes (uçkun ,ışgın), Apium graveolens (kereviz tohumu), Artemissia absinthium (acı pelin otu) Cuscuta babylonica (mardin küşütü), Artemissia millefolium (civanperçemi)* bitkilerinin etanol:su (1:1) ekstraktlarının antioksidant ve antidiyabetik etkilerini araştırmaktır.

2. Diyabette okdidatif stresin artmasıyla serbest radikallerin miktarında artış meydana gelmektedir. Oluşan radikallerin söndürülmesi glikasyonun önlenmesinde ve diyabetin komplikasyonlarının azaltılmasında önemli bir yaklaşımdır. Bundan dolayı bu çalışmada öncelikli hedef olarak tüm bitkilerin serbest radikalleri söndürme ve antiosidant etkileri araştırıldı. Yapılan tüm antioksidant parametreler sonucunda *J. regia* ve *T. polium* bitki ekstraktlarının, çalışmada kullanılan diğer bitki ekstraklarına kıyasla daha güçlü antioksidant aktivite gösterdiği tespit edildi. Bu sebeple; tez çalışmasının

esas kısmını oluşturan anti-glikasyon ve antidiyabetik aktivite çalışmaları bu iki bitki ekstraktı seçilerek yapıldı.

3. Tip II diyabettin tedavisindeki terapötik yaklaşımlardan birisi sindirim organlarında bulunan α-amilaz ve α-glukozidaz gibi karbohidrat hidroliz enzimlerini inhibe ederek glukozun absorpsiyonunu yavaşlatmaktır. Bu nedenle, yeni farmokolojik ajanlar geliştirmek için yapılan çalışmalar, α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonu üzerinedir. Bu amaçla, tez çalışmasında *J. regia* ve *T. polium* bitki ekstraktlarının α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı.

4. Bitkisel drogların içerdikleri maddelerin etkinlik alanlarının saptanabilmesi için, etkin madde gruplarının özelliklerinin bilinmesi gerekir. Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşenlerin HPLC (High performance liquid chromatograpy) analizleri yapıldı.

5. Bazı ilaç öncü maddelerinin, bitkisel droglardan, sentetik olanlara göre daha ucuz ve kolay elde edilebilmesi ve daha az yan etkilere sahip olmasından dolayı bu çalışma ile doğal kaynaklardan yeni AGE inhibitörlerinin keşfi hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ardestani ve ark (2007); *Cyperus rotundus* (topalak) türünün BSA-fruktoz sisteminde protein glikasyonunu önleme etkisini araştırdılar. BSA fruktoz ile bitki ektraktlarının varlığında ve yokluğunda inkübasyona bırakıldı. Örnekler, 14 gün inkübasyon sonunda bağlanmamış şekerleri ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için fosfat tamponuna karşı diyaliz edildikten sonra total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de yayılma floresansları kullanılarak ölçüldü. Pozitif kontrol olarak aminoguanidin kullanıldı. *C. rotundus* ektraktının (25-250 μg/ml) AGE oluşumunu azalttığını gözlemlediler (IC_{50}=32 μg/ml). Ekstrakt 25, 50, 100 ve 250 μg/ml konsantrasyonda sırasıyla % 39.9, %54.1, %68.3 ve % 82.2 inhibisyon gösterdi.

Hsieh ve ark. (2007) *Rosmarinus officinalis* (biberiye) ekstraktının kardiyovasküler hastalıklarda ve nörodejeneratif bozukluklarda olası glikasyon önleyici rolünü araştırdılar. Metilglioksal kaynaklı kollajen glikasyon model sisteminde biberiye ekstraktının, AG'e eşdeğer antiglikasyon aktivite gösterdiğini tespit ettiler. Aynı zamanda LDL oksidasyonunu ve glukoz kaynaklı glikasyonu inhibe ettiğini ileri sürdüler.

Kwon ve ark (2008); *Solanum melongena* (patlıcan) türünün α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkisini araştırdılar. α-Amilaz inhibisyon testini pankreatik α-amilaza karşı, α-glukozidaz inhibisyon testini ise hem yeast α-glukozidaza karşı hem de intestinal α-glukozidaza karşı denediler. *S. melongena* α-amilaza karşı ılımlı inhibisyon etki gösterirken, α-glukozidaza karşı yüksek inhibisyon etki gösterdiğini ileri sürdüler.

Peng ve ark (2008), farklı çözücülerle hazırlanmış tarçın kabuğu ekstraktlarının antiglikasyon aktivitesini araştırdılar ve etil asetat ekstraktının en iyi antiglikasyon aktivite gösterdiğini belirtiler. Etil asetat ekstraktından, CML ve pentosidin oluşumunu inhibe eden katekin ve prosiyanidin B2 fraksiyonlarını elde ettiler. Prosiyanidin B2'nin RCS söndürücü olduğunu ve AG ile benzer mekanizmayla glikasyonu önlediğini ileri sürdüler.

Adediwura ve ark (2009); *Spondias mombin* türünün metanol, kloroform, dietileter extraktlarının antidiabetik aktivitelerini araştırdılar. α-Amilaz inhibisyon etkisini Bernfield metodu ile test ettiler. En yüksek inhibisyon etkiyi dietileter fraksiyonu gösterdi (70 mg/ml konsantrasyonda %73 inhibisyon etki). Daha sonra kolon kromotografisine ile bu fraksiyondan ve beş alt fraksiyon elde edildi. Bu alt fraksiyonların α-amilaz inhibisyon etkisine tekrar bakıldı ve fraksiyon I'in 70 mg/ml konsantrasyonda % 67 inhibisyon gösterdiği bulundu. Preperatif TLC ile fraksiyon I tekrar saflaştırılıp ve aktif ürün 3β-olean-12-en-3-yl(9Z)-hexadec-9-enoate (20 mg/ml konsantrasyonda % 57 inhibisyon etki) izole edildi (Adediwura ve ark. 2009).

Kim ve ark (2009); *Aloe vera* jelin, Tip II Diabet (insüline bağımlı olmayan diyabet) üzerine etkisini fare modelinde araştırdılar. Fareler yüksek yağlı diyetle obez haline getirilip, kan glikoz seviyeleri 180 mg/dl 'in üzerine çıkartıldı daha sonra oral yolla *aloe vera* jel farelere 8 hafta boyunca verildi. Sürenin sonunda farelerin kan glukoz konsantrasyonunun normal seviyeye düştüğünü gözlemlediler. Aynı zamanda *Aloe vera* jel plazma insülin düzeyini azalttığı ve karaciğerde TAG seviyesini düşürdüğünü tespit ettiler.

Nickavar ve ark (2009); Üç farklı dut türünün (*Morus alba, Morus alba* var. *nigra, Morus nigra*) yapraklarının n-heksan, kloroform ve etil asetat ektraktlarının α-amilaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerini *in vitro* olarak araştırdılar. Pozitif kontrol olarak akarboz kullanıldı. Her iki türün de (*Morus alba, Morus alba* var. *nigra)* konsantrasyona bağlı inhibisyon etki gösterdiği ancak en güçlü aktiviteyi *M. alba var. nigra* ekstraktının gösterdiğini tespit ettiler. (IC_{50}=13.26 mg/ml)

Wu ve ark (2009); *Psidium guajava* (hint armudu) bitkisinin yapraklarının BSA-glukoz model sisteminde antiglikasyon etkisini araştırdılar. Guava Asya kıtasında halk arasında hipoglisemik olarak yaygın kullanılan bir çeşit meyvedir. Kurutulmuş yaprakları ile hazırlanan guava çayı oldukça popüler bir içecektir. Antioksidant aktivitesi bilinen guava yapraklarının ekstraksiyonu sonucu gallik asit ve ferulik asit izole edildi. Guava yaprağı ekstraktının 50 μg/ml konsantrasyonda α-dikarbonil oluşumunu % 95 inhibe ettiği aynı zamanda Amadori ürünleri ve AGE oluşumu üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit ettiler.

Chompoo ve ark (2011); *Alpina zerumbet* (zencefil) bitkisinin kök gövdesinin heksan ekstraktından 5,6-dehidrokavain (DK), dihidro-5,6-dehidrokavain (DDK) ve labdadien bileşiklerini izole etmişler ve α-dikarbonil ve fruktozamin oluşumu üzerine inhibisyon etkisini araştırdılar. Labdaienin fruktozamin oluşumuna karşı quercetin ile benzer etki gösterdiğini buldular (IC_{50}=51.06 μg/ml). Aynı zamanda α-dikarbonil bileşiklerinin oluşumu üzerine DK ve DDK'dan daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlediler. Sonuç olarak labdadienin güçlü antiglikasyon aktiviteye sahip olduğunu ve diyabetin komplikasyonlarını önleyebileceğini ileri sürdüler.

Wang ve ark (2011); BSA-fruktoz sisteminde glikasyon derecesini sıcaklığa bağlı olarak çalıştılar. BSA ile fruktoz 50^{o}C'de 24 saat, 37^{o}C'de 168 saat inkübasyona bırakıldı. Floresans yoğunluğunun ve SDS-PAGE ile tespit edilen glikolizlenmiş BSA'nın miktarının zamanla ve sıcaklıkla arttığını tespit ettiler (Şekil 2.1.). Amadori ürünleri ve α-dikarbonil oluşumunun her iki sıcaklıkta da olduğunu ve inkübasyon süresine bağlı olarak artış gösterdiğini gözlemlediler.

Zhang ve Ark (2011) tarafından *Misgurnus anguillicaudatus*' un antioksidant ve antiglikasyon aktiviteleri araştırılmıştır. *M. anguillicaudatus* (MAPs), Çin Japonya ve Kore 'de ve halk arasında diyabet tedavisinde geleneksel ilaç olarak kullanılan yenilebilir bir balık türüdür. MAPs' tan polisakkaritlerin ekstraksiyonu ile dört fraksiyon elde edilip (MAPI, MAPII, MAPIII ve MAPIV) ve bu polisakkarit fraksiyonlarının hidroksi radikali ve süperoksit radikalini söndürme aktiviteleri araştırılıp, en iyi aktiviteyi MAPIV fraksiyonunun gösterdiği belirtiliyor. Aynı zamanda bu fraksiyonların BSA (20 mg/ml) ve glukoz (0.5 M) glikasyon sisteminde α-dikarbonil ve fruktozamin oluşumu üzerine inhibisyon etkisini inceleyip, glikasyona uğramış BSA protein bandını SDS-PAGE protein jel elektroforezi ile tespit ettiler. Aminoguanidin ile kıyaslandığında en iyi aktivitenin MAPIV ekstraktına ait olduğu belirtilmektedir. Diyabet komplikasyonlarında oksidayon ve glikasyon ilişkili olduğu için MAPs 'ın diyabet tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmektedirler.

Joglekar ve ark (2014); *Cuminum cyminum* yapısında bulunan bir monoterpen olan *p*-cymene'i diyabetik sıçanlara 60 gün boyunca verdiler (20 mg cymene/kg). Cymene verilen sıçanlarda plazma HbA1c seviyesinin ve serum fruktozamin seviyesinin normale düştüğü gözlemlendi. Aynı zamanda *in vitro* çalışmalarda cymene

(100 μM) total AGE floresans ölçümünü ve pentosidini sırasıyla % 56.6 ve % 57 inhibe ettiği görüldü. Joglekar ve arkadaşları, cymene'nin glikasyon kaynaklı diyabet komplikasyonlarını önleyebileceğini ileri sürdüler.

Aufa ve ark (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada *Plectocomiopsis geminiflora* (lalis) ve *Eugeissona insignis* (pantu) türü palmiye ağaçlarının göbeğinden elde edilen ve salatalarda kullanılan Palm hearts olarak adlandırılan sebzelerin antioksidant ve antidiabetik etkisi araştırılıp HPLC ile kimyasal analizi yapıldı. Örneklerin ekstraksiyonu % 70'lik etanol ile yapıldıktan sonra total fenolik ve total flavanoid bileşen miktarlarına bakıldı ve total antioksidant kapasitesi FRAP (Fe iyonunu indirgeme gücü) ve ORAP (oksijen radikalini absorplama kapasitesi) testleri ile belirlendi. Lalis ektraktının oldukça yüksek fenolik bileşen miktarına (2505 mg GAE/100 g dw) karşın pantu ekstraktının yüksek flavanoid miktarı (11 mg RE/100 g dw) dikkat çekmektedir. Lalis ve pantu ekstraktının antidiabetik özellikleri, α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerine bakılarak araştırıldı. Her iki ekstraktın da % 50'nin üzerinde α-amilaz enzim inhibisyonu ve % 45'ten daha az α-glukozidaz enzim inhibisyonuna sahip olduğunu tespit ettiler.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Bitki Türleri

Bu tez çalışmasında, halk arasında antidiyabetik olarak kullanılan *Juglans regia* L. (ceviz yaprağı), *Teucrium polium* L. (acıyavşan, meryemhort), *Piperis longum* L (darıfülfül), *Rheum ribes* (uçkun, ışgın), *Apium graveolens* L (kereviz tohumu), *Artemissia absinthium* L. (acı pelin otu), *Cuscuta babylonica* Aucher ex Choisy (mardin küşütü), *Artemissia millefolium* L. (civanperçemi) bitkileri kullanıldı (Resim 3.1.). Bitki örnekleri Diyarbakır'da yerel bir aktardan temin edildi ve Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. A. Selçuk ERTEKİN tarafından teşhisleri yapıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Gallik asit (Sigma-Aldrich), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (Sigma-Aldrich), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) (Sigma-Aldrich), quercetin (Fluka), trolox (Sigma-Aldrich), folin&ciocalteu's fenol reaktifi (Merck), sodyum karbonat (Sigma-Aldrich), demir-II-klorür (Riedel-de-Haen), demir-III-klorür (Merck), etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich), ferrozin (Fluka), ferrisiyanit (Merck), trikloroasetikasit (TCA) (Sigma-Aldrich), deoksiriboz (Sigma-Aldrich), 2-tiyobarbitürik asit (TBA) (Fluka), sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich), askorbik asit (Merck), agaroz (Sigma-Aldrich), akrilamid/bisakrilamid (Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich), tris base (Sigma-Aldrich), comassie brillant blue R (Sigma-Aldrich), tetrametiletilenediamin (TEMED) (Sigma-Aldrich), α-amilaz, Type II-A:from Basillus species (Sigma-Aldrich), α-glukozidaz, Type I: from Bakers Yeast (Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil-α-D-glukopiranozid (Sigma-Aldrich), 3,5-dinitrosalisilik asit (Sigma-Aldrich), sodyum potasyum tartarat (Sigma-Aldrich), sodyum format (Sigma-Aldrich), akarboz (Sigma-Aldrich), metformin (Sigma-Aldrich), aminoguanidin (Sigma-Aldrich), D-fruktoz (Sigma-Aldrich), D-riboz (Sigma-Aldrich), D-glukoz (Sigma-Aldrich), nişasta (Sigma-Aldrich), glioksal (Sigma-Aldrich), griard's reagent T (Sigma-Aldrich).

Resim 3.1. Tez çalışmasında kullanılan bitkiler



Artemisia absinthium L.



Juglans regia L.



Teucrium polium L.



Achillea millefolium L.



Apium graveolens L.



Rheum ribes L.



Piper longum L.



Cuscuta babylonica

3.1.3. Kullanılan Aletler

Jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Quantity One programı, 4.5.2 versiyonu), Yatay DNA elektroforez (Biorad), Dikey SDS-PAGE elektroforez (Biorad) güç kaynağı (Biorad-power PAC 3000), UV-visible, Cary 100 spekrometre (Varian), santrifüj (Universal 320R Hettich), santrifüj (mini spin plus-eppendorf), vorteks (Heidolph), sterilizatör (Heraeus), liyofilizatör (christ, alpha 2-4 LD), otoklav (Hirayama-HV-502), çalkalayıcı (Memmert), terazi, pH metre (Mettler Toledo), çeker ocak, vakumlu evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), membran filtresi (Schleicher&Schuell), blender, -20 derin dondurucu (Sanyo), mikrodalga fırın ve buzdolabı (Arçelik) cihazları ve ekipmanlarıkullanıldı.

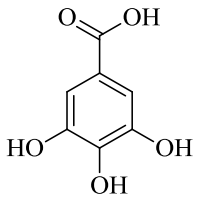
3.2. METOT

3.2.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri tüm kısımlarıyla birlikte blender yardımıyla iyice toz haline getirildikten sonra etanol-su karışımı (1:1) kullanılarak Soxhlet ile 6 saat ekstrakte edildi. Daha sonra çözücü evapore edildi geriye kalan su fazı liyofilize edilerek bitki ekstraktları hazırlandı (Tablo 4.1.) (Rubilar ve ark. 2011).

3.2.2. Total Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşen miktar tayini Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre tayin edilip, standart olarak gallik asit (Şekil 3.1.) kullanıldı. Bu yöntemin dayandığı temel prensip gallik asit içindeki fenolik bileşen miktarını gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktları içindeki toplam fenolik bileşen miktarını gallik asite eşdeğer olarak hesaplamaktır (Chandler 1983).



Şekil 3.1. Gallik asitin yapısı

Gallik asitin 5 mg/ml'lik stok çözeltisi hazırlandı, bu stok çözeltide 50-500 µg/ml konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çalışılan tüm bitki ekstraktlarının 1 mg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan gallik asit ve ekstrakt çözeltilerinden 40 µl alınıp, üzerlerine 1160 µl saf su ve 200 µl folin&ciocalteu's fenol reaktifi (2.0 N) ilave edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve üzerlerine 600 µl % 20'lik sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra 765 nm'de UV cihazında absorbans değerleri okundu.

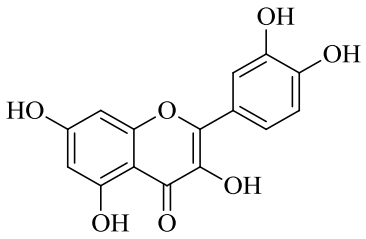
Gallik asitin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0{,}00222 \times \text{gallik asit (µg)} \; (R^2: 0.99)$$

Bu eşitlik kullanılarak her bir ekstraktın içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı (tablo 4.2).

3.2.3. Toplam Flavonoid Bileşen Miktar Tayini

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının toplam flavonoid bileşen miktar tayini Zhishen ve ark. (1999) tarafından tanımlanan yöntem ile tayin edildi. Standart olarak quercetin kullanıldı (Şekil 3.2). Bu yöntemin dayandığı temel prensip quercetin içindeki flavonoid bileşen miktarını quercetinin artan konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirip, bitki ekstraktları içindeki toplam flavonoid bileşen miktarını quercetine eşdeğer olarak hesaplamaktır.



Şekil 3.2. Quercetinin yapısı

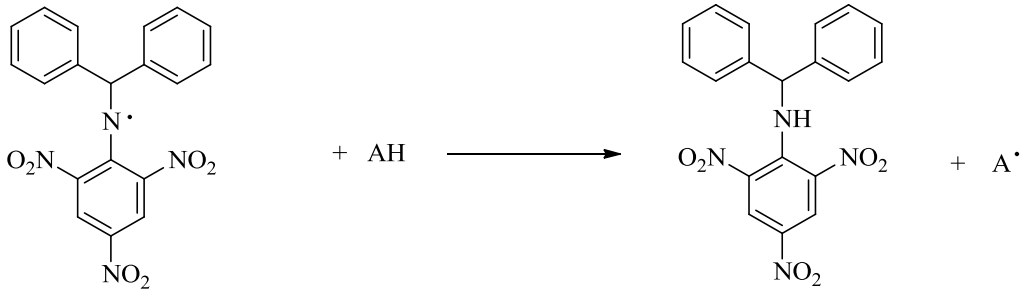
Quercetinin metanol içindeki 100 µg/ml'lik stok çözeltisinden 1, 5, 10, 15, 20 , 25, 50, 75, 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Çalışılan tüm bitki ekstraktların 0.5 mg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. 1 ml quercetin ve 1 ml ekstrakt alınıp üzerlerine 0.1 ml % 10'luk Alüminyum (III) nitrat, 0.1 ml 1M potasyum asetat ve 3.8 ml metanol eklendi. Reaksiyon karışımı su banyosunda 25 ^{o}C'de 40 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 415 nm'de UV cihazında absorbans değerleri okundu. Quercetinin artan konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi ve aşağıdaki eşitlik elde edildi.

$$\text{Absorbans (A)} = 0.028 \times \text{quercetin (µg)} \quad (R^2 = 0.9999)$$

Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktlarını içerdiği toplam flavonoid bileşen miktarı quercetine eşdeğer (QUE) olarak hesaplandı (Tablo 4.2.).

3.2.4. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest ve kararlı bir radikal olup bir elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkanı sağladığından daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Gulçin ve ark. 2004). Bu metot absorbansın azalması temeline dayanır. DPPH üzerindeki ortaklanmamış elektron görünür bölgede 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Antioksidant molekül ile DPPH arasındaki reaksiyon DPPH'in ortamdaki derişiminin azalmasına yani absorbansın düşmesine neden olur. Sonuçta oluşan yapı radikalik olmayan DPPH-H'dır (Şekil 3.3.). Bu olay reaksiyon karışımının renginin mordan sarıya dönmesiyle gözlenir.



Şekil 3.3. DPPH radikalinin indirgenmesi

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 50-500 µg/ml konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. % 96'lık etanol içinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı. Seyreltilen bitki ekstraktlarından 3 ml alınarak üzerlerine 0.1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı daha sonra 517 nm'de UV cihazında absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanıldı. Negatif kontrol bitki örneği veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.3.) (Dorman ve Hiltunen, 2004).

$$\% I = [(A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100$$

3.2.5. İndirgeme Gücü

Fenton reaksiyonunda Fe^{2+}, H_2O_2 ile reaksiyona girerek, biyomoleküler üzerinde hasara neden olan hidroksi radikalini oluşturur. Fe^{2+}, Fe^{3+}'e yükseltgenir. Birçok indirgen tarafından demirin yükseltgenmiş formu (Fe^{3+}), indirgenmiş formuna (Fe^{2+}) dönüşür ve bu olay hidroksi radikallerinin oluşumunun artmasına neden olur (Tian ve Hua, 2005).

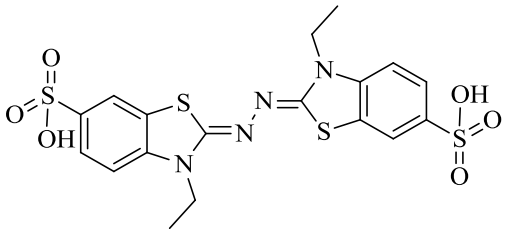
Bu metotta çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücüne bakıldı. Bitki ekstraktlarının 1 mg/ml'lik stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltilerden 50-250 µg/ml konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan çözeltilerden 1 ml alınıp üzerlerine 2.5 ml, fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) ve 2.5 ml, % 1'lik potasyum ferrisiyanit ilave edildi ve reaksiyon karışımı 50 ºC su banyosunda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışıma 2.5 ml, %10'luk TCA eklendi ve 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Üst tabaka çözeltisinden 2.5 ml alınıp üzerine 0.5 ml, % 0.1'lik $FeCl_3$ çözeltisi ilave edildi ve karışım 37 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 700 nm'de UV spektrofotometrede absorbans ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir (Wang ve ark. 2003) (Şekil 4.4.).

3.2.6. ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının radikal süpürme etkisi ABTS radikal katyonun (Şekil 3.4.) renksizleştirilmesi deneyi ile belirlendi (Kumar 2005). ABTS çözeltisi (7 mM) ve potasyum persülfat çözeltisi (2.45 mM) saf su içinde hazırlanıp karıştırıldı (v/v). ABTS stok çözeltisine potasyum persülfat eklenince ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\cdot+}$) oluşur. Bu karışım kullanılmadan önce oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletildi. ABTS ve potasyum persülfat stokiyometrik olarak 1:0.5 (mol/mol) oranında etkileşirler, bunun sonucu olarak ABTS eksik oksidasyona uğrar. Tepkime ortamında ABTS'nin oksidasyonu hemen başlar fakat 6 saatten önce absorbans maksimum değere ulaşmaz ve oluşan radikal kararlı değildir. Radikal oda sıcaklığı ve karanlıkta iki günden daha uzun süre kararlıdır (Kumar 2007). Stok çözeltiyi kullanmadan önce, 734 nm' de 0.70 (±0.02) absorbans değerine ulaşacak şekilde etanol ile seyreltildi. 30 ^{o}C'de 6 dakika bekletildikten sonra dengeye ulaştı.

Seyreltilmiş ABTS çözeltisinden 1.9 ml alınıp, 100 µl bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 µl) ile karıştırılıp, 6 dk karanlıkta bekletildikten sonra 734 nm' de absorbans ölçüldü. Trolox, Askorbik asit, Quercetin ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı. Örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Şekil 4.5.)

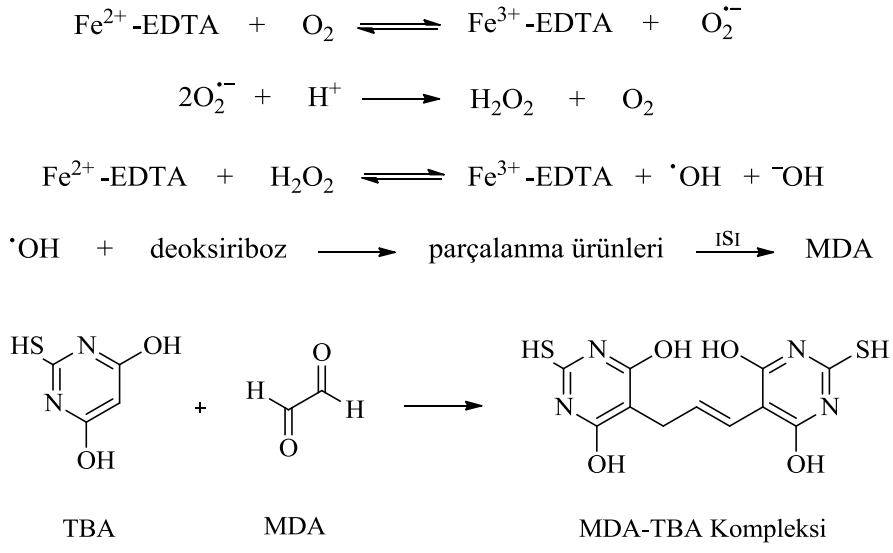
$$\% I = [(A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100$$



Şekil 3.4. ABTS'nin yapısı

3.2.7. Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının deoksiriboz metodu ile Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Bu yöntem bazı eşitliklere dayanır (Şekil 3.5.). Hidroksi radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Wang ve ark., 2003) (Yen ve Hsieh 1998).



Şekil 3.5. Deoksiriboz metodu ile TBA-MDA kompleksinin oluşumu.

Reaksiyon karışımı sırasıyla 100 µl 1 mM EDTA, 10 µl 0,1 mM $FeCl_3$, 100 µl 50 mM H_20_2, 360 µl 2,8 mM deoksiriboz, 1 ml ekstrakt (50-500 µg/ml), 330 µl 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu ve 100 µl 0,3 mM askorbik asit içermektedir. Karışım 37 ºC'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 ml alınıp üzerine 1 ml % 10'luk TCA ve 1 ml % 0.5'lik TBA (0.025 M NaOH içinde % 0.025 BHA içerecek şekilde hazırlandı) ilave edildi. Daha sonra 100 ºC'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon örnekleri buzda soğutulduktan sonra 532 nm'de UV spektroskopide absorbans değerleri ölçüldü (Mazumder ve ark. 2005). Pozitif kontrol BHT ve BHA kullanıldı. Negatif kontrol, ekstrakt ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.6.).

% İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Kumar 2005).

$$\% I = [(A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100$$

3.2.8. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM) tarafında etik kurul alınmış Wistar Albino dişi (♀) sıçanlardan alınan karaciğer üzerinde bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesine bakıldı.

3.2.8.1. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

150 g ağırlığındaki Wistar Albino dişi (♀) sıçanın karaciğeri önce iyice ezildi sonra fosfat tamponu (120 mM KCl içeren 50 mM, pH 7.4) içinde sonikatörde homojenize edildi. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant -20 ºC'de saklandı (Song ve ark. 2003).

Hazırlanan karaciğer homojenatından (süpernatant) 200 µl alındı üzerine sırasıyla 200 µl bitki ekstraktı (50-500 µg/ml), 200 µl $FeCl_3$ (0.1mM), 200 µl EDTA (0.1 mM), 200 µl H_2O_2 (2.5 mM) ve 200 µl askorbik asit (0.3 mM) ilave edildi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 37 ºC'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışım üzerine 500 µl %28'lik TCA ve 380 µl TBA (0.025 M NaOH içinde % 0.025 M BHA içerecek şekilde hazırlandı) ilave edildi ve 100 ºC'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon karışımı buz üzerinde soğutulduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Son olarak 532 nm'de UV spektrofotometresinde absorbans ölçüldü (Lo

ve Cheung, 2005). Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanıldı. Negatif kontrol, sadece bitki ekstraktı ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.7.).

% İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% I = [(A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}] \times 100$$

3.2.9. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroforez tekniği de bu prensibe dayanır. Nükleik asit parçalarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir.

Hidrojen peroksitin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan hidroksi radikalinin pBluescript M13+ plazmid DNA üzerine etkisi Agaroz Jel Elektroforezi ile incelendi. Bitki ekstraktlarının 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında DNA'yı hidroks radikaline karşı koruma etkisine bakıldı. Agaroz (1 g), 100 ml Tris asetat tamponu (40 mM tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2) içinde mikrodalga fırında kaynatılarak hazırlandı. Jel karışımı 60^{o}C'ye soğutulduktan sonra 1.5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edilerek cam tabakaya döküldü. Hazırlanan DNA örnekleri bir pipet ile kuyucuklara yüklendi. Jel 200 ml Tris asetat tomponu (40 mM tris asetat, 1mM EDTA, pH 8.2) içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez 40 V'ta 500 mA akım uygulanarak 180 dakika süreyle yürütüldü. Pozitif kontrol olarak BHA ve BHT kullanıldı. Jel fotoğrafları BIO RAD GEL DOC XR görüntüleme sistemi ile çekildi (Şekil 4.8.)

% İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Fukuhara ve Miyata, 1998). (Tablo 4.8.).

$$\% I = 1-[(S_{k+m} - S_c) / (S_k - S_c)]$$

S_{k+m} = DNA'nın kesimi önleyen madde ile etkileştirilmesinden sonra geriye kalan supercoiled formun yüzdesi

Sc = Kontrol DNA'nın supercoiled formunun yüzdesi

Sk = DNA'nın kesimi önleyen madde dışındaki reaksiyon karışımıyla etkileştirilmesi sonucu geriye kalan supercoiled formun yüzdesi

3.2.9.1. Plazmid DNA Saflaştırma

Çalışmada kullanılan pBluescript M13+ plazmid DNA'sı (3.2 kb) Genejet plazmid miniprep kiti kullanılarak saflaştırıldı (Birnboim 1979). pBluescript M13+ plazmid DNA'nın saflığına, hem elektroforez hem de UV spektroskopisinde 260/280 nm absorbanslarının oranı ölçülerek bakıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm absorbans ölçümü ile hesaplandı. (50 μg/ml için A_{260}=1.0)

3.2.10. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Çalışmada kullanılan bitkilerin etanol:su ekstraktlarının protein oksidasyonu üzerine etkisi Wang metodu kullanılarak belirlendi (Wang ve ark. 2011). BSA oksidasyonu Fenton reaksiyonu ile gerçekleştirildi. Bitki ekstraktı (50-500 μg/ml), potasyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7.4), BSA (1 mg/ml), $FeCl_3$ (1 mM), H_2O_2 (2.5 mM), EDTA (3 mM) ve askorbik asit (1 mM) içeren reaksiyon karışımı (1.2 ml), 3 saat 37°C'de inkübe edildi.

BSA'nın oksidatif hasarı SDS-PAGE elektroforezi (%10 poliakrilamid jel, % 0.1 SDS içeriyor) ile tespit edildi. İnkübasyon örneklerinden 5 μl alınarak aynı miktarda örnek yükleme tamponu (0.5 M Tris HCl pH=6.8, 10% SDS, 5 % 2-merkapto etanol, 20% gliserol ve 5% bromofenol mavi) ile karıştırıldı ve örnekler 100 ^{o}C'de 5 dk kaynatıldı. Her örnekten 5 μl alınıp jele yüklendi. Jel BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak her jel için 35 mAmp ve 500 volt da yürütücü tampon içinde (Tris base, glisin, SDS) BioRad tankında yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller %15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 1 saat süreyle renklendirildikten sonra boya çıkarma solüsyonu (su:metanol:glasiyel asetik asit: 6:3:21 v:v:v) içinde bekletilerek boya uzaklaştırıldı.

3.2.10.1. Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması

Protein hasarının miktarını ve band yoğunluğunu belirleme jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantlar Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grubuyla standardize edildi. Sonuçlar üç farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

3.2.11. *In vitro* olarak BSA'nın Glikasyonu

3.2.11.1. BSA'nın Glukoz ile Glikasyonu

BSA (60 mg/ml) ve glukoz (1.5 M) sırasıyla 0.2 M pH: 7.4, 0,06 % sodyum azid içeren fosfat tamponu içinde hazırlandı. İnkübasyon karışımı 100 µl BSA çözeltisi, 100 µl glukoz çözeltisi ve 100 µl saf su içerecek şekilde cam tüplerde bitki ektraktlarının ve pozitif kontrollerin varlığında ve yokluğunda 37ºC'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon karışımından 0, 7, 14 ve 21. günlerde örnekler alındı. Alınan örneklerden bağlanmamış şekerleri ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için örneklere eşit miktarda soğuk TCA (10 %) eklenerek +4 ºC'de 15.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Supernatant döküldü, pellet 2 kez TCA ile yıkandıktan sonra fosfat tamponunda çözüldü ve -20ºC' de saklandı. Pozitif kontrol olarak Aminoguanidin (AG) ve Quercetin (QUE) kullanıldı **(**Yamaguchi ve ark. 2000).

3.2.11.2. BSA'nın Glioksal (GO) ile Glikasyonu

BSA'nın GO ile glikasyonu incelendi. BSA (20 mg/ml) ve GO (1 mM)) fosfat tamponu (0.2 M pH: 7.4, % 0.2 M pH: 7.4, 0,06 % sodyum azid içeren) içinde hazırlandı. İnkübasyon karışımı 100 µl BSA çözeltisi, 100 µl GO çözeltisi ve 100 µl saf su içerecek şekilde cam tüplerde 37 ºC'de inkübasyona bırakıldı. (Ho ve ark. 2010). Pozitif kontrol olarak AG kullanıldı. İnkübasyon karışımından 0, 7, 14 ve 21. günlerde örnekler alındı. Bağlanmamış şekerleri ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak için örneklere eşit miktarda soğuk TCA (10 %) eklenerek +4 ºC'de 15.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Supernatant döküldü, pellet 2 kez TCA ile yıkandıktan sonra fosfat tamponunda çözüldü ve -20 ºC' de saklandı.

3.2.1.3. Total AGE Floresans Ölçümü

AGE ürünlerinin tayini spektroflurometrik ölçüme dayanır. Total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de yayılma floresansları kullanılarak ölçüldü. (Ardestani ve Yazdanparast 2007) (Şekil 4.10.1.). AGE inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (4.10.1.4.)

$$\% I = [(F_{Kontrol} - F_{örnek}) / F_{Kontrol}] \times 100$$

(F_{kontol}: İnhibitör içermeyen örneğin floresans değeri $F_{örnek}$: İnhibitör içeren örneğin floresans değeri)

3.2.11.4. Fruktozamin Testi

Fruktozamin assay kalorimetrik bir testtir. Alkali çözeltide serum proteinlerinin glikasyon derecesi ölçülerek belirlenir. Amadori bileşikleri nitro blue tetrazolyumu (NBT) indirgeyerek mor renkli tetrazinol radikal ($NBT^{+\cdot}$) ürününü meydana getirirler.

Fruktozamin testi biraz modifikasyonla Baker (1994) metoduna göre yapıldı. Glikolizlenmiş materyal (0.2 ml), sodyum karbonat tamponu (100 mM, pH 10.35) içinde hazırlanmış nitro blue tetrazolyum (0.8 ml) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı ve 530 nm absorbans okundu. AG ve QUE pozitif kontrol olarak kullanıldı (Chompoo ve ark. 2011) (Şekil 4.10.1.).

3.2.11.5. α-Dikarbonil Bileşiklerinin Tayini

BSA-glukoz sisteminde inkübe edilen örneklerde ki α-dikarbonil bileşik miktarını Griard-T metodu ile belirlendi. Glikolizlenmiş materyalden yaklaşık 20 µl alınıp 80 µl saf su ve 50 µl Griard-T reaktifi ve 850 µl sodyum format (pH:2.9) ile test tüpünde karıştırıldı ve 25 ^{o}C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 290 nm'de absorbans okundu. AG ve QUE pozitif kontrol olarak kullanıldı (Chompoo ve ark. 2011) (Şekil 4.10.2.).

3.2.11.6. Protein Glikasyonunun SDS-PAGE Karakterizasyonu

BSA-glukoz sisteminde inkübe edilen örneklere SDS-PAGE protein jel elektroforezi uygulandı. 100 µl inkübasyon karışımına 100 µl SDS-PAGE örnek hazırlama tamponu eklendi. (Örnek hazırlama tamponu; 0.5 M Tris-HCl (pH:6.8), 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) gliserol, 1 % (v/v) 2-merkaptoetanol ve 5 % (w/v) bromofenol mavi içermektedir). Örnekler 100 ^{o}C'de 5 dk kaynatıldı. Her örnekten 5 µl alınıp jele yüklendi. Jel BioRad 1.000/500 güç kaynağı kullanılarak her jel için 35 mAmp ve 500 volt da yürütücü tampon içinde (Tris base, glisin, SDS) BioRad tankında yürütüldü. Bu işlemin sona ermesiyle jeller %15'lik Coomassie parlak mavi R-250 boyası ile 1 saat süreyle renklendirildikten sonra boya çıkarma solüsyonu (su:metanol:glasiyel asetik

asit: 6:3:21 v:v:v) içinde bekletilerek boya uzaklaştırıldı (Wang ve ark. 2011) (Şekil 4.10.3.).

3.2.11.6.1. Band Yoğunluğunun Ölçülmesi ve Grafikle Sunulması

Glikolizlenmiş Proteinin miktarını ve band yoğunluğunu belirleme jel görüntüleme sistemi kullanılarak yapıldı (Gel-Doc-XR; BioRad, Hercules, CA, USA). Jeller üzerindeki bantlar Quantity One Programme sistemiyle belirlendi (version 4.5.2, BioRad). Böylece her bir bandın yoğunluğu hesaplandı ve kontrol grubla standardize edildi. Sonuçlar üç farklı ölçümün ortalaması olarak gösterildi.

3.2.12. α-Amilaz İnhibisyon Testi

J. regia ve *T. polium* ektraktlarının α-amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri Nickavar ve ark. (2008) 'nın yaptığı metoda göre incelendi. Nişasta çözeltisi (0.5 % w/v), 0.25 g patates nişastası 50 ml sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH:6.9, 6.7 M NaCI içeren) içinde 15 dk karıştırılırak ve kaynatılarak hazırlandı. Enzim çözeltisi (0.5 unit/ml) 0.001 g α-amilaz, 100 ml sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH:6.9, 6.7 M NaCl içeren) içinde hazırlandı. renk belirteci; 96 mM 3,5 dinitrosalisilik asit (20 ml), 5,31 M sodyum potasyum tartarat (8 ml), 2M sodyum hidroksit (8 ml) ve 12 ml distile su içerecek şekilde hazırlandı.

1 ml bitki ekstraktı (25-1000 μg/ml) ve 1 ml α-amilaz çözeltisi 25 ^{o}C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 1 ml karışıma 1 ml nişasta çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı 25 ^{o}C'de 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımına 1 ml renk belirteci eklendi, test tüpleri sıcak su banyosunda 85 ^{o}C'de 15 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında soğutuldu. Daha sonra reaksiyon karışımı 9 ml distile su eklenerek seyreltildi ve 540 nm'de absorbans okundu. Pozitif kontrol olarak akarboz kullanıldı. % inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

3.2.13. α-Glukozidaz İnhibisyon Testi

J. regia ve *T. polium* ektraktlarının α-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri Fang ve ark. (2014) 'nın yaptığı metoda göre incelendi Bitki ekstraktının farklı konsantrasyonları (10 μl) alınarak 5 μl α-glukozidaz çözeltisi (2.0 U/ml) ve 620 μl

potasyum fosfat tamponu (0.1 M, pH:6,8) ile 37.5 ^{o}C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra substrat olarak 10 µl *p*-nitrofenil-α-D-glukopiranosid çözeltisi (10 mM) eklenip 37.5 ^{o}C'de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 650 µl, 1 M Na_2CO_3 eklenerek durduruldu. 405 nm de absorbans okundu. Pozitif kontrol olarak akarboz ve metformin kullanıldı. % inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

3.2.14. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS for 12.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar için paremetrik varsayımların gerçekleştiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

3.3. HPLC Cihazı ve Analitik Şartlar

Fenolik bileşiklerin miktarsal analizi için PDA (Photo Diode Array) dedektörlü Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan) LC20A-HPLC model cihaz kullanıldı. Fenolik bileşiklerin ayırımında intersil ODS-3 (C18, 250×4.6 mm, 5.0 m) kolonu kullanıldı. Analiz sonuçları LabSolutions software (version 1.25)' da değerlendirildi. İki fazlı gradient çözücü sistemi kullanıldı.

J. regia ve *T. polium*' un fenolik bileşiklerin HPLC analizi için öncelikle 18 farklı fenolik bileşik standardının ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilerek analiz metodu geliştirildi. Numunelerden 20 mg alınıp 1 ml metanolde çözüldükten sonra, 20 µl çözeltileri HPLC'ye enjekte edildi.

Tablo 3.1. HPLC cihazının analitik şartları

Dereceli Elüsyon Koşulları Zaman	Asetik asit/Su (2/98) Konsantrasyonu	Metanol Konsantrasyonu
0.01. dakika	% 90	% 10
10. dakika	% 75	% 25
20. dakika	% 65	% 35
30. dakika	% 50	% 50
50. dakika	% 25	% 75
60. dakika	%0	% 100
64. dakika	%0	% 100
64.01. dakika	%90	% 10
72. dakika	%90	% 10

Çalışma koşulları:

Dedektör tipi: SPD-M20A Diode Array Dedektör

Hareketli faz: Asetik asit/Su (2/98) ve Metanol

Hareketli faz akışı: 1 ml/dk

Enjeksiyon miktarı: 20 µl.

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Analiz süresi: 72 dakika

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm bitki örneklerinin etanol-su (1:1) ekstraktları hazırlandı ve her bitki için % verim hesaplandı (Tablo 4.1.).

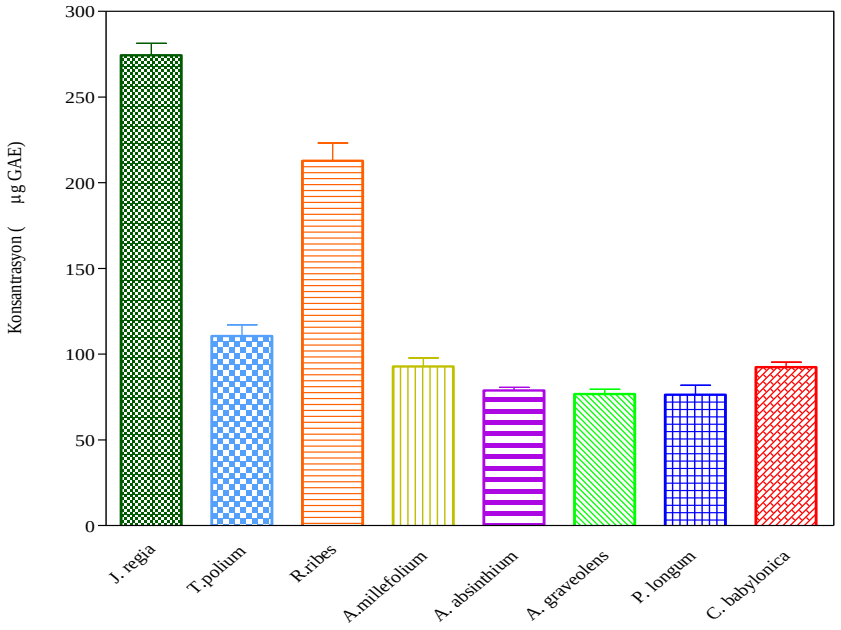
Tablo 4.1. Bitkilerin etanol:su (1:1, v:v) ektraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt miktarları

Bitkiler	**Alınan bitki miktarı (g)**	**Kullanılan çözücü miktarı (ml)**	**Elde edilen ekstrakt miktarı (g)**	**% Verim**
J. regia	50	750	3.45	6.90
R. ribes	50	750	8.94	17.88
T. polium	30	1000	3.41	11.30
C. babylonica	50	750	6.01	12.02
A. graveolens	55	750	16.77	30.40
A. millefolium	20	500	0.73	3.65
P. longum	50	750	2.19	4.48
A. absinthium	20	500	1.15	5.75

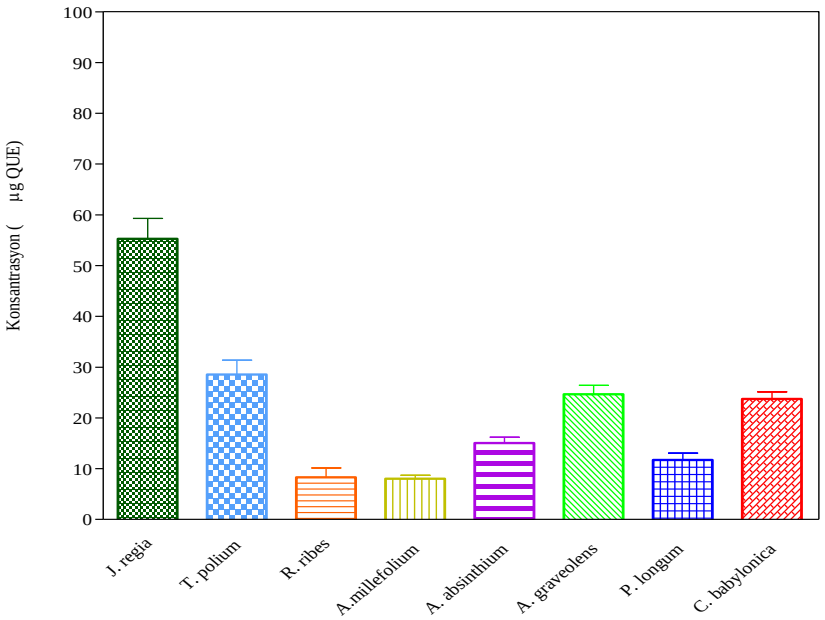
4.2. Total Fenolik ve Flavanoid Bileşen Miktar Tayini

Tablo 4.2. Bitki ekstraktlarının içindeki toplam fenolik ve flavanoid bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

Bitki Ekstraktları	**Gallik asit eşdeğerleri (µg GAE/mg ekstrakt)**	**Quercetine eşdeğerleri (µg QUE/mg ekstrakt)**
J. regia	287.40±8.7	55.2±6.9
R. ribes	233.03±6.36	8.3±3.25
T. polium	114.46±7.41	28.5±4.9
C. babylonica	87.70±1.34	23.7±2.4
A. graveolens	81.60±5.11	24.6±3.04
A. millefolium	70.20±7.01	8.04±1.18
P. longum	68.83±10.5	11.7±2.34
A. absinthium	15.26±5.90	15.03±2.05



Şekil. 4.2.1. Bitki ekstraktlarının içindeki gallik asite eşdeğer toplam fenolik bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

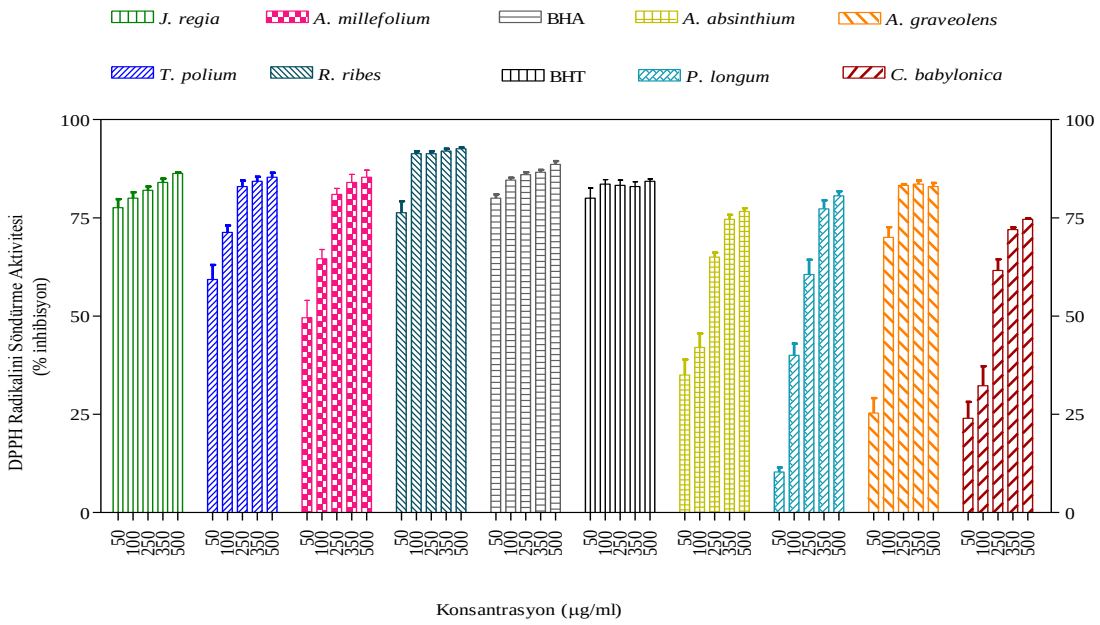


Şekil. 4.2.2. Bitki ekstraktlarının içindeki quercetine eşdeğer toplam flavanoid bileşen miktarları. Her değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.3. DPPH Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının DPPH radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı (Şekil 4.3.).

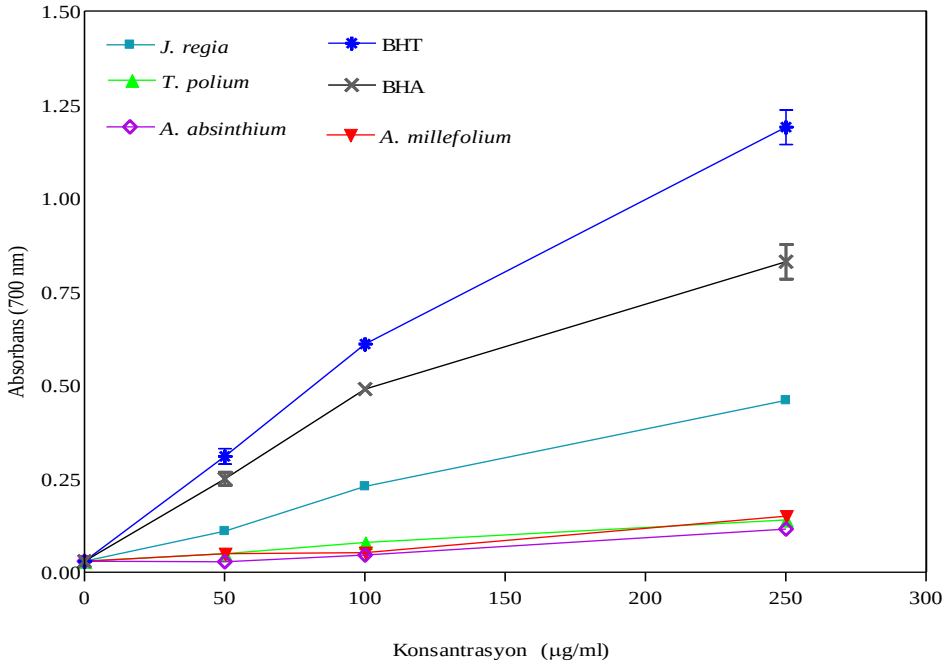
DPPH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *J. regia'*nın DPPH radikalini söndürme aktivitesi % 77.6±3.7–86.3±0.5, *T. polium*; % 59.3±6.4–85.3±2.08, *A. millefolium;* % 49.6±7.63–85.3±3.21, *R. ribes*; % 76.3±5.13–92.6±0.5, *A. absinthium*; % 35.0±6.8–76.6±1.5, *A. graveolens*; % 85.3±3.2–90.3±1.2, *P. longum*; % 0.3±2.8–80.6±2.8, *C. babylonica*; % 24.00±5.2–74.6±0.5.ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 80±1.7–85.2±3.2, BHT ise % 80.3±4.5–84.3±1.15 olarak hesaplandı.



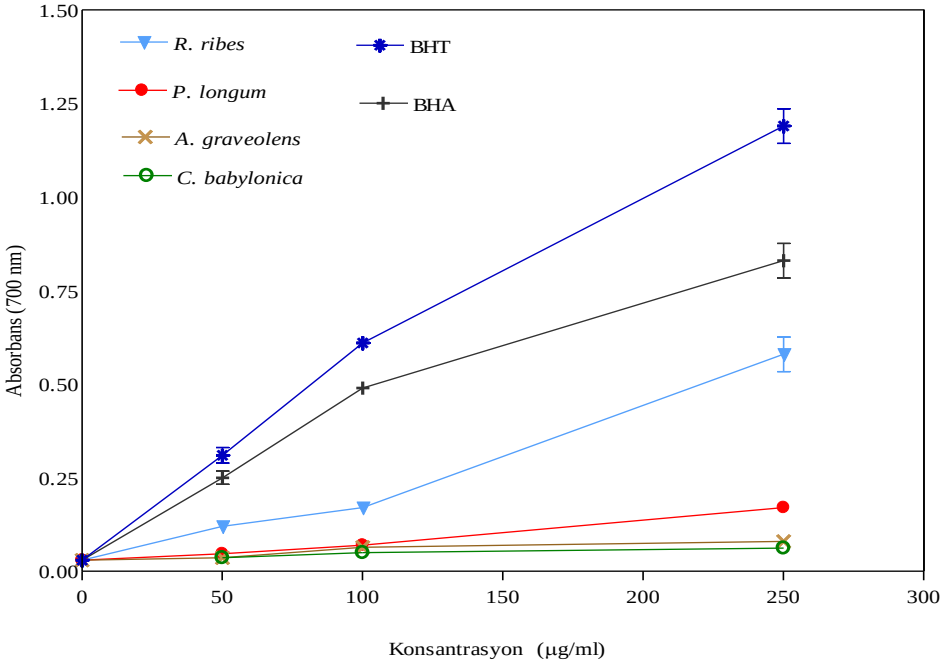
Şekil 4.3. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.4. İndirgeme Gücü

Bitki ekstraktlarının Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücüne bakıldı. İndirgeme gücü konsantrasyona karşı absorbans olarak verildi (Şekil 4.4.1. ve Şekil 4.4.2.). Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücü gösterir.



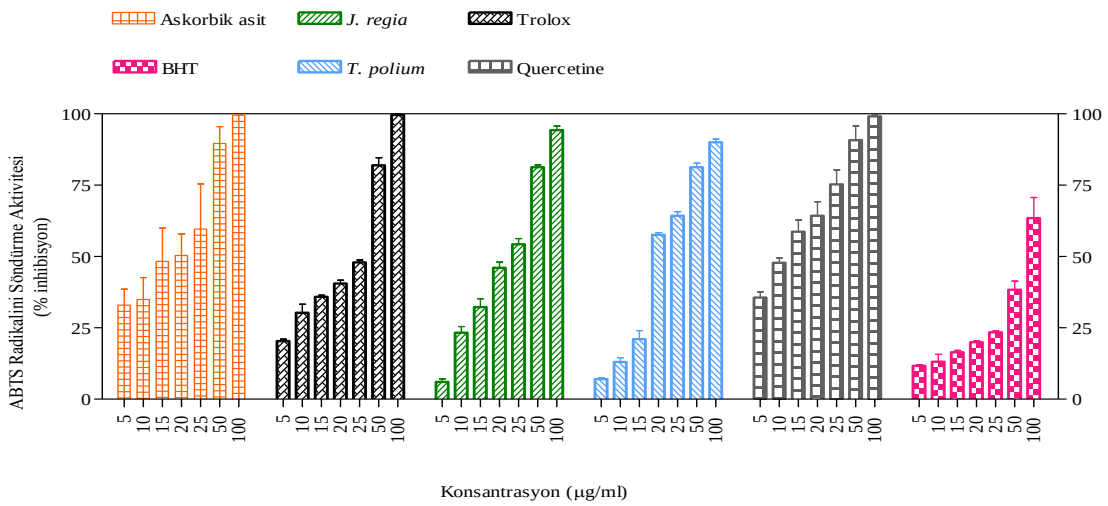
Şekil 4.4.1. *J. regia, T. polium, A. absinthium ve A. millefolium* bitkilerinin etanol:su ekstraktının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



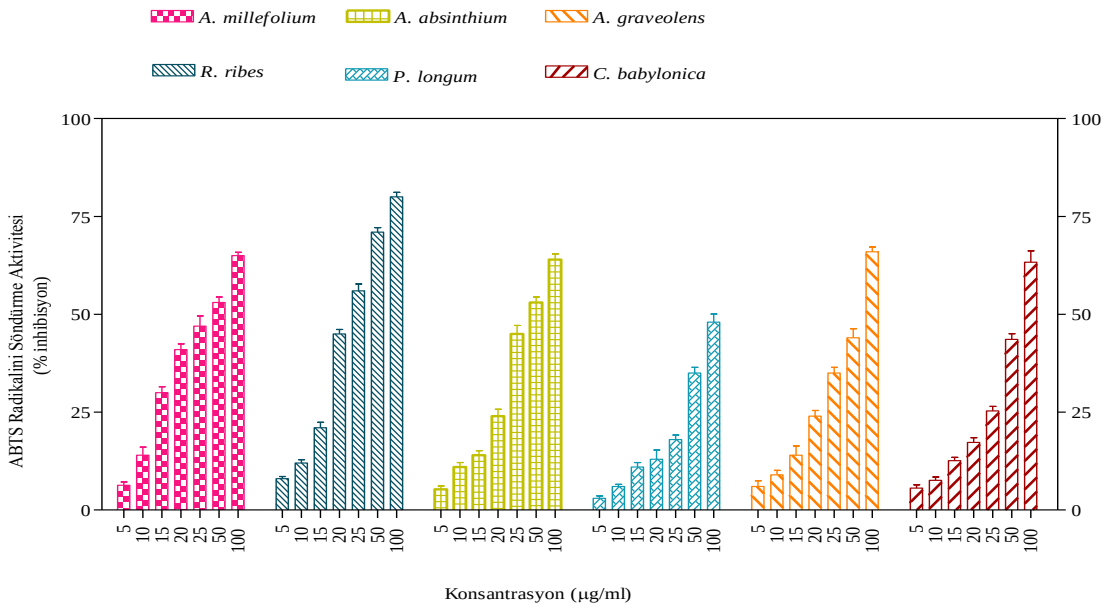
Şekil 4.4.2. *R. ribes*, *P. longum*, *A. graveolens* ve *C. babylonica* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeme gücünün spektrofotometrik olarak analizi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kontrol, ekstrakt veya pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Yüksek absorbans yüksek indirgeme gücünü gösterir. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.5. ABTS Radikalini Söndürme Aktivitesi

ABTS radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı (Şekil 4.5.1. ve Şekil 4.5.2.). Bu konsantrasyon aralığında *J. regia*'nın ABTS radikalini söndürme aktivitesi % 6.00±2.0–94.3±2.5, *T. polium*; % 7.0±1.0–90.0±2.0, *A. millefolium;* % 6.3±1.5–65.6±01.5, *R. ribes*; % 8.0±1.0–80.0±2.0, *A. absinthium*; % 5.3±1.5–64.3±2.5, *A. graveolens*; % 6.6±2.5–66.6±2.08, *P. longum*; % 3.0±1.0–48.0±3.6, *C. babylonica*; % 5.6±1.5–63.3±5.1 ve pozitif kontrol olarak kullanılan Askorbik asit; % 5.8±0.8–90.3±4.0, BHT ise % 7.5±0.7–96.6±0.5, Trolox; % 5.8±0.8–90.3±4.0 ve Quercetine; % 5.8±0.8–90.3±4.0 olarak hesaplandı.



Şekil 4.5.1. *J. regia* ve *T. polium*, bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT, Askorbik asit, Trolox ve Quercetine pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

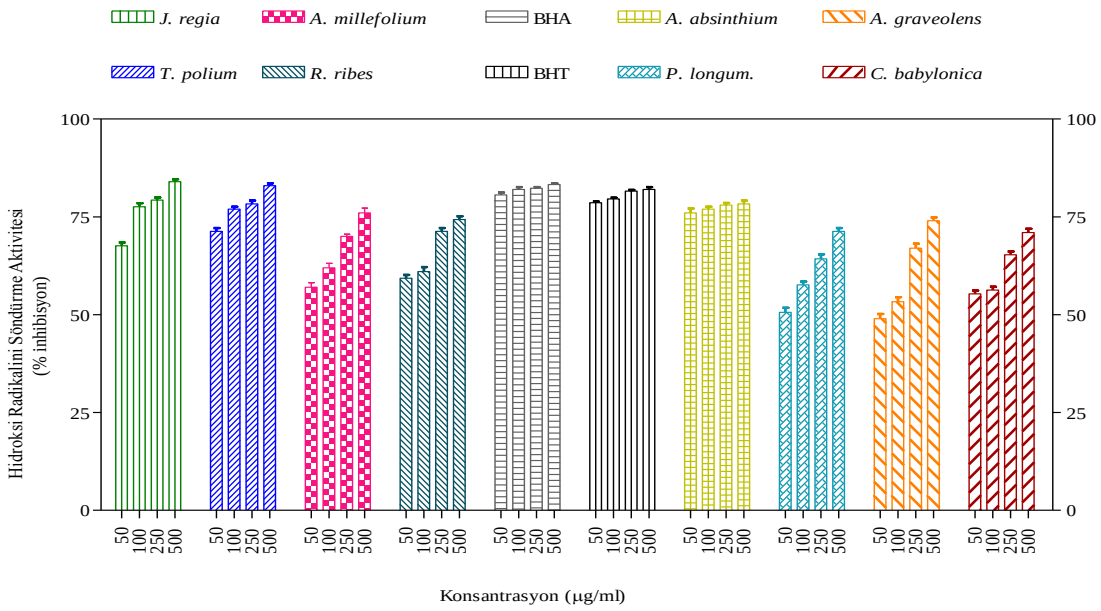


Şekil 4.5.2. *A. millefolium, R. ribes, P. longum., A. graveolens, A. absinthium* ve *C. babylonica* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ABTS radikali üzerindeki söndürücü etkisi. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.6. Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı (Şekil 4.6.).

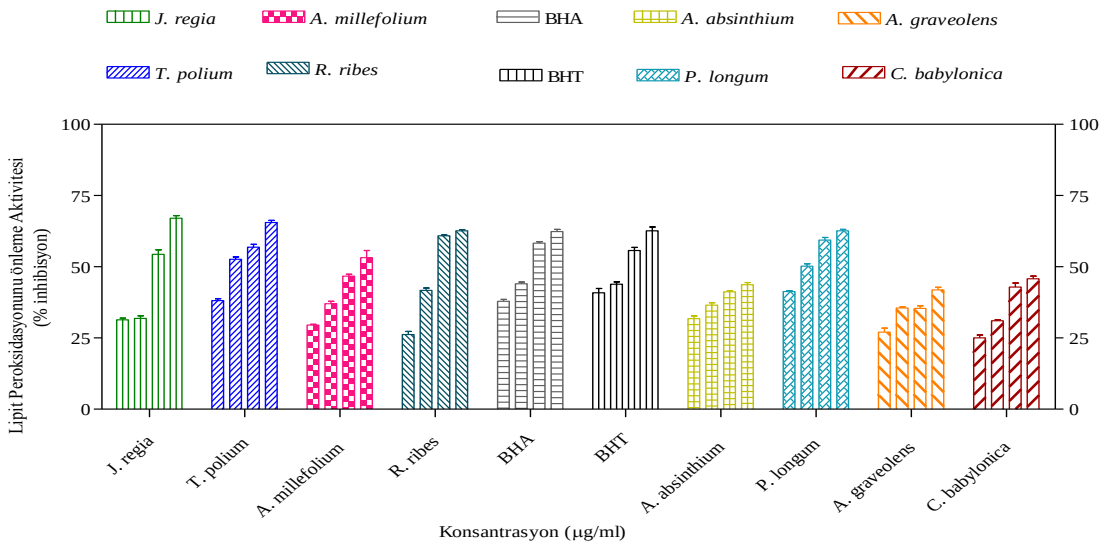
Hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *J. regia*'nın hidroksi radikalini söndürme aktivitesi % 67.6±1.5–84.0±1.2, *T. polium*; % 71.3±1.5–83.0±1.0, *A. millefolium;* % 57.0±2.0–76.6±2.08, *R. ribes*; % 59.3±1.5–66.5±1.8, *A. absinthium*; % 77.0±2.00–78.6±1.7, *A. graveolens*; % 49.0±2.0–74.6±1.5, *P. longum*; % 50.6±2.9–71.3±1.5, *C. babylonica*; % 55.3±1.5–71.0±7 ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 80.6±1.15–83.08±1.24, BHT ise % 78.6±0.7–82.0±1.0 olarak hesaplandı.



Şekil 4.6. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının TBA metodu ile Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi (%). BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

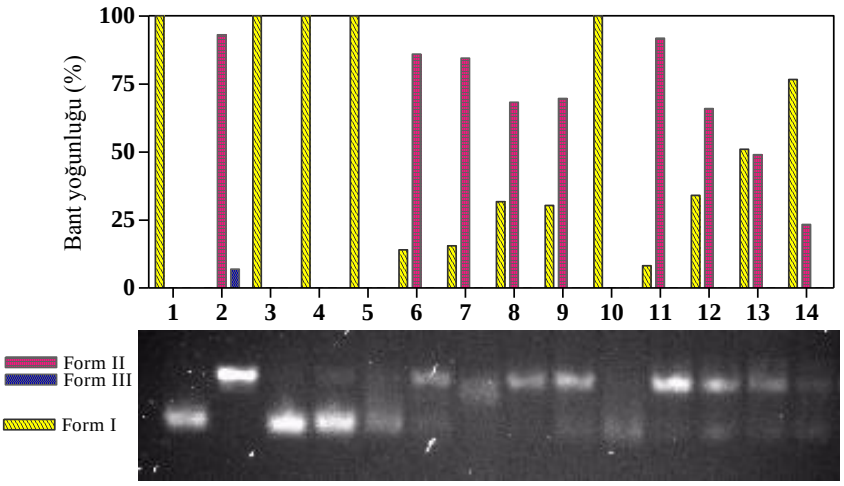
4.7. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplandı. (Şekil 4.7.) Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *J. regia*'nın; % 31.3±1.4–67.0±1.6, *T. polium*; % 38.1±1.2–65.6±1.45, *A. millefolium;* % 29.5±0.5–53.2±4.4, *R. ribes*; % 26.6±1.9–62.6±0.8, *A. absinthium*; % 31.8±1.6–43.7±1.31, *A. graveolens*; % 27.0±2.5–41.9±1.6, *P. longum*; % 41.3±1.15–62.6±0.8, *C. babylonica*; % 25.0±1.75–45.8±1.5 ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 37.9±1.05–62.4±1.05, BHT ise % 40.9±2.5–62.6±2.3 aktivite olarak gösterdi.



Şekil 4.7. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktiviteleri. BHT ve BHA pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması alınarak ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.8. DNA Agaroz Jel Elektroforezi

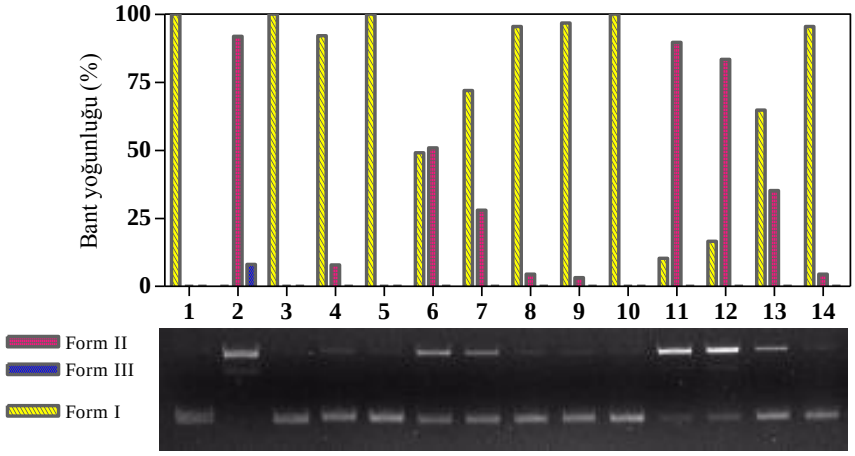


Şekil 4.8.1. BHT ve BHA'nın supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/l H_2O_2 içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 7 dk yapıldı. **1.** DNA; **2.** DNA+UV+H_2O_2 **3.** DNA+UV **4.** DNA+H_2O_2 **5.** DNA+250 µg/ml BHT **6.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml BHT **7.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml BHT **8.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml BHT **9.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml BHT **10.** DNA+250 µg/ml BHA **11.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml BHA **12.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml BHA **13.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml BHA **14.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml BHA

Tablo 4.3. BHT ve BHA'nın DNA kesim önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100	0	0
2	DNA+UV+H_2O_2	0	93.01	6.99
3	DNA+UV	100	0	0
4	DNA+H_2O_2	0	0	0
5	DNA+250 µg/ml BHT	100	0	0
6	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml BHT	14.02	85.98	0
7	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml BHT	15.51	84.49	0
8	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml BHT	31.76	68.24	0
9	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml BHT	40.33	59.67	0
10	DNA+250 µg/ml BHA	100	0	0
11	DNA+UV+H_2O_2+50 BHA	8.20	91.8	0
12	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml BHA	34.04	65.96	0
13	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml BHA	51.05	48.95	0
14	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml BHA	66.57	33.43	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

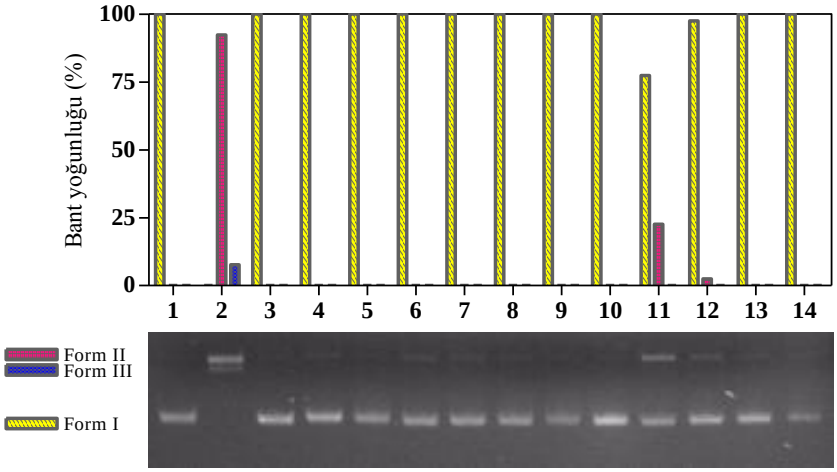


Şekil 4.8.2. *J. regia* ve *T. polium*'un supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/l H_2O_2 içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 7 dk yapıldı. **1.** DNA; **2.** DNA+UV+H_2O_2 **3.** DNA+UV **4.** DNA+H_2O_2 **5.** DNA+250 µg/ml *J. regia* **6.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *J. regia* **7.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *J. regia* **8.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *J. regia* **9.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *J. regia* **10.** DNA+250 µg/ml *T. polium* **11.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *T. polium* **12.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *T. polium* **13.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *T. polium* **14.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *T. polium*

Tablo 4.4. *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100	0	0
2	DNA+UV+H_2O_2	0	91.93	8.07
3	DNA+UV	100	0	0
4	DNA+H_2O_2	92.07	7.93	0
5	DNA+250 µg/ml *J. regia*	100	0	0
6	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *J. regia*	49.10	50.90	0
7	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *J. regia*	72.00	28.00	0
8	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *J. regia*	65.47	4.53	0
9	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *J. regia*	96.73	3.27	0
10	DNA+250 µg/ml *T. polium*	100	0	0
11	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *T. polium*	10.35	89.65	0
12	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *T. polium*	16.53	83.47	0
13	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *T. polium*	64.80	35.20	0
14	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *T. polium*	95.49	4.51	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

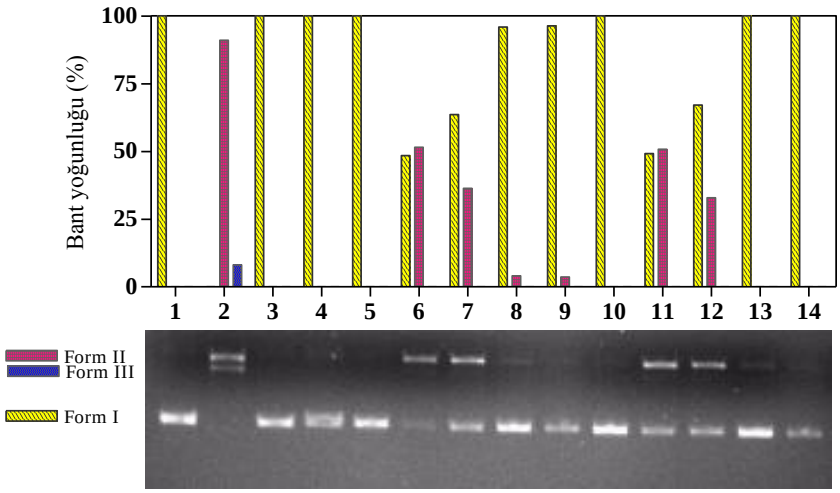


Şekil 4.8.3. *R. ribes* ve *A. graveolens*'in supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/l H_2O_2 içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 7 dk yapıldı. **1.** DNA; **2.** DNA+UV+H_2O_2 **3.** DNA+UV **4.** DNA+H_2O_2 **5.** DNA+250 µg/ml *R. ribes* **6.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *R. ribes* **7.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *R. ribes* **8.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *R. ribes* **9.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *R. ribes* **10.** DNA+250 µg/ml *A. graveolens* **11.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *A. graveolens* **12.** DNA+UV+ H_2O_2+100 µg/ml *A. graveolens* **13.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. graveolens* **14.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. graveolens*

Tablo 4.5. *R. ribes* ve *A. graveolens* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100	0	0
2	DNA+UV+H_2O_2	0	92.34	7.66
3	DNA+UV	100	0	0
4	DNA+H_2O_2	100	0	0
5	DNA+250 µg/ml *R. ribes*	100	0	0
6	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *R. ribes*	90.22	9.78	0
7	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *R. ribes*	94.48	5.56	0
8	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *R. ribes*	96.53	3.47	0
9	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *R. ribes*	97.23	2.77	0
10	DNA+250 µg/ml *A. graveolens*	100	0	0
11	DNA+UV+H_2O_2+50 *A. graveolens*	68.41	31.59	0
12	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *A. graveolens*	77.38	22.62	0
13	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. graveolens*	96.14	3.86	0
14	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. graveolens*	98.12	1.88	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

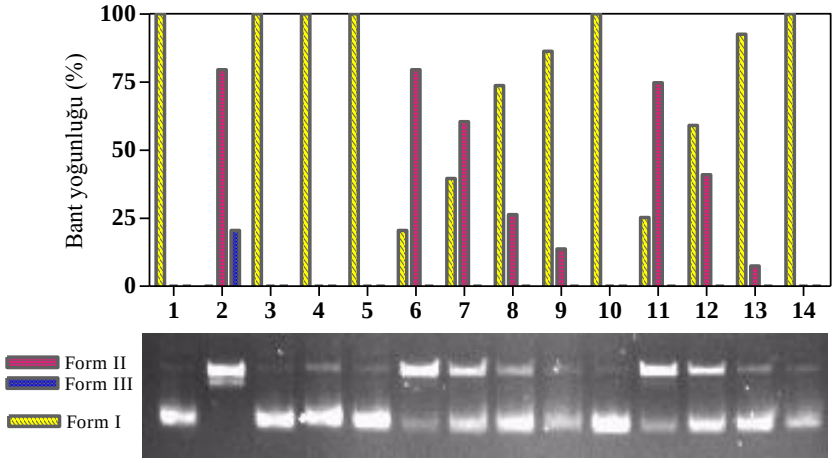


Şekil 4.8.4. *P. longum* ve *C. babylonica*'nın supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/l H_2O_2 içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 7 dk yapıldı. **1.** DNA; **2.** DNA+UV+H_2O_2 **3.** DNA+UV **4.** DNA+H_2O_2 **5.** DNA+250 µg/ml *P. longum* **6.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *P. longum* **7.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *P. longum* **8.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *P. longum* **9.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *P. longum* **10.** DNA+250 µg/ml *C. babylonica* **11.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *C. babylonica* **12.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *C. babylonica* **13.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *C. babylonica* **14.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *C. babylonica*

Tablo 4.6. *P. longum* ve *C. babylonica* bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100	0	0
2	DNA+UV+H_2O_2	0	91.02	9.98
3	DNA+UV	100	0	0
4	DNA+H_2O_2	100	0	0
5	DNA+250 µg/ml *P. longum*	100	0	0
6	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *P. longum*	48.48	51.52.	0
7	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *P. longum*	63.62	36.68	0
8	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *P. longum*	95.97	4.03	0
9	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *P. longum*	96.32	3.68	0
10	DNA+250 µg/ml *C. babylonica*	100	0	0
11	DNA+UV+H_2O_2+50 *C. babylonica*	49.22	50.78	0
12	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *C. babylonica*	67.15	32.85	0
13	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *C. babylonica*	98.11	1.89	0
14	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *C. babylonica*	98.23	1.77	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear



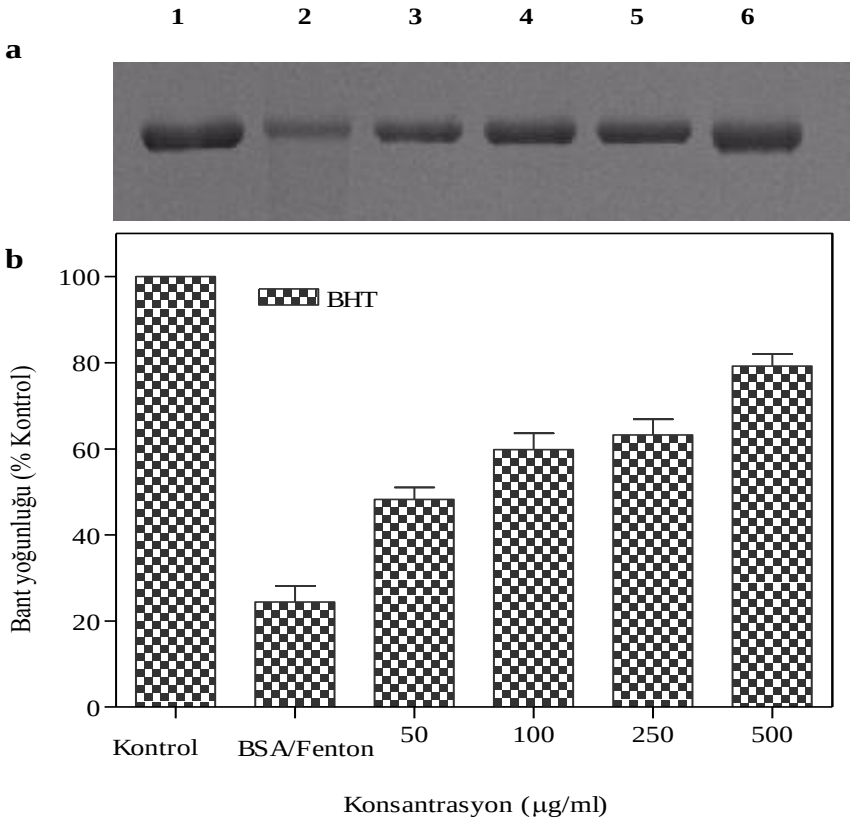
Şekil 4.8.5. *A. millefolium* ve *A. absinthium*'un supercoiled DNA'yı H_2O_2 fotolizi sonucu oluşan OH radikaline karşı koruyucu etkilerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile incelenmesi. Her kuyucuk 4000 ng DNA ve 50 mmol/l H_2O_2 içerir. Bütün deneylerde UV uygulaması 7 dk yapıldı. **1.** DNA; **2.** DNA+UV+H_2O_2 **3.** DNA+UV **4.** DNA+H_2O_2 **5.** DNA+250 µg/ml *A. millefolium* **6.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *A. millefolium* **7.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *A. millefolium* **8.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. millefolium*. **9.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. millefolium* **10.** DNA+250 µg/ml *A. absinthium* **11.** DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *A. absinthium* **12.** DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *A. absinthium* **13.** DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. absinthium* **14.** DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. absinthium*

Tablo 4.7. *A. millefolium* ve *A. absinthium*'un bitkilerinin DNA kesim önleme etkileri (%). (SC DNA form yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değerine karşılık gelmektedir)

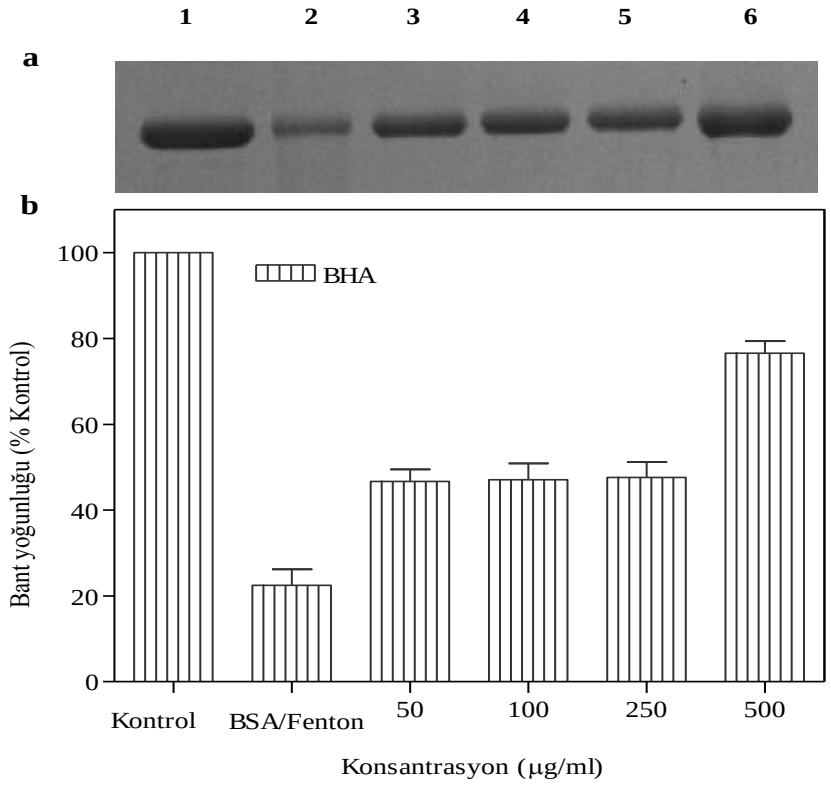
Kuyucuk	Reaksiyon Koşulları	Form (%)		
		SC	OC	LC
1	DNA	100	0	0
2	DNA+UV+H_2O_2	0	79.54	20.46
3	DNA+UV	100	0	0
4	DNA+H_2O_2	96.86	3.14	0
5	DNA+250 µg/ml *A. millefolium*	100	0	0
6	DNA+UV+H_2O_2+50 µg/ml *A. millefolium*	20.53	79.47	0
7	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *A. millefolium*	39.54	60.46	0
8	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. millefolium*	73.64	26.36	0
9	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. millefolium*	86.28	13.72	0
10	DNA+250 µg/ml *A. absinthium*	100	0	0
11	DNA+UV+H_2O_2+50 *A. absinthium*	25.22	74.78	0
12	DNA+UV+H_2O_2+100 µg/ml *A. absinthium*	59.03	40.97	0
13	DNA+UV+H_2O_2+250 µg/ml *A. absinthium*	92.54	7.46	0
14	DNA+UV+H_2O_2+500 µg/ml *A. absinthium*	96.43	3.57	0

*SC: Supercoiled, OC: Open circular, LC: Linear

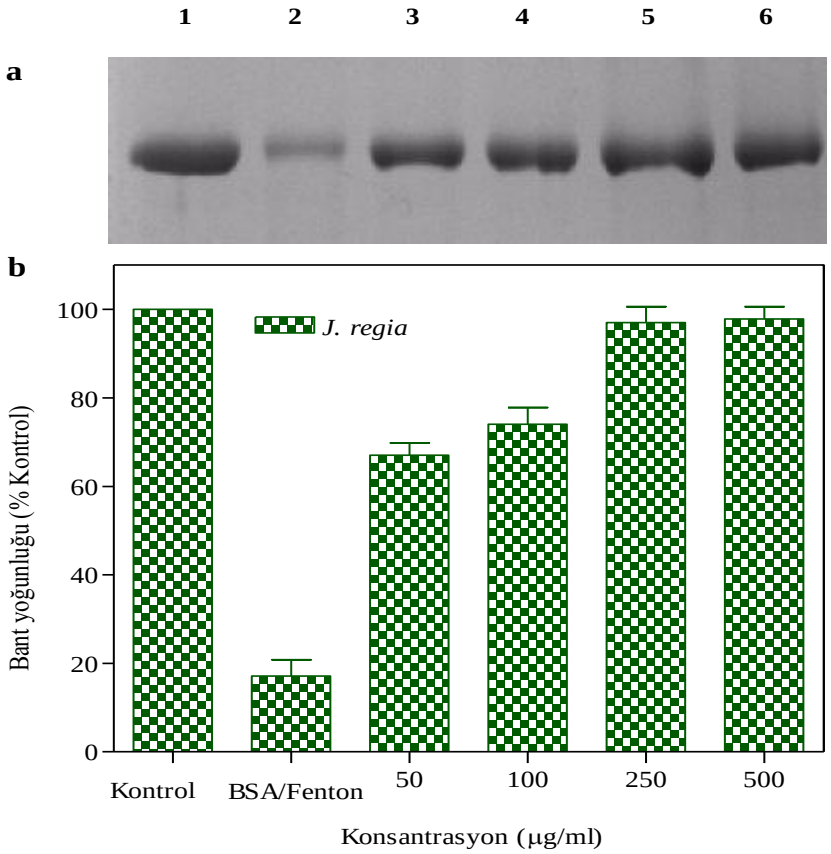
4.9. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)



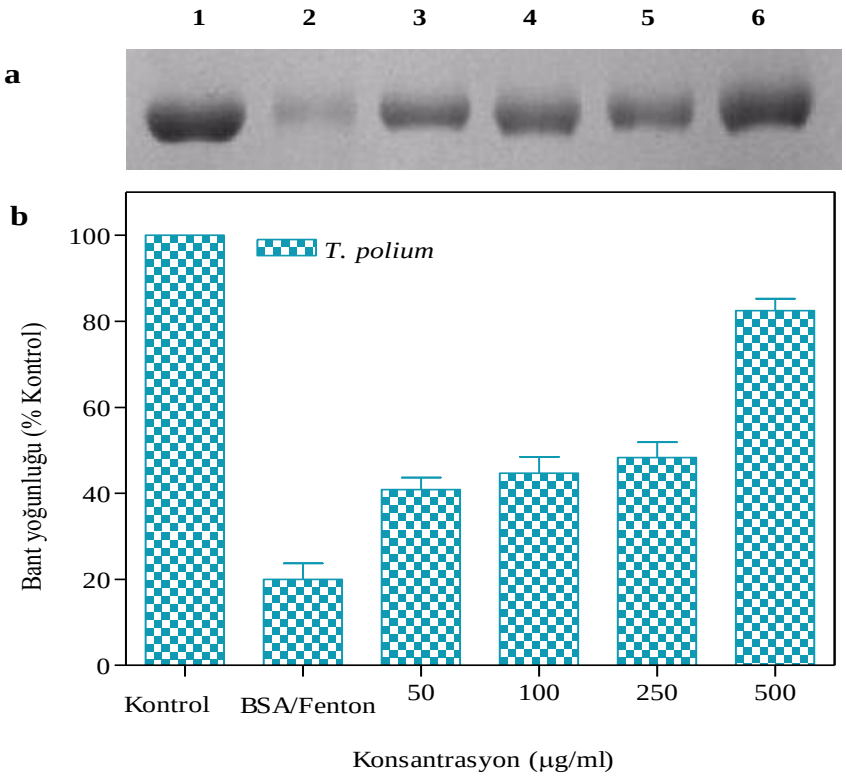
Şekil 4.9.1. a) BSA oksidatif hasarının BHT ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 μg/ml BHT, **4.** BSA+Fenton+100 μg/ml BHT, **5.** BSA+Fenton+ 250 μg/ml BHT, **6.** BSA+Fenton+500 μg/ml BHT (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



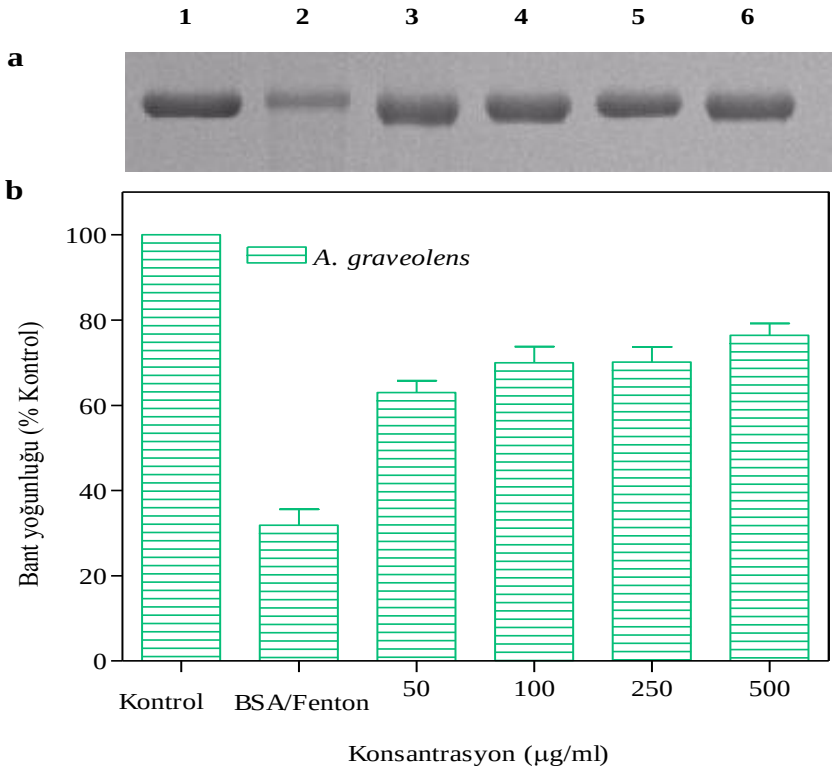
Şekil 4.9.2. a) BSA oksidatif hasarının BHA ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml BHA, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml BHA, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml BHA, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml BHA(Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



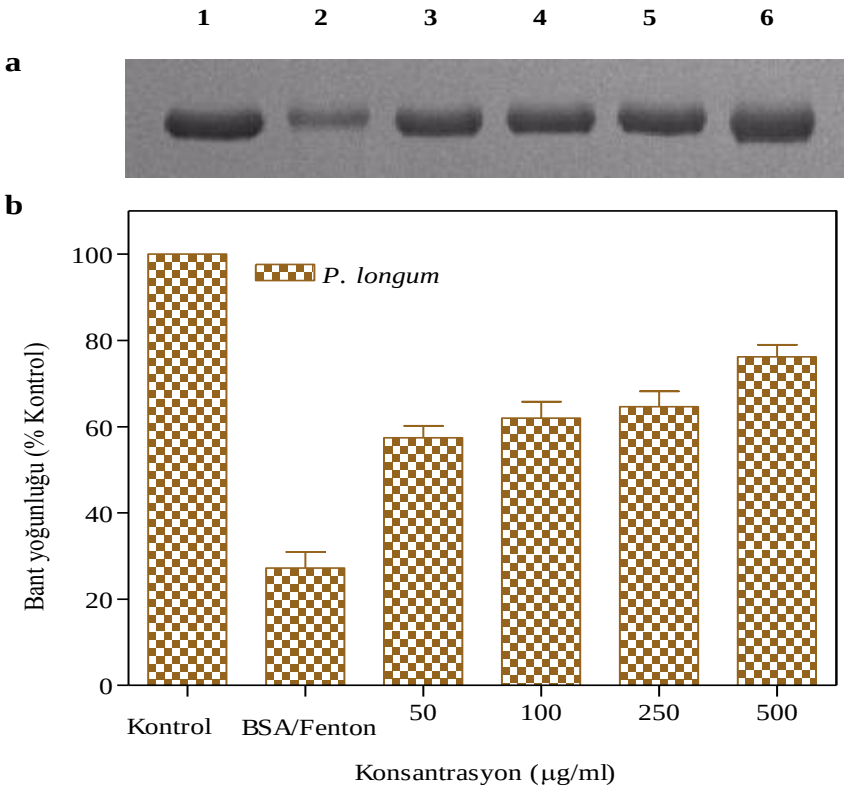
Şekil 4.9.3. a) BSA oksidatif hasarının *J. regia* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *J. regia*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *J. regia*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *J. regia*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *J. regia* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



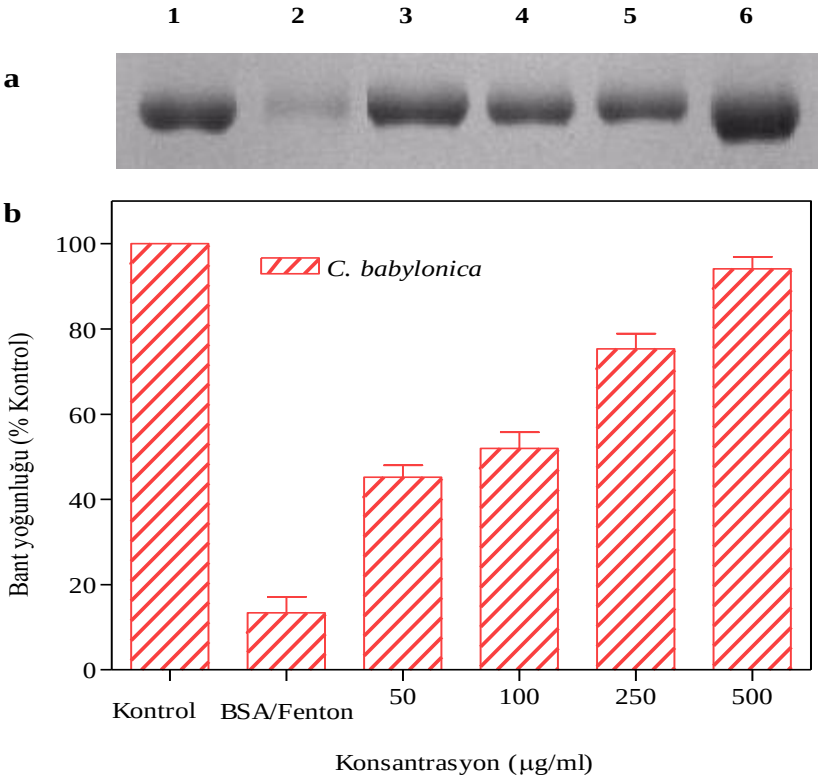
Şekil 4.9.4. a) BSA oksidatif hasarının *T. polium* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *T. polium*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *T. polium*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *T. polium*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *T. polium* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



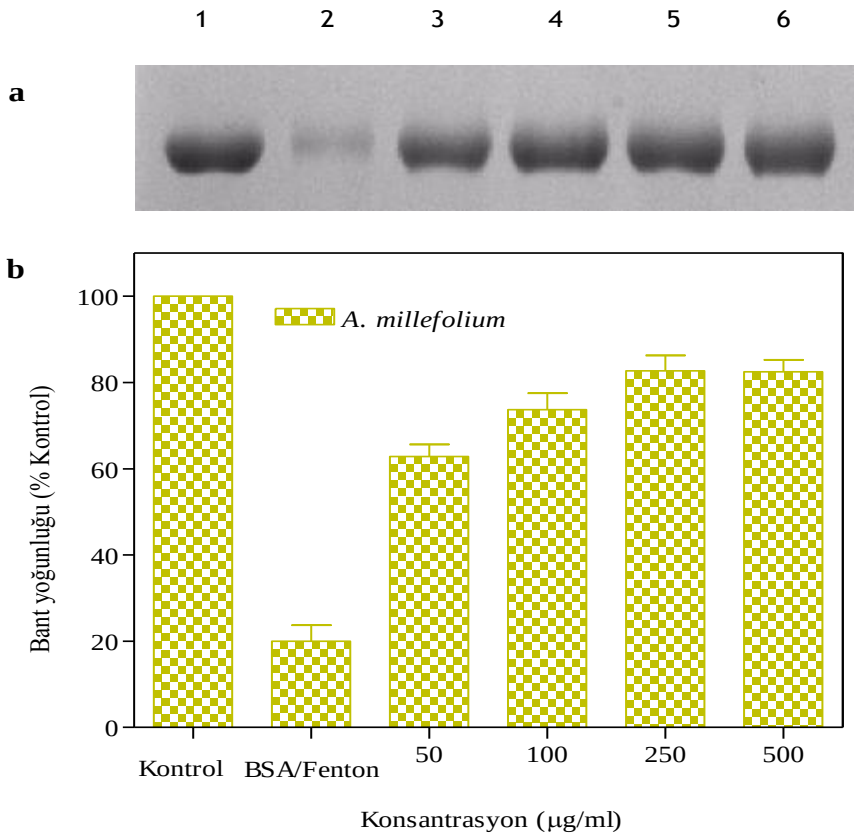
Şekil 4.9.5. a) BSA oksidatif hasarının *A. graveolens* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg /ml *A. graveolens*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *A. graveolens*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *A. graveolens*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *A. graveolens* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



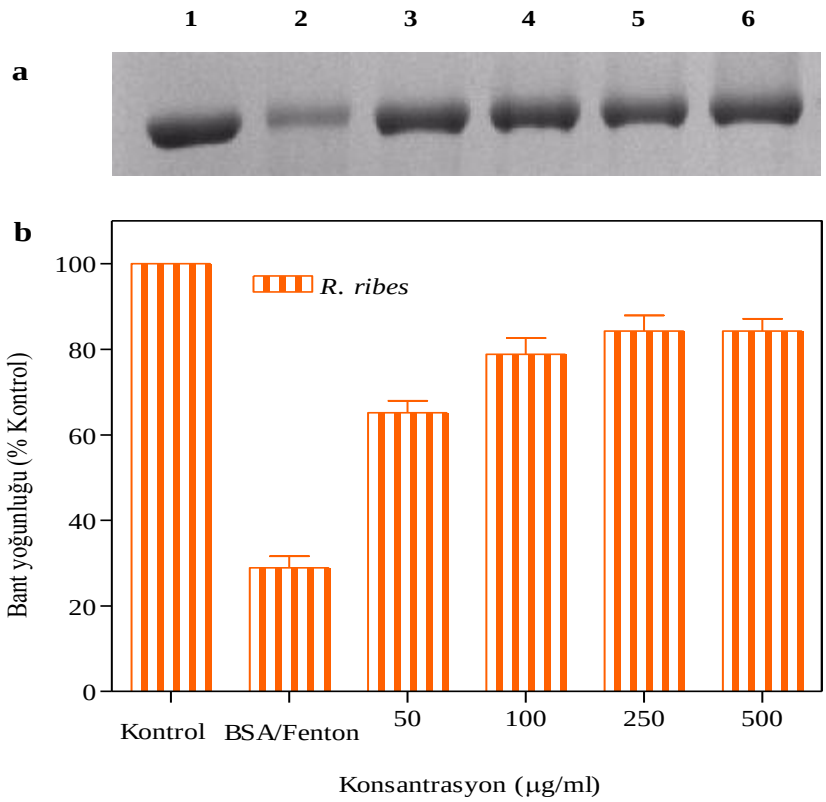
Şekil 4.9.6. a) BSA oksidatif hasarının *P. longum* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *P. longum*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *P. longum*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *P. longum*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *P. longum* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



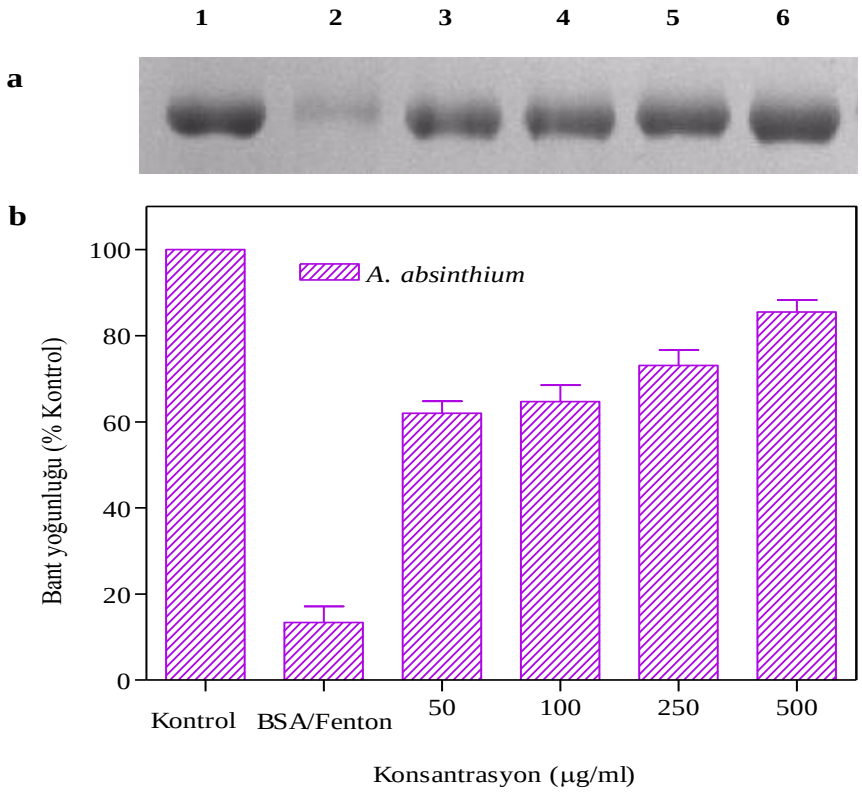
Şekil 4.9.7. a) BSA oksidatif hasarının *C. babylonica* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *C. babylonica*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *C. babylonica*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *C. babylonica*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *C. babylonica* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



Şekil 4.9.8. a) BSA oksidatif hasarının *A. millefolium* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili. **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *A. millefolium*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *A. millefolium*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *A. millefolium*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *A. millefolium* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)



Şekil 4.9.9. a) BSA oksidatif hasarının *R. ribes* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *R. ribes*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *R. ribes*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *R. ribes*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *R. ribes* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)

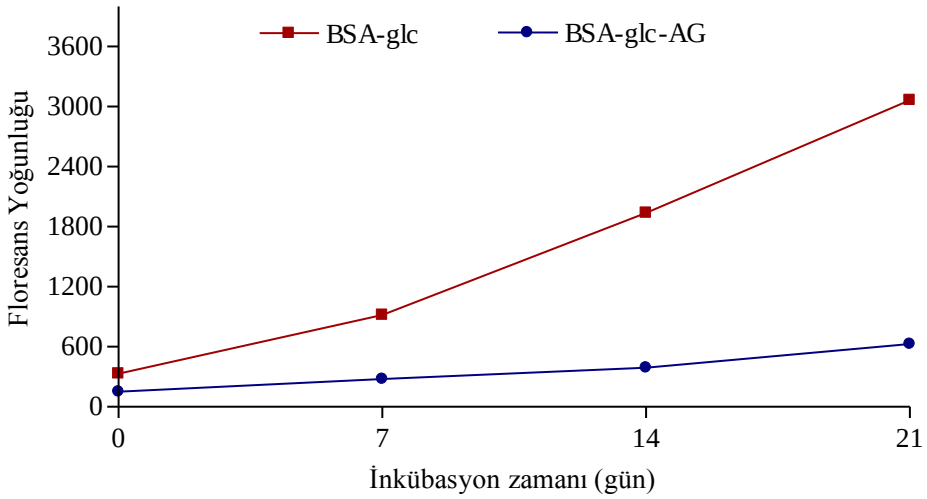


Şekil 4.9.9. a) BSA oksidatif hasarının *R. ribes* bitkisinin etanol:su ekstraktı ile inhibisyonunun SDS-page jel elektroforez profili **b)** Her kuyucuktaki bant yoğunluğu (kontrol BSA % 100 kabul edildi) **1.** BSA, **2.** BSA+Fenton, **3.** BSA+Fenton+50 µg/ml *A. absinthium*, **4.** BSA+Fenton+100 µg/ml *A. absinthium*, **5.** BSA+Fenton+250 µg/ml *A. absinthium*, **6.** BSA+Fenton+500 µg/ml *A. absinthium* (Fenton koşulları: 1 mg/ml BSA, 1 mM $FeCl_3$, 2.5 mM H_2O_2, 3 mM EDTA ve 1mM askorbik asit)

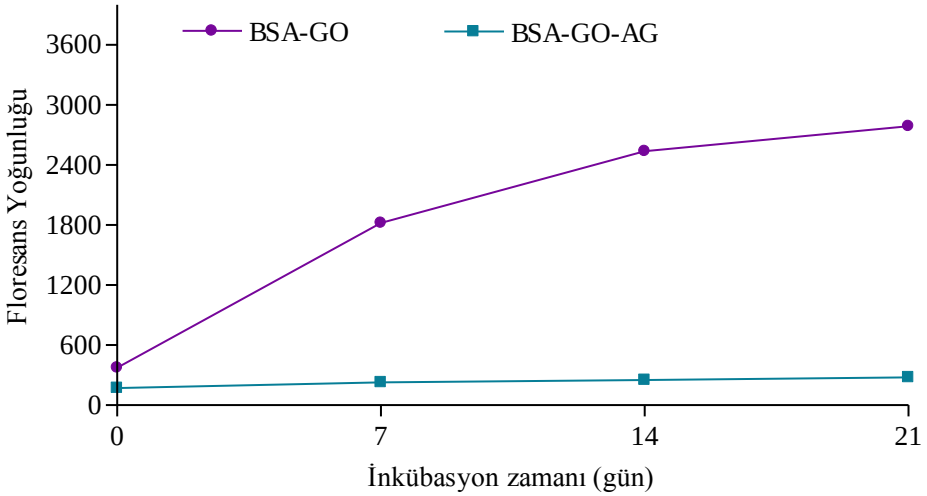
4.10. *In vitro* Olarak BSA'nın Glikolizasyonu

4.10.1. Total AGE Floresans Ölçümü

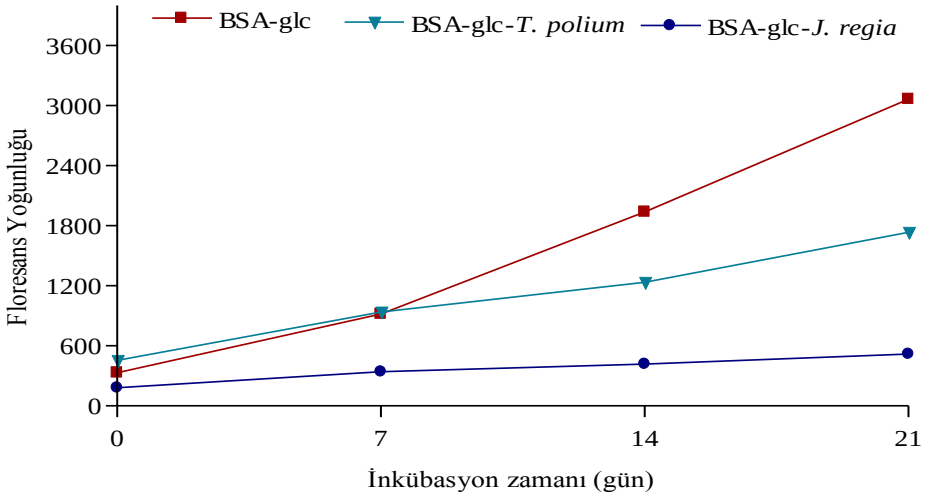
Total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de yayılma floresansları kullanılarak ölçüldü. Aminoguanidinin AGE inhibisyonu; BSA-GO sisteminde; 7. gün: % 87.5, 14.gün: % 90.4 ve 21. gün: % 90.8; BSA-Glc sisteminde ise 7. gün: % 69.6, 14. gün: % 79.7 ve 21. gün: % 79.5 olarak hesaplandı. *J. regia* (500 µg/ml)' nın AGE inhibisyonu; BSA-Glc sisteminde; 7. gün: % 62.8, 14. gün: % 78.4 ve 21. gün: % 86.3 olarak ve *T. polium* (500 µg/ml)' un AGE inhibisyonu; BSA-Glc sisteminde; 7. gün: % 15.2, 14. gün: % 36.2 ve 21. gün: % 43.4 olarak hesaplandı.



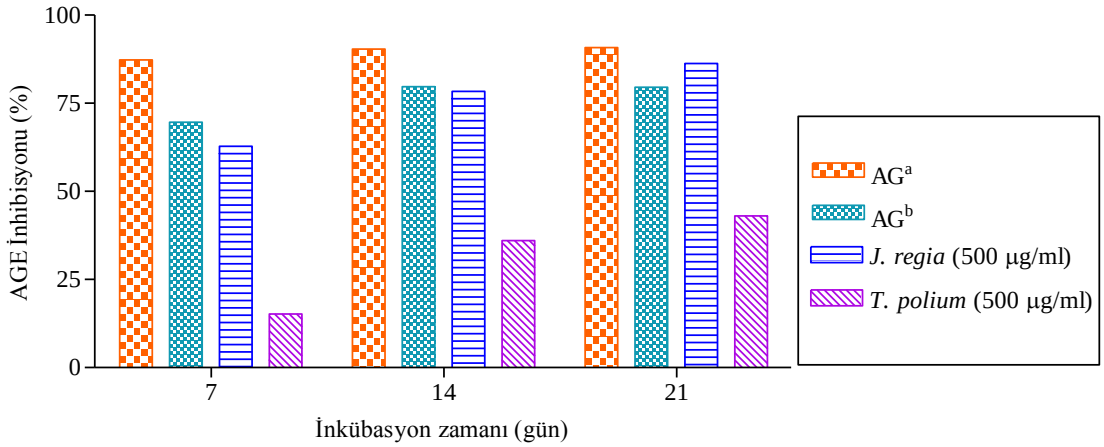
Şekil 4.10.1.1. BSA-glc ve BSA-glc-AG sistemlerinin total floresans yoğunluğu



Şekil 4.10.1.2. BSA-GO ve BSA-GO-AG sistemlerinin total floresans yoğunluğu

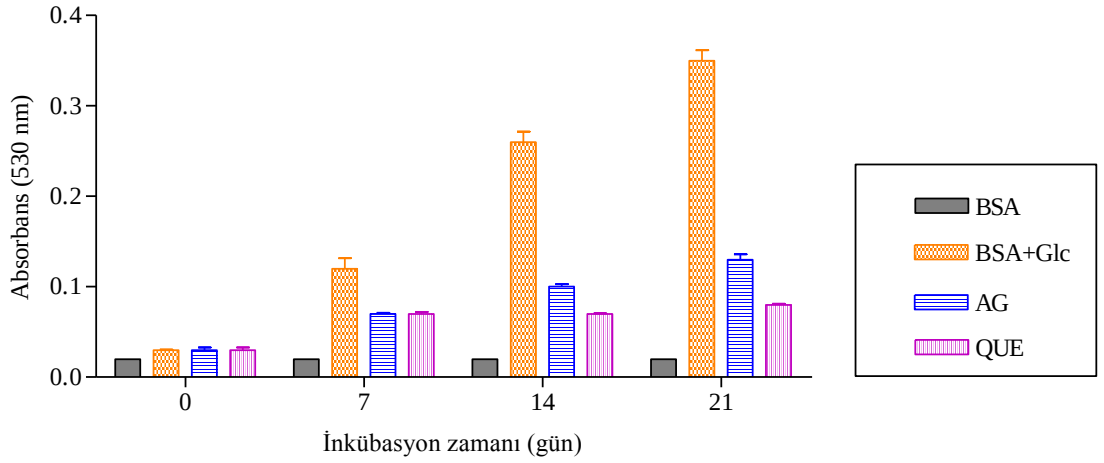


Şekil 4.10.1.3. BSA-glc, BSA-glc-*T. polium* ve BSA-glc-*J. regia* sistemlerinin total floresans yoğunluğu

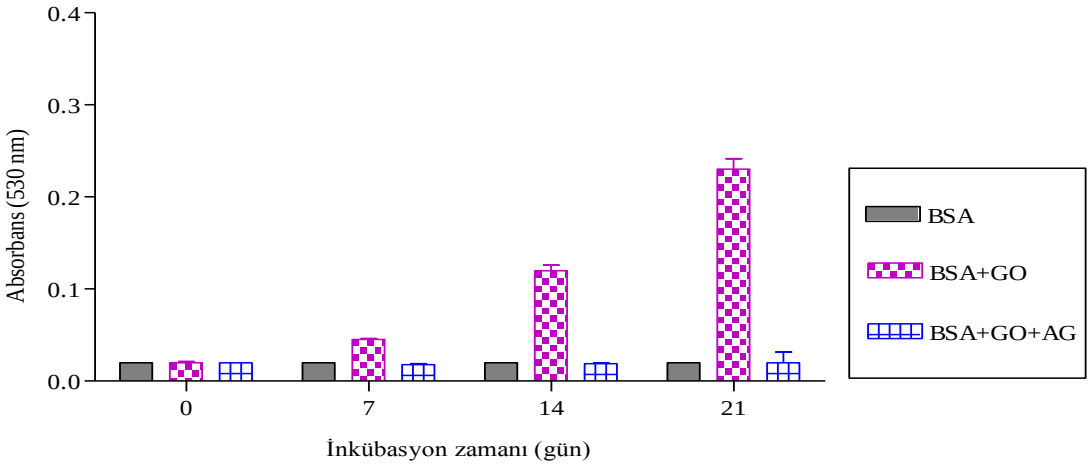


Şekil 4.10.1.4. *J. regia*, *T. polium* ve AG'nin, BSA-Glc/GO glikasyon sistemlerinde AGE inhibisyon aktiviteleri (AG^a: BSA-GO sisteminde AG'nin inhibisyon değeri, AG^b: BSA-Glc sisteminde AG'nin inhibisyon değeri).

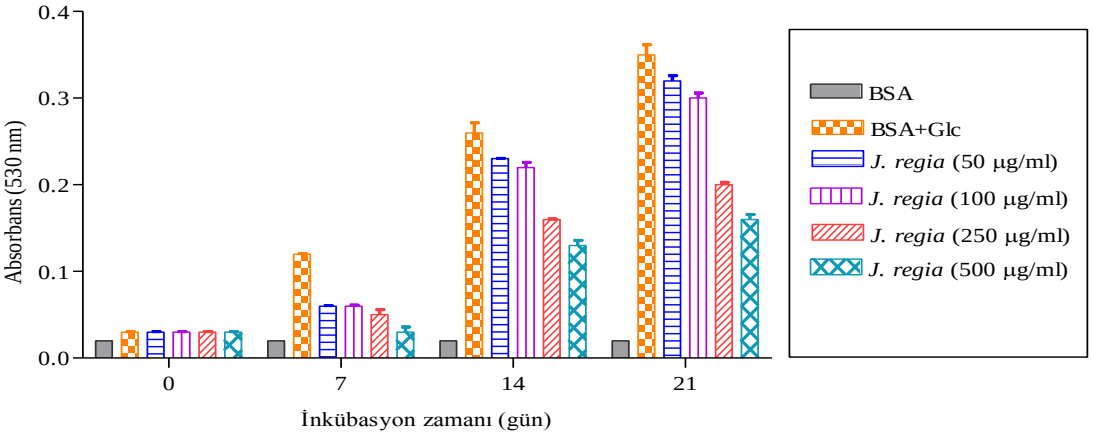
4.10.2. Fruktozamin Testi



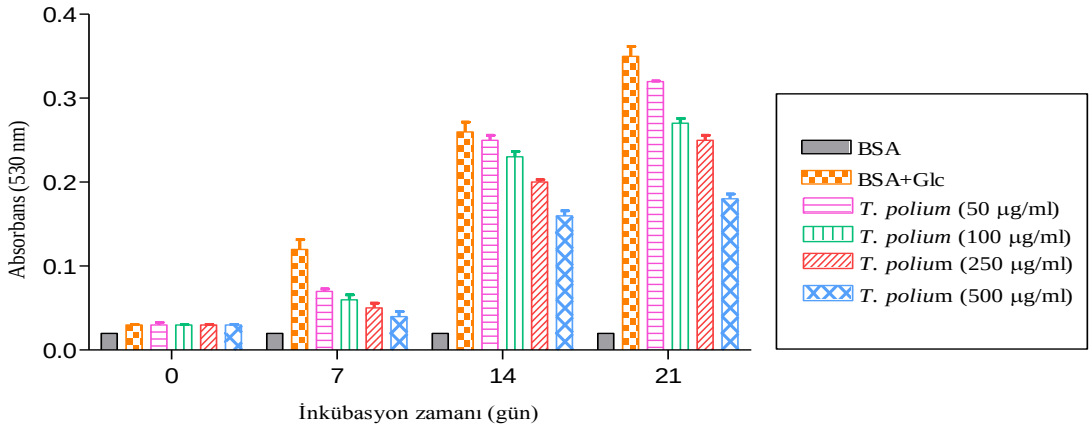
Şekil 4.10.2.1. BSA'nın Aminoguanidin (AG) ve Quercetine (QUE) varlığında, glikoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



Şekil 4.10.2.2. BSA'nın, Aminoguanidin (AG) varlığında, glioksal (GO) ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin spektroskopik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir. (n=3)

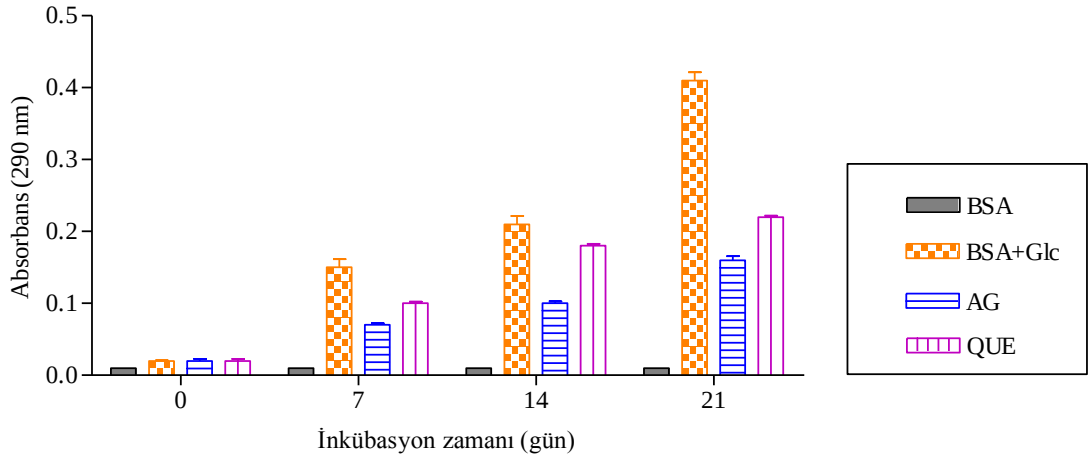


Şekil 4.10.2.3. *J. regia* bitkisinin, BSA'nın glikoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

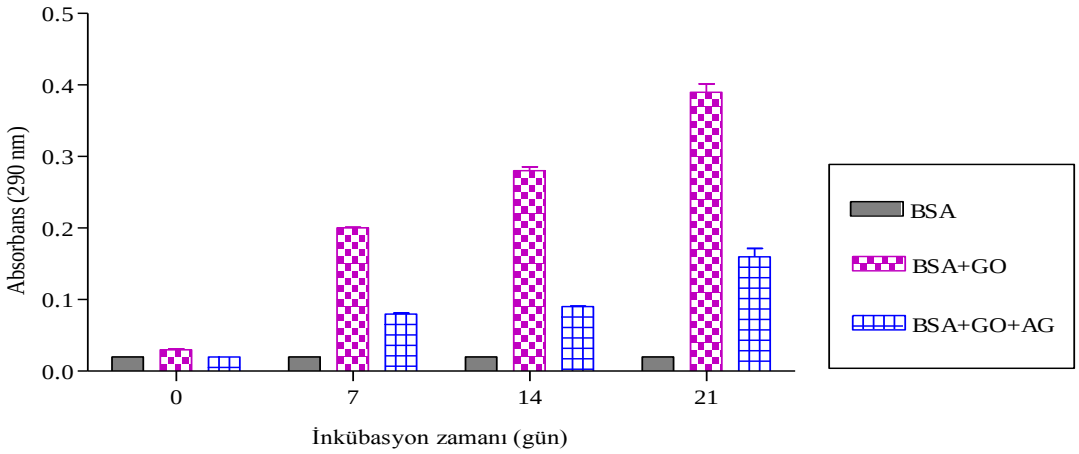


Şekil 4.10.2.4. *T. polium* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan amadori ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

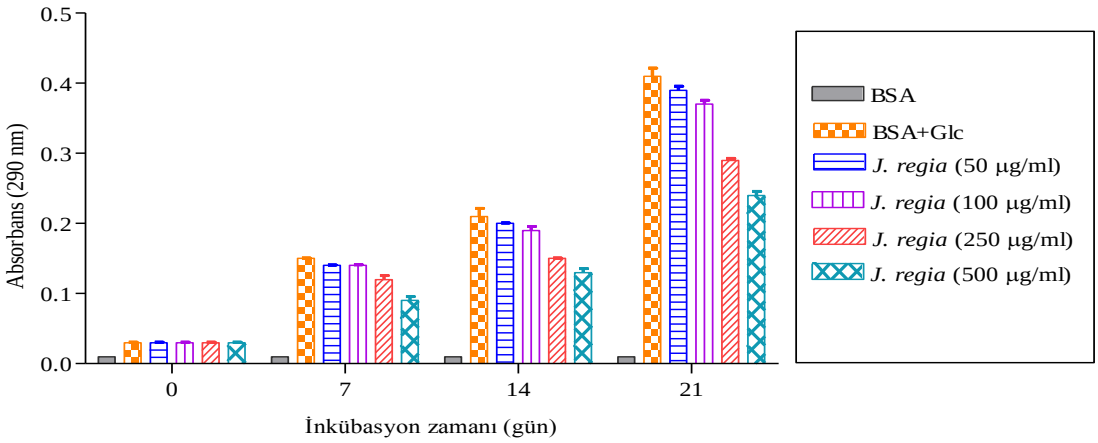
4.10.3. α-Dikarbonil Tayini



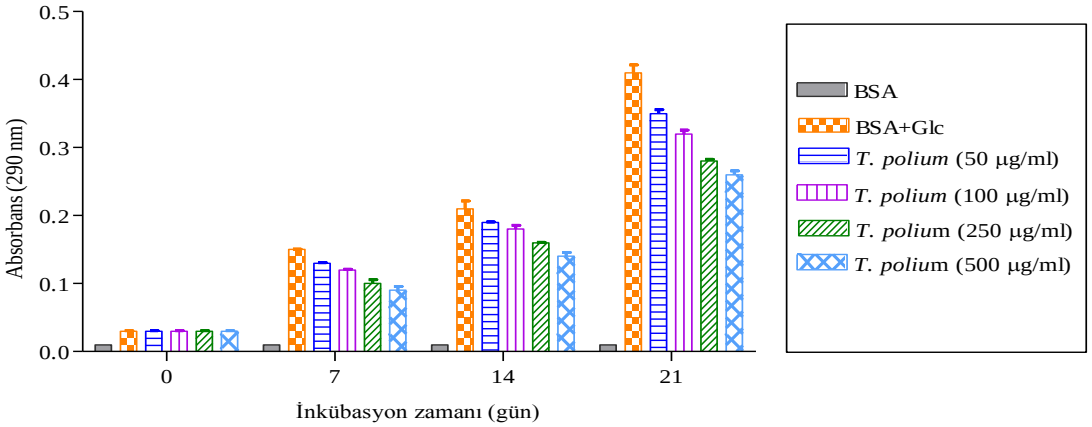
Şekil 4.10.3.1. BSA'nın Aminoguanidin (AG) ve Quercetine (QUE) varlığında, glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünlerinin oluşumu üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



Şekil 4.10.3.2. BSA'nın, Aminoguanidin (AG) varlığında, glioksal (GO) ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünlerinin spektroskopik olarak tayini. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

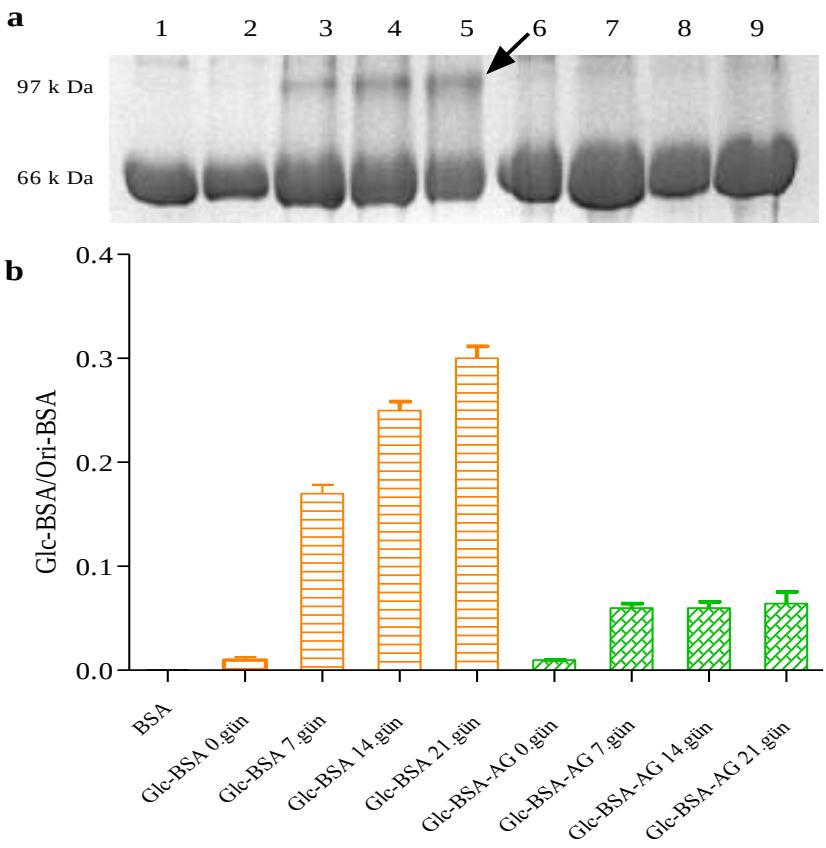


Şekil 4.10.3.3. *J. regia* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

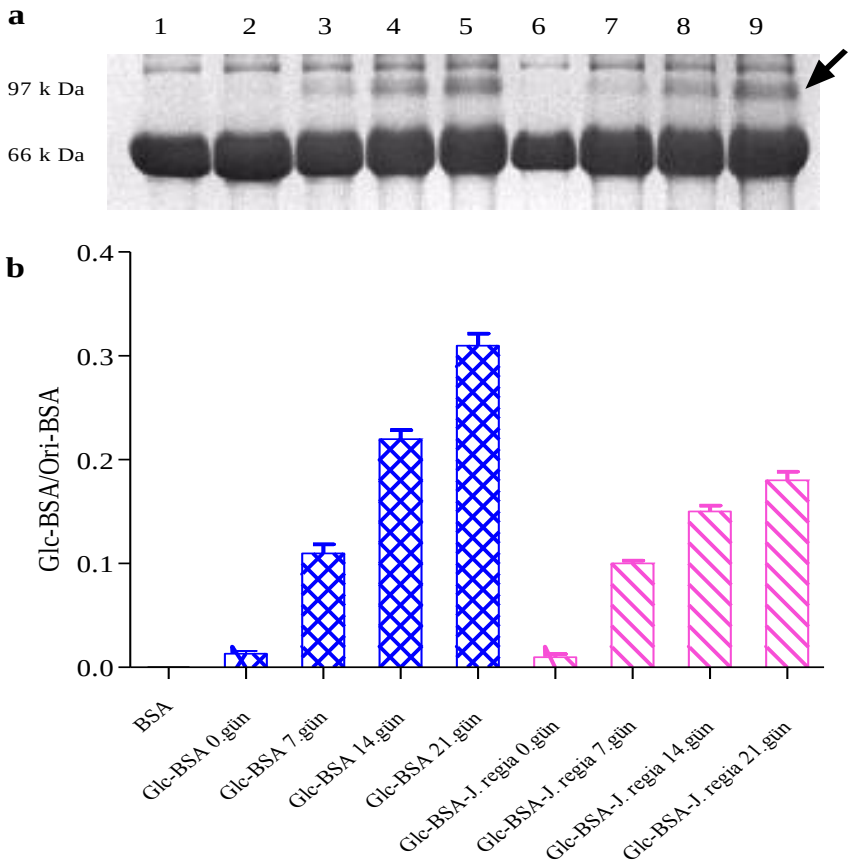


Şekil 4.10.3.4. *T. polium* bitkisinin, BSA'nın glukoz ile inkübasyonu sonucu oluşan α-dikarbonil ürünleri üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak incelenmesi. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

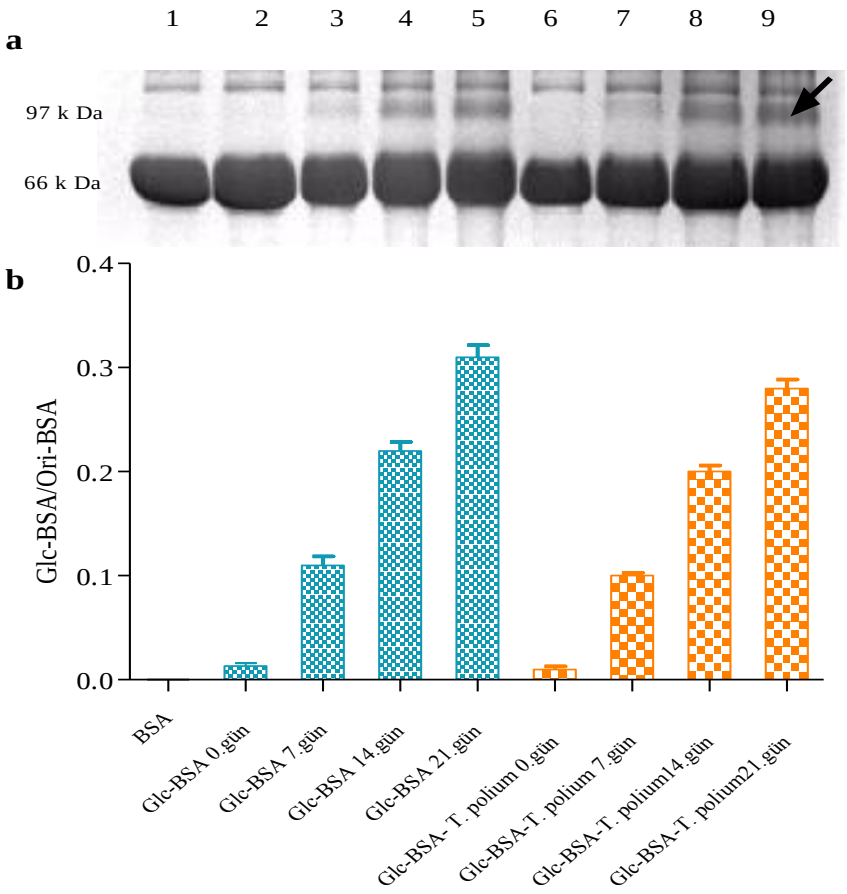
4.10.4. Glikolizlenmiş proteinin SDS-PAGE karakterizasyonu



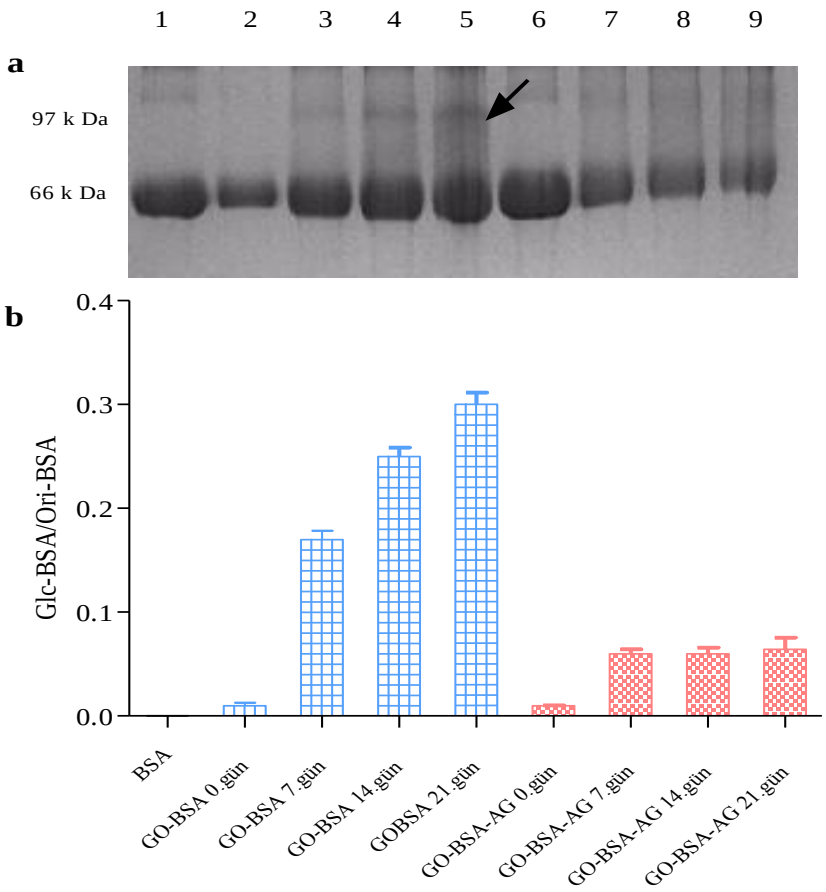
Şekil 4.10.4.1. Glikolizlenmiş proteinin AG varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Glukoz 0. gün, **3.** BSA+Glukoz 7. gün, **4.** BSA+Glukoz 14. gün, **5.** BSA+Glukoz 21. gün **6.** BSA+Glukoz+AG 0. gün, **7.** BSA+Glukoz+AG 7. gün, **8.** BSA+Glukoz+AG 14. gün, **9.** BSA+Glukoz+AG 21. gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Glikolizlenmiş BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



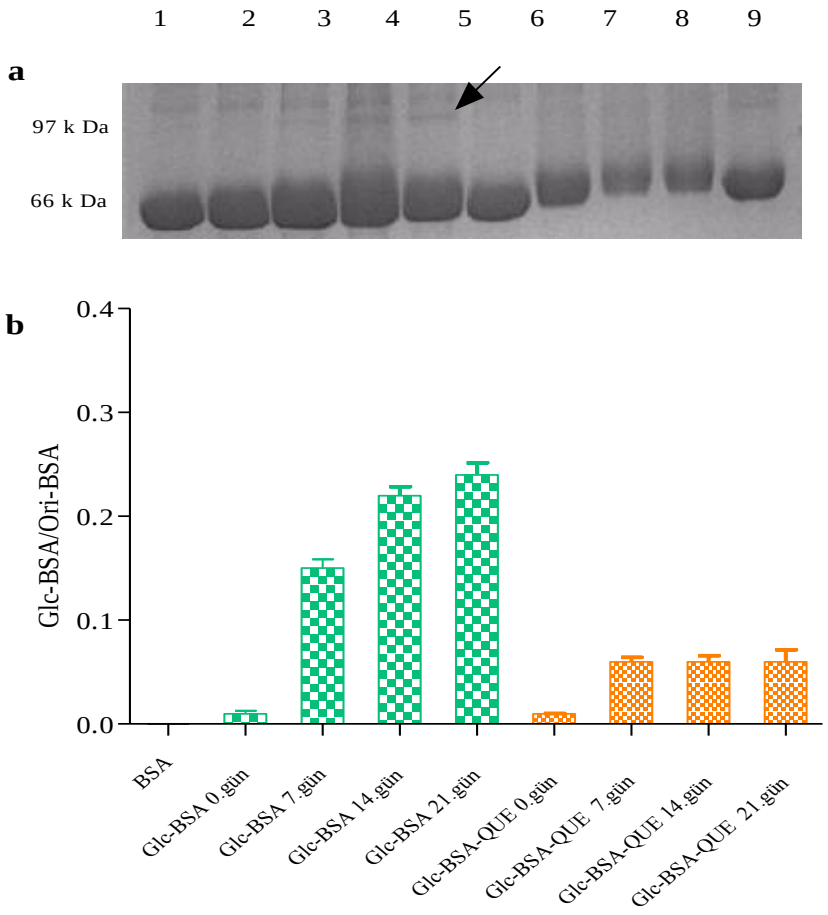
Şekil 4.10.4.2. Glikolizlenmiş proteinin *J. regia* varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Glukoz 0. gün, **3.** BSA+Glukoz 7. gün, **4.** BSA+Glukoz 14. gün, **5.** BSA+Glukoz 21. gün **6.** BSA+Glukoz+*J. regia* 0. gün, **7.** BSA+Glukoz+*J. regia* 7. gün, **8.** BSA+Glukoz+*J. regia* 14. gün, **9.** BSA+Glukoz+ *J. regia* 21. gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Glikolizlenmiş BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



Şekil 4.10.4.3. Glikolizlenmiş proteinin *T. polium* varlığında SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Glukoz 0. gün, **3.** BSA+Glukoz 7. gün, **4.** BSA+Glukoz 14. gün, **5.** BSA+Glukoz 21. gün **6.** BSA+Glukoz+*T. polium* 0. gün, **7.** BSA+Glukoz+*T. polium* 7. gün, **8.** BSA+Glukoz+*T. polium* 14. gün, **9.** BSA+Glukoz+*T. polium* 21. gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Glikolizlenmiş BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



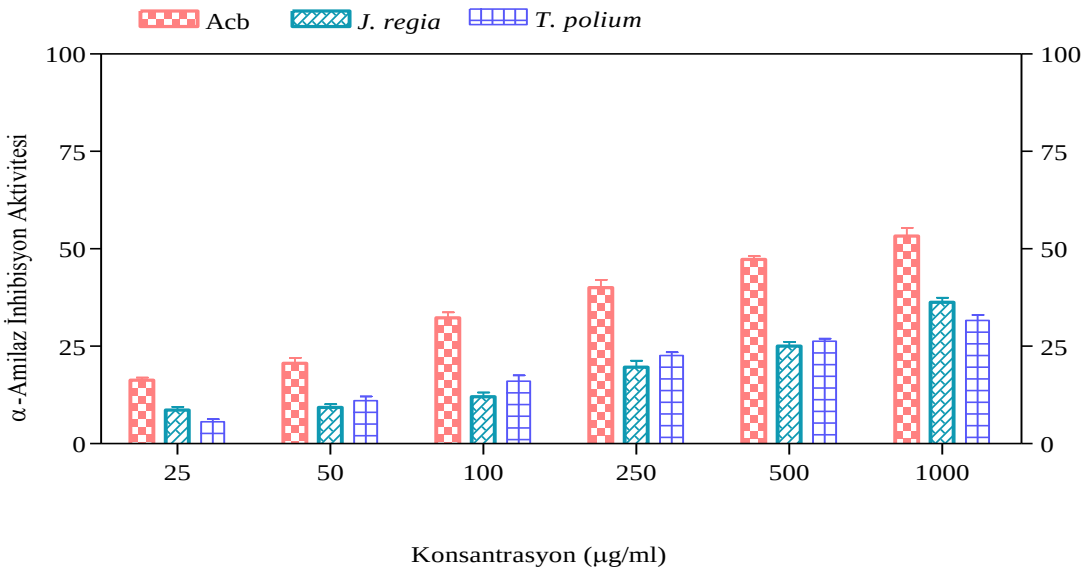
Şekil 4.10.4.4. BSA'nın AG (aminoguanidin) varlığında ve yokluğunda GO (glioksal) ile glikolizlenmesinin SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları; **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+GO 0. gün, **3.** BSA+GO 7. gün, **4.** BSA+GO 14. gün, **5.** BSA+GO 21. gün **6.** BSA+GO+AG 0. gün, **7.** BSA+GO+AG 7. gün, **8.** BSA+GO+AG 14. gün, **9.** BSA+GO+AG 21. gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Glikolizlenmiş BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)



Şekil 4.10.4.5. Glikolizlenmiş proteinin QUE varlığında ve yokluğunda SDS-PAGE profili. **(a)** SDS-PAGE bantları **1.** Kontrol BSA, **2.** BSA+Glikoz 0. gün, **3.** BSA+Glukoz 7. gün, **4.** BSA+Glukoz 14. gün, **5.** BSA+Glukoz 21. gün **6.** BSA+Glukoz+QUE 0. gün, **7.** BSA+Glukoz+QUE 7. gün, **8.** BSA+Glukoz+QUE 14. gün, **9.** BSA+Glukoz+QUE 21. gün **(b)** SDS-PAGE bantlarının analizi: Glikolizlenmiş BSA/Orjinal BSA. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.11. α-Amilaz İnhibisyonu

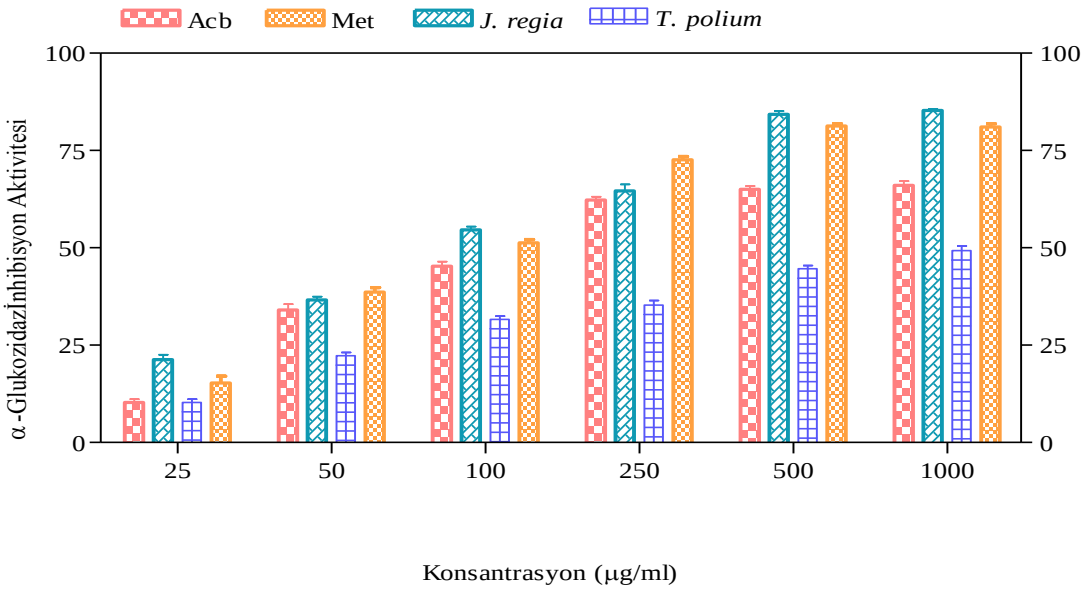
J. regia ve *T. polium* bitkilerinin etanol:su ekstraktlarının α-amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri 25-1000 µg/ml konsantrasyonda çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *J. regia* % 8.6±1.5-36.3±2.08, *T. polium* % 5.6±1.15 ve pozitif konrol olarak kullanılan akarboz % 16.3±53.0 olarak hesaplandı.



Şekil 4.11. *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin α-amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri. akarboz pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.12. α-Glukozidaz İnhibisyonu

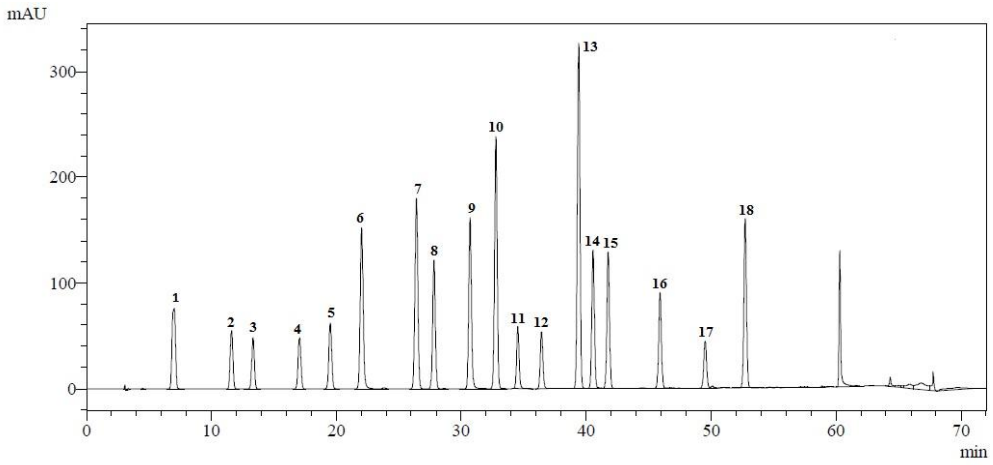
J. regia ve *T. polium* bitkilerinin etanol su ekstraktlarının α-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri 25-1000 µg/ml konsantrasyonda çalışıldı. Bu konsantrasyon aralığında *J. regia* % 21.3±2.08-85.3±0.5, *T. polium* % 10.3±1.5-49.3±2.1 ve pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz % 11.3±1.5-66.0±2.0 ve metformin % 15.3 ±3.05-81.3±1.5 olarak hesaplandı.



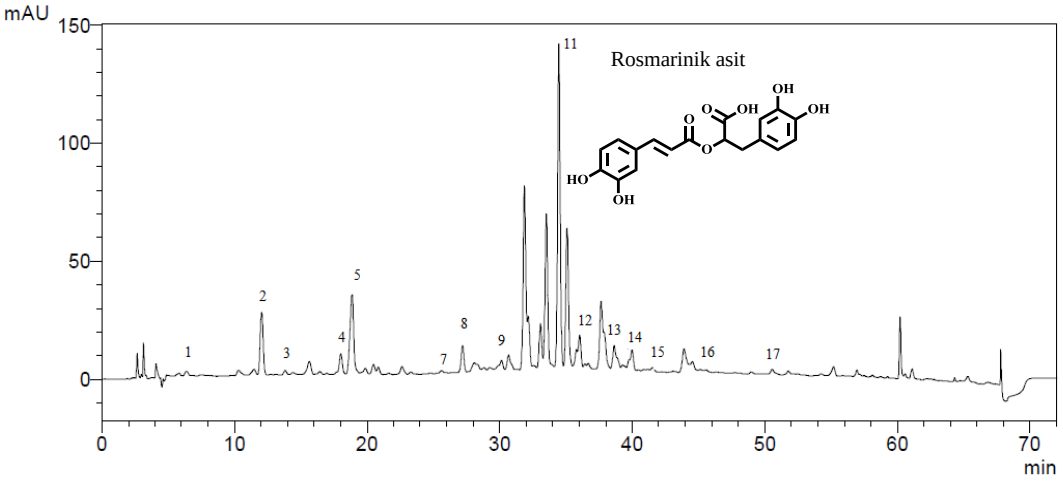
Şekil 4.12. *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin α-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri. akarboz ve metformin pozitif kontrol olarak kullanıldı. Her noktada bulunan değer üç deney sonucunun ortalaması ve ± standart sapmalar (SD) hesaplanarak verilmiştir (n=3)

4.13. HPLC Analizi Sonuçları

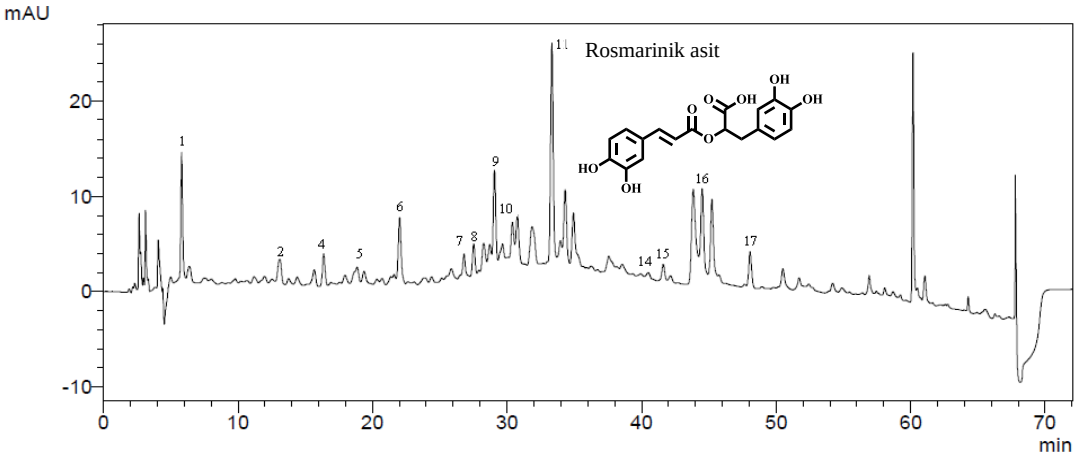
J. regia ve T. polium ekstraktlarının yapısında bulunan fenolik ve flavonoidlerden bazıları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kalitatif ve kantitatif olarak tayin edildi (Şekil 4.13.2 ve 4.13.3.). HPLC analizi için öncelikle 18 farklı fenolik bileşik standardının kalibrasyon grafiği çizilerek analiz metodu geliştirildi (Şekil 4.13.1). Analizi yapılan bileşenler ve bu bileşenlerin her birinden ekstraktlarda ne kadar bulunduğu Tablo 4.8.'de gösterilmektedir. Sonuçlar mg/g olarak %95 güven aralığı ile verildi.



Şekil 4.13.1. Standart kromatogram



Şekil 4.13.2. *J. regia'*nın HPLC kromatogramı (Pikler 254 nm'de tespit edildi).



Şekil 4.13.3. *T. polium*'un HPLC kromatogramı (Pikler 254 nm'de tespit edildi).

Tablo 4.8. *J. regia* ve *T. polium*'un yapısında bulunan fenolik bileşenlerin konsantrasyonu

			Örneklerin Konsantrasyonları	
Standartlar		R.T.	*J. regia* (µg/g)	*T. polium* (µg/g)
1	Gallik asit	7.005	0.507	0.522
2	Prokateşik asit	11.581	6.191	0.247
3	Prokatekol	13.311	1.940	*
4	p-OH-benzoik asit	17.000	1.165	0.363
5	Vanilik asit	19.467	9.265	0.360
6	Vanilin	21.983	*	1.413
7	p-kumarik asit	26.341	0.352	0.294
8	Ferrulik asit	27.759	0.859	0.700
9	Kumarin	30.661	3.430	1.053
10	t-OH-sinamik	32.718	*	2.167
11	Rosmarinik asit	34.480	25.148	9.282
12	Fisetin	36.377	3.175	*
13	t-Sinamik	39.393	0.280	*

14	Naringenin	40.505	1.004	0.199
15	Hesperidin	41.722	0.283	0.203
16	Apigenin	45.866	0.301	2.094
17	Rahmettin	49.486	0.280	1.064
18	Krisin	52.683	*	*

*: tespit edilemedi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çok eski yıllardan beri hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanılmakta olup günümüzde bitki içerikli ilaçlara yönelim artmıştır. Sentetik ürünlerin sağlığa zararlı yan etkileri ve bitkilerin kolay elde edilebilir olmaları, bu yönelimin başlıca sebepleri olarak görülmektedir. Halk arasında değişik hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılan birçok bitkinin, kullanım amacına uygun olup olmadıklarının saptanması amacıyla tüm dünyada çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaktadır. Sayısız epidemiyolojik ve beslenme ile ilgili olan çalışmalar göstermiştir ki bitkilerin yapısında bulunan polifenoller diyabet, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif gibi hastalıkların önlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (Andrae-Marobela ve ark. 2013, Shen ve ark. 2013, Xiao ve ark. 2014).

Bu çalışmayla ülkemizde halk arasında hipoglisemik olarak yaygın kullanılan *J. regia (ceviz yaprağı), T. polium (acıyavşan, meryemhort), P. longum (darıfülfül), R. ribes (uçkun, ışgın), A. graveolens (kereviz tohumu), A. absinthium (acı pelin otu) C. babylonica (mardin küşütü), A. millefolium (civanperçemi)* bitkilerinin antioksidant ve antidiyabetik özellikleri araştırılarak literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Diyabette okdidatif stresin artmasıyla serbest radikallerin miktarında artış meydana gelmektedir. Bundan dolayı bu çalışmada öncelikli bitkilerin serbest radikalleri söndürme etkileri araştırıldı. Bu amaçla bitki ekstraktlarının hidroksi radikali gibi reaktif oksijen türlerini, DPPH ve ABTS gibi sentetik radikalleri söndürme etkileriyle beraber lipid peroksidasyonu, DNA ve protein oksidasyonu üzerine etkileri de incelendi. Antioksidant deneyler sonucunda en iyi aktiviteyi gösteren *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin antidiabetik etkileri araştırıldı. Bu amaçla yapılan çalışmada bitki ektraktlarının BSA-glukoz model sisteminde glikasyon son ürünleri olan AGE'ler üzerine inhibe edici özellikleri ve karbohidrat sindiriminde görev alan α-amilaz ve α-glukozidaza karşı inhibisyon etkileri araştırıldı. Aynı zamanda bu iki ekstraktın HPLC analizleri yapılarak antioksidant aktivitelerinden sorumlu olabilecek fenolik bileşenler tayin edilmeye çalışıldı.

5.1. Antioksidant Aktivite

Oksidatif stres nörolojik hastalıkların, kalp hastalıkların ve diyabetin kritik bir bileşenidir (Lee ve ark. 2001). Antioksidantlar moleküllerin oksidasyonunu önleyerek hücreleri oksidatif strese karşı korurlar (Reuter ve ark. 2010). Vücutta bulunan bazı antioksidantlar glutatyon (GSH), vitamin C ve E, antioksidant enzimler olan katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz hücreleri oksidatif stresin oluşturacağı hasarlara karşı korur (Mari ve ark. 2010). Diyetle alınan antioksidantlar vücudun bu antioksidant savunma sistemine katkıda bulunur ve hastalıklara karşı koruma sağlar.

Reaktif oksijen türleri (ROS) hücresel metabolizma ve ekzogenus ajanlar tarafından hücre içinde üretilir. Oluşan ROS'lar karbohidratlar, proteinler, lipidler ve DNA gibi biyolojik makromoleküller üzerinde oksidatif hasara neden olurlar. Kardiyovasküler, nörolojik hastalıklar, diyabet ve inflamasyon gibi hastalıklara neden olurlar (Ames 1983).

Antioksidantlar Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyerek ya da serbest radikalleri söndürerek etki ederler. Küçük moleküller serbest radikalleri nötralize eder, enzimler serbest radikallerin reaksiyonlarını inhibe eder, metal şelatlayıcılar katalitik olarak aktif olan demir iyonlarını tutar ve daha fazla serbest radikal oluşumunu engeller (Halliwell ve Gutteridge 1995).

5.1.1.Total Fenolik ve Flavanoid Bileşen Miktarları

Fenolik maddeler doğal antioksidantların en önemli gruplarını oluştururlar ve güçlü radikal zincir kırıcı antioksidantlar olarak bilinirler. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir.

Flavonoidlerin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği, radikal söndürücü özelliğinin olduğu ve antiglikasyon aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Pietta, 2000). Stefek (2011), flavanoidlerin diyabette katarakt oluşum riskini azaltığını ileri sürmüştür.

Çalışmada kullanılan bitkilerin etanol:su ekstraktlarının içerdiği toplam fenolik bileşen miktarı gallik aside, toplam flavonid bileşen miktarı ise Quercetine eşdeğer olarak hesaplandı (Tablo 4.2.). Bitkiler, fenolik bileşen miktarlarına göre *J.*

regia>R. ribes> T. polium>C. babylonica>A. graveolens>A. millefolium>P. longum>A. absinthium olarak sıralayabiliriz. Total flavonoid bileşen miktarlarına göre ise *J. regia>T. polium> A. graveolens>C. babylonica>A. absinthium>P. longum>A. millefolium>R. ribes* olarak sıralanmaktadır.

J. regia bitkisinin en yüksek fenolik ve flavonoid bileşen miktarına sahip olduğu tespit edildi. *J. regia* 'nın 1 mg'ın içerdiği fenolik bileşen 287.40 μg GAE ve flavonoid miktarı ise 55.2 μg QUE eşdeğer olarak bulundu. *T. polium*'un 114.4 μg GAE ve flavonoid miktarı ise 28.5 μg QUE eşdeğer olarak hesaplandı.

Ardestani ve ark. (2007a), *T.polium* bitkisinin etanol ektraktının total fenolik miktarını gallik asite ekivalent olarak 180.2 ±7.5 mg GAE/g ekstrakt ve flavonoid miktarı ise katekine eşdeğer olarak 135.2 ±4.9 mg katekin/g extrakt, etilasetat ektraktının ise total fenolik miktarını 268.2 ±8.2 mg GAE/g ekstrakt ve flavonoid miktarı ise 197.4 ±10.4 mg katekin/g ekstrakt olarak tespit ettiler.

Oliveira ve ark. (2008) *J. regia*'nın su ektraktının total fenolik miktarını gallik asite ekivalent olarak 74.1 mg GAE/g ekstrakt olarak hesapladılar.

Doğal antioksidantların yapısında bulunan polifenoller, bitki türü, tarımsal proses, ışık, iklim, hasat zamanı ve depolama şartları gibi pek çok dış etkenden etkilenir (Heimler ve ark. 2007). Ayrıca çözücü ve ekstraksiyon işlemlerinin farklılığı da fenolik bileşiklerde gözlenen miktar değişikliklerinden sorumludur.

Polifenollerin, antioksidant özelliklerinin moleküler temeli üç mekanizma ile açıklanmıştır (Şekil 5.1.) (Leopoldini ve ark. 2004a, 2004b, Leopoldini ve ark. 2004, Wright ve ark. 2001).

Birinci mekanizmada; primer antioksidant polifenoller (ArOH), serbest radikale ($R^{\cdot}$) bir hidrojen atomu transfer ederek etkisiz hale getirir (HAT) (1) ve daha az zararlı $ArO^{\cdot}$ radikali meydana gelir.

$$ArOH + R^{\cdot} \longrightarrow ArO^{\cdot} + RH \qquad (1)$$

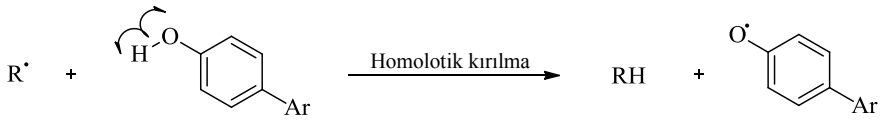
İkinci mekanizmada; ArOH, $R^{\cdot}$ radikaline bir elektron vererek daha az zararlı $ArOH^{+\cdot}$ katyon radikalini oluşturur (SET) (2).

$$ArOH + R^{\cdot} \longrightarrow Ar\overset{+\cdot}{O}H + R^{-} \qquad (2)$$

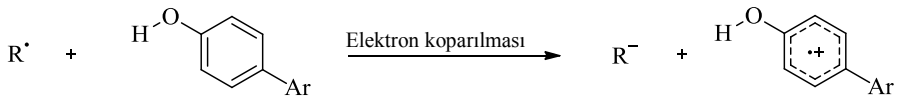
Üçüncü mekanizmada; serbest radikal oluşumuna katılan geçiş metalleri polifenoller tarafından şelatlanarak kararlı kompleks bileşikler meydana gelir (TMC) (3). Böylelikle H_2O_2 ile metal iyonu arasında olan Fenton reaksiyonu sonucu oluşan ·OH radikali oluşumu engellenir (Monica ve ark. 2011).



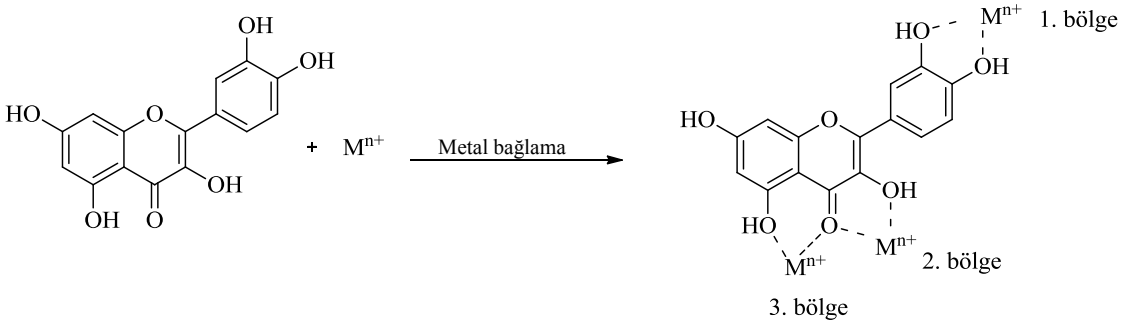
1. Hidrojen atomu transferi (HAT)



2. Tek elektron transferi (SET)



3. Geçiş metallerinin şelatlanması (TMC)



Şekil 5.1.1. Polifenollerin antioksidant mekanizmaları

5.1.2. DPPH Radikalini Söndürme Etkisi

Antioksidant maddelerin DPPH radikalini söndürme etkileri, kendi hidrojenlerini radikale verebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. DPPH serbest kararlı bir radikaldir, 1 elektron veya hidrojen alarak kararlı diamagnetik bir moleküle

dönüşür. DPPH radikalini söndürme aktivitesi diğer metotlara kıyasla antioksidant aktiviteyi kısa zamanda kıyaslayabilme imkanı sağladığından daha yaygın kullanılmaktadır (Gulçin ve ark. 2004).

DPPH radikalini söndürme aktivitesinde 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Tüm bitki ekstraktları maksimum aktiviteye 250 µg/ml konsantrasyonda ulaştı bu noktadan sonra konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir artış gözlemlenmedi. Bitki ekstraktlarının 500 µg/ml konsantrasyonda DPPH radikalini söndürme aktiviteleri *J. regia* % 86.3, *T. polium* % 85.3, *A. millefolium* 85.3, *R. ribes* % 92.6, *A. absinthium* % 76.6, *A. graveolens* % 90.3, *P. longum* % 80.6, *C. babylonica* % 74.6 ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 85.2, BHT ise % 84.3 olarak hesaplandı. Tüm ekstraktların güçlü DPPH radikalini söndürme aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3.).

Bitki ekstraktlarının serbest radikalleri tutması, bu ekstraktların içinde bulunan fenolik maddelerin serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürdüğünü göstermektedir. DPPH ve fenoller arasındaki reaksiyonun HAT (1) veya SET (2) mekanizmaları ile ilerlediği kabul edilir (Musialik ve Litwinienko 2005).

Ardestani ve ark. (2007), *T. polium*' un etanol ekstraktının DPPH radikalini söndürme aktivitesini IC_{50}=48.9 µg/ml ve etilasetat ekstraktının ise IC_{50} = 9.8 µg/ml olarak buldular.

Periara ve ark. (2007), *J. regia* 'nın beş farklı türünün DPPH radikalini söndürme aktivitesini, Lara; IC_{50}=0.151 mg/ml Franquette; IC_{50}=0.156 mg/ml Mellanaise; IC_{50}=0.195 mg/ml Mayette; IC_{50}=0.187 mg/ml Parisienne; IC_{50}=0.170 mg/ml Marbot; IC_{50}=0.202 mg/ml olarak hesapladılar.

5.1.3. ABTS Radikalini Söndürme Etkisi

Antioksidant maddelerin $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonuna elektron veya hidrojen atomu vererek renksizleştirme temeline dayanır.

Bitki ekstraktlarının ABTS radikali söndürme etkisi de çalışıldı. ABTS radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı (Şekil 4.5). Bitki ekstraktlarının 75 µg/mL konsantrasyonda ABTS radikalini söndürme aktiviteleri, *J. regia* % 94.3, *T. polium*; % 90.0, *A. millefolium;* % 65.6, *R.*

ribes; % 80.0, *A. absinthium*; % 64.3, *A. graveolens*; % 66.6, *P. longum*; % 48.0, *C. babylonica*; % 63.3 ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit; % 90.3, BHT % 96.6, Trolox; % 90.3 ve quercetine; % 90.3 olarak hesaplandı.

Pozitif kontrollerle kıyaslandığında en iyi ABTS radikalini söndürme aktivitesini *J. regia* gösterdi. 100 μg/ml konsantrasyonda *J.regia* % 100 yakın bir aktivite gösterdi.

Kumar ve ark. (2006), pudina ekstraktının (nane türü) ABTS radikal söndürme etkisini metanol ekstrakta IC_{50}=11.9 μg/ml, butanol fraksiyonunda IC_{50}=4.05 μg/ml olarak olarak; DPPH radikal söndürme aktivitesini ise metanol ekstrakta IC_{50}=17.46 μg/ml, butanol fraksiyonunda IC_{50}=7.47 μg/ml olarak hesapladılar.

5.1.4. İndirgeme Gücü

Fenton reaksiyonunda Fe^{2+}, H_2O_2 ile reaksiyona girerek, biyomoleküler üzerinde çok zararlı bir radikal olan hidroksi radikalini oluşturur. Fe^{2+}, Fe^{3+}'e yükseltgenir. Birçok indirgen tarafından demirin yükseltgenmiş formu (Fe^{3+}) indirgenmiş formuna (Fe^{2+}) dönüşür ve bu olay hidroksi radikallerinin oluşumunun artmasına neden olur.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$

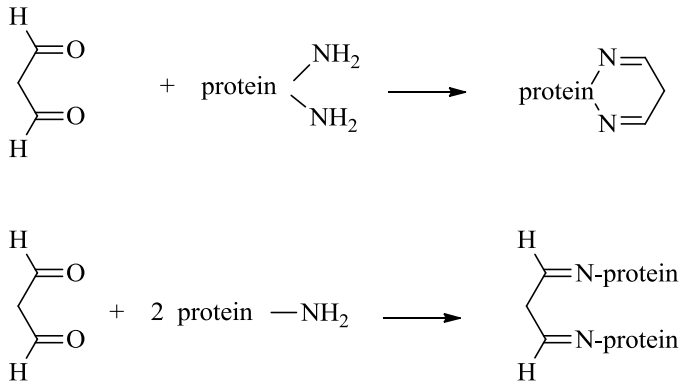
Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının indirgeme özellikleri BHT ve BHA ile kıyaslandı. Bitki ekstraktların indirgeme potansiyelleri konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdi. İndirgeme güçleri pozitif kontrol olarak kullanılan BHA ve BHT ile kıyaslandığında bitki ekstraktlarının indirgeme potansiyelleri daha düşük bulundu. İndirgeme potansiyelleri BHT>BHA>*J. regia*>*A. millefolium*> *T. polium*> *A. absinthium* (Şekil 4.4.1.) ve BHT>BHA>*R. ribes*>*P. longum*> *A. graveolens*> *C. babylonica* olarak sıralanır (Şekil 4.4.2.).

5.1.5 Hidroksi Radikalini Söndürme Aktivitesi

Deoksiriboz metodu ile bitki ekstraktlarının Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde hidroksi radikalini söndürme aktivitesi incelendi. Hidroksi radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (Şekil 3.5.). Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve

532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Wang ve Liang 2003) (Şekil 5.2.) Ortama radikal söndürücü bir madde ilave edildiği zaman bu radikal deoksiriboz ile yarışmalı olarak hidroksi radikali ile etkileşir ve MDA oluşumunu azaltır.

MDA; membrandaki iyon alışverişi sırasında görev yapan Na^+K^+-ATPaz enzimini inaktive edebilir, proteinlerin amin grupları ile Schiff bazı oluşturarak ya da tiyol grupları ile etkileşerek proteinlerin çapraz bağlanmasına neden olabilir (Şekil 5.1.). DNA bazları ile etkileşerek DNA-DNA zincirinde çapraz bağlanma veya DNA-protein çapraz bağlanma yapabilir.



Şekil 5.1.2. MDA'nın proteinlerle etkileşmesi

Bitki ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. Tüm bitki ekstraktlarının OH radikalini söndürme aktivitesi gösterdi. OH radikalini söndürme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı olarak ciddi bir artış gözlemlenmedi. 500 µg/ml konsantrasyonda bitkilerin hidroksi radikalini söndürme aktivitesi *J. regia* % 84.0, *T. polium*; % 83.0, *A. millefolium;* % 76.6, *R. ribes*; % 66.5, *A. absinthium*; % 78.6, *A. graveolens*; % 74.6, *P. longum*; %71.3, *C. babylonica*; % 71.0 ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 80.6–83.08, BHT ise % 82.0 olarak hesaplandı.

5.1.6. Lipit Peroksidasyonunu Önleme Aktivitesi

Serbest radikaller özellikle oksijen kaynaklı olanlar hücre membrandaki polidoymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu artırırlar. Lipit peroksidasyonunun artması, membran akışkanlığını bozarak membrana bağlı enzim ve

reseptörlerin aktivitesinin değişmesine neden olur. Antioksidant özelliği olan maddeler bu hasarın tamamen veya kısmen önlenmesine yardımcı olurlar (Majid ve ark. 2010).

Antioksidantlar lipit peroksidasyonunda farklı şekillerde etkili olurlar; lokalize olmuş oksijen konsantrasyonunu azaltırlar, hidrojen atomu koparark lipit peroksidasyonunu başlatan radikalleri söndürürler, peroksit oluşumunu önlemek için singlet oksijeni tutarlar, reaktif türlerin oluşumunu engellemek için oksidayonu katalizleyen metal iyonlarını tutarlar, yağ asitlerinin yan zincirlerinden fazla hidrojen koparılmasın diye zincir kırarlar (Bakırel ve ark. 2003).

Diyabette serbest radikal aktivitesinde artış olduğunda ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların sıklığında artış gözlenmektedir. Lipit peroksitler, serbest radikaller ile oluşur ve aterosklerotik damar hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynarlar. Diyabetik hastalarda hiperglisemi ve hiperlipidemi ile lipit peroksitlerin seviyesi arasında ilişki bulunmaktadır (Altomore ve ark. 1992, Kesavulu ve ark. 2000). Bu amaçla bitkilerin lipit peroksidasyonu inhibisyon özellikleri dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasında bitki ekstraktlarının lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi sıçan karaciğeri homojenatı üzerinde *in vitro* olarak araştırıldı. Lipit peroksidasyonunu önleme aktivitesi incelenirken 50-500 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışıldı. 500 µg/mL konsantrasyonda *J. regia* % 67.0, *T. polium* % 65.6, *A. millefolium* % 53.2, *R. ribes*; % 62.6, *A. absinthium*; % 43.7, *A. graveolens*; % 41.9, *P. longum*; % 62.6, *C. babylonica*; % 45.8 ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 62.4, BHT ise % 62.6 aktivite gösterdi. Pozitif kontrollerle kıyaslandığında *J. regia* daha yüksek aktivite göstermektedir.

5.1.7. DNA Kesimi Önleme Etkisi

Hidrojen peroksitin UV ile etkileşmesi sonucu oluşan OH radikalinin DNA üzerine oksidasyon etkisi pBluescript M13+ plazmid DNA kullanılarak Agaroz Jel Elektroforezi ile incelendi (Pietta 2000). Agaroz jelde DNA üç formda bulunur; supercoiled DNA (süper kıvrımlı çembersel DNA; kırık yok, Form I), open circular DNA (tek zincir kırığı içeren çembersel DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık var, Form II) ve linear DNA (doğrusal DNA, iki zincirde de bir veya birden fazla kırık, Form III). Agaroz Jel Elektroforezinde bu formlar farklı hızlarla hareket ederler. Form

I, yük yoğunluğu fazla hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eder. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II'nin arasında bir hıza sahiptir.

Kontrol DNA'nın supercoiled formunun yüzdesi (%) 100'dür. H_2O_2 fotolizi sonucu DNA'nın supercoiled formunun tamamının linear ve open circular forma dönüştüğü tespit edildi. Bu yüzden supercoiled DNA formunun yüzdesi aynı zamanda % inhibisyon değeri olarak alındı. Bitki ekstraktlarının 500 µg/ml konsantrasyonda DNA kesimini önleme etkileri *J. regia* % 96.73 ve *T. polium* % 95.49 (Şekil 4.8.2) (tablo 4.4.). *R. ribes* % 97.23 ve *A. graveolens* % 95.42 (Şekil 4.8.3.) (Tablo 4.5.), *P. longum* % 96.32 ve *C. babylonica* % 98.23 (Şekil 4.8.4.) (Tablo 4.6.) *A. millefolium* % 86.28, *A. absinthium* % 96.43 (Şekil 4.8.5.) (Tablo 4.7) olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 40.33, ve BHT % 66.57 olarak bulundu (Şekil 4.8.1.) (Tablo 4.3). Bitki ekstraktlarının pozitif kontrollerden daha güçlü hidroksi radikalini söndürme aktivitesi gösterdiği belirlendi.

5.1.8. Protein Oksidasyonunu Önleme Etkisi

Bir protein molekülünün bütün amino asit kalıntıları hidroksi radikalleri için potansiyel hedefdir. Proteinler metal iyonları katalizörlüğünde serbest radikaller tarafından oksidasyona oldukça hassastır. Aneorobik koşullar altında hidroksi radikali proteinlerlerde intrasellular ve intersellular olarak S-S bağları arasında çapraz bağlanma yapar. Aerobik koşullar altında, hidroksi radikali bazı amino asit kalıntılarının peptit bağını kırarak peptit zincirinin parçalanmasına neden olur (Davies ve ark. 1987)

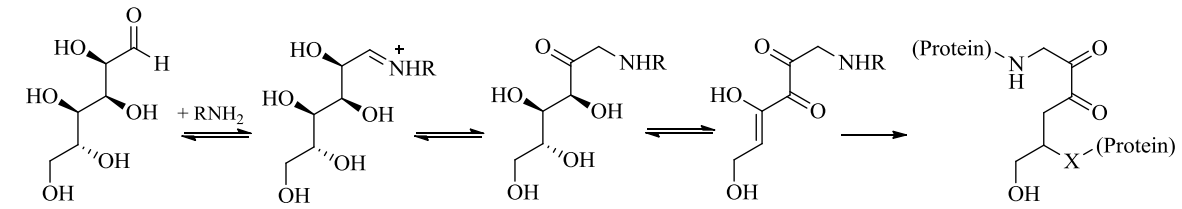
BSA'nın oksidatif hasarı SDS-PAGE elektroforezi (%10 poliakrilamid jel, % 0.1 SDS içeriyor) ile tespit edildi. Fenton reaksiyonu [$FeCl_3$ (1 mM), H_2O_2 (2.5 mM), EDTA (3 mM) ve askorbik asit (1 mM)] ile BSA oksidasyonu oluşturuldu ve bitki ekstraktlarının BSA proteinini oksidasyondan koruma etkileri araştırıldı. 500 µg/ml konsantrasyonda BSA'yı hidroksi radikaline karşı koruma etkileri sırasıyla *J. regia* % 97.4 (Şekil 4.9.3.) *T. polium* % 78.5 (Şekil 4.9.4), ve *A. graveolens* % 65.4 (Şekil 4.9.5.), *P. longum* % 67.3 (Şekil 4.9.6.) *C. babylonica* % 93.2 (Şekil 4.9.7.), *A. millefolium* % 86.3, (Şekil 4.9.8.), *R. ribes* % 77.9 (Şekil 4.9.9.), *A. absinthium* % 93.2

(şekil 4.9.10.) olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHA % 67.3 (Şekil 4.9.1.) ve BHT % 75.7 (Şekil 4.9.2.) olarak bulundu (Tablo 4.3).

Hidroksi radikalinin (·OH); DNA'da, lipitlerde, deoksiriboz şekerde ve proteinlerde oluşturduğu hasara karşı çalışılan tüm bitki ekstraktlarının önemli inhibisyon etkilerinin olduğu tespit edildi. Bu inhibisyon etkisi ekstraktların yapısında bulunan polifenollerin (HAT) (1) veya (SET) (2) veya TMC (3) antioksidant mekanizmalarından (Şekil 5.1.) bir veya birkaçını kullanarak gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

5.2. Antiglikasyon Aktivite

Nonenzimatik glikasyonunun erken basamağında indirgen şeker ile proteinin amino grubu reaksiyona girerek schiff bazı oluşur, schiff bazı ketoaminlere dönüşerek Amadori ürünleri meydana gelir. Amadori ürünlerinin yeniden düzenlenmesiyle AGE ürünleri oluşur (Şekil 5.2.) Diyabetin tüm komplikasyonlarından, nöropatiden, Alzhheimer's hastalığından, vasküler hastalıklardan, böbrek yetmezliğinden ve yaşlanmadan AGE ürünleri sorumlu olduğu düşünülmektedir (Harding ve Ganea 2006).



Şekil 5.2.1. AGE oluşumu

Glikasyon süreci esnasında indirgen şekerlerdeki karbonil veya dikarbonil gruplarının bloke edilmesi ile schiff bazı veya amadori ürünlerinin oluşumu engellenebilir aynı zamanda glikasyona bağlı oluşan serbest radikallerin söndürülmesi de erken basamaklarda glikasyonun önlenmesinde önemli bir stratejidir.

AGE inhibitörlerinin araştırılması özellikle düşük yan etkileri olan doğal anti-AGE ajanların geliştirilmesi diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde veya gecikmesinde potansiyel bir terapötik yaklaşımdır. Anti-AGE ajanlar indirgen şekerin

karbonil grubunu bloke ederek amadori ürünlerinin ve reaktif karbonil türlerinin oluşumunu inhibe eder ve dolayısıyla AGE oluşumunu önlerler (Lo ve ark., 2005).

5.2.1. Total AGE Floresans Yoğunluğu

Protein glikasyonu Schiff bazı oluşumuyla başlar ve saatler içerisinde gerçekleşir ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşür ve Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGE'lere dönüşmektedir.

BSA-glukoz sistemi 37 ^{o}C'de 21 gün inkübe edildi. *J. regia* ve *T. polium* 'un AGE oluşumu üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. BSA-glukoz ve BSA-GO sisteminde total AGE oluşumu, AGE ürünlerinin sırasıyla 370 nm'de uyarılma ve 440 nm'de yayılma floresansları kullanılarak ölçüldü. Aminoguanidin (AG) ve Quercetin (QUE) pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon süresi artıkça floreans yoğunluğunda artış gözlemlendi. Kontrol BSA ile kıyaslandığında BSA-glukoz inkübasyonunun floresans yoğunluğu 21. günde 10 kat artış gösterdi (Şekil 4.10.1.).

J. regia (500 μg/ml)' nın BSA-Glc glikasyon sisteminde AGE inhibisyonu yüzdesi; 7. gün: % 62.8, 14. gün: % 78.4 ve 21. gün: % 86.3 olarak ve *T. polium* (500 μg/ml)' un ise; 7. gün: % 15.2, 14. gün: % 36.2 ve 21. gün: % 43.4 olarak hesaplandı..

*J. regia'*nın güçlü AGE inhibisyon etkisi yapısında bulunan fenoliklerin glikasyonu önleme mekanizmaları ile açıklanabilir; antioksidant olarak davranırlar ve glukozun otooksidasyonunu önlerler, serbest radikalleri söndürürler, metal şelatlayıcıdırlar ya da reaktif dikarbonil gruplarını bloke ederler.

Metilglioksal/glioksal, Glikolitik yolla glisealdehit 3-fosfat ve dihidrokiasetondan nonenzimatik yolla oluşmakta ve diyabette miktarı artmaktadır. Proteinlerin amino grubu ile reaksiyona girerek AGE oluşumuna ve diyabet komplikasyonlarının gelişmesine neden olur. Aminoguanidinin BSA-GO glikasyon sisteminde AGE inhibisyonu; 7. gün: % 87.5, 14. gün: % 90.4 ve 21. gün: % 90.8 olarak; BSA-Glc sisteminde ise 7. gün: % 69.6, 14. gün: % 79.7 ve 21. gün: % 79.5 hesaplandı. Aminoguanidinin primer etki mekanizması 3-DG ve MGO ile reaksiyona girerek karbonil gruplarını bloke ederek triazin türevlerini oluşturması ile açıklanmıştır. AGE oluşumunu ve diyabet komplikasyonlarının gelişmesini önler

ancak bununla birlikte insan sağlığına toksik yan etkileri mevcuttur (Appel ve ark. 1999, Raskin ve ark. 1999)

5.2.2. NBT İndirgenmesi

Protein glikasyonunda Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken, daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür. Glikasyon, özellikle erken dönemlerde daha fazla olmak üzere konsantrasyon bağımlıdır, bu sebeple diyabette yapımı artar (Singh ve ark. 2001). Glikasyonun erken basamaklarında oluşan Amadori ürünlerinin inhibe edilmesi protein glikasyonunun önlenmesinde önemli bir yaklaşımdır.

Protein glikasyonunun erken basamaklarında oluşan Amadori ürünleri alkali ortamda NBT'yi indirgeyerek 530 nm'de absorbans veren mor renkli bir bileşik oluşur. BSA-glukoz sisteminde glikasyon derecesi 0, 7, 14 ve 21. günlerde gittikçe artmakta ve oluşan Amadori ürünleri tarafından NBT'nin indirgenmesi de zamana bağlı olarak artış göstermektedir (Şekil 4.10.2.1)

BSA-GO glikasyon sisteminde Amadori ürünlerinin oluşumu şekil 4.10.2.2.1 de gösterilmektedir. İnkübasyon süresi (gün) artıkça absorbans değerleri artmaktadır. Aminoguanidin fruktozamin oluşumunu önemli bir şekilde azaltmaktadır.

J. regia ve *T. polium*, BSA-glukoz inkübasyon sisteminin 21. gününde fruktozamin oluşumunu (Şekil 4.10.2.3.) sırasıyla 500 μg/ml konsantrasyonda % 54.4 ve % 43.7 inhibe etmektedirler. Pozitif kontroller AG (3mM) ve QUE (500 μg/ml) ise ise sırasıyla % 63.6 ve % 77.3 inhibisyon gösterdi.

5.2.3. α-Dikarbonil Oluşumunun İnhibisyonu

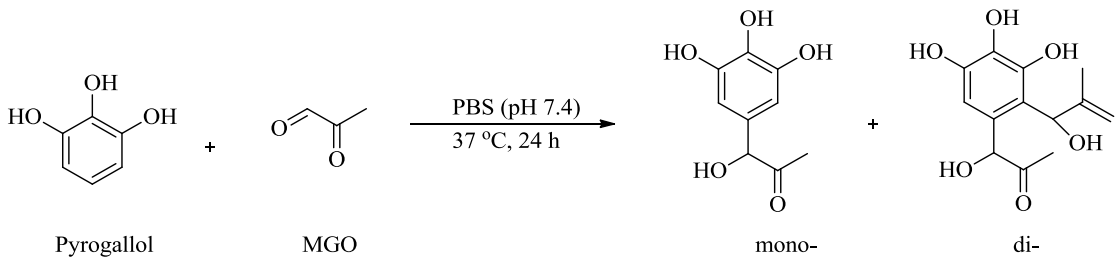
Birçok çalışma, dikarbonil bileşiklerinin proteinler ile çapraz bağlanmalar yaparak kararlı AGE'ler oluşturduğunu göstermektedir (Meade ve Gerrard 2002). Dikarbonil bileşiklerinin bloke edilmesi ile AGE ürünlerinin oluşumu engellenebilir.

BSA-glukoz sisteminde α-dikarbonil oluşumu şekil 4.10.3.3.'te gösterilmektedir. BSA-Glukoz sisteminin 21. gününde α-dikarbonil oluşumunu *J. regia* ve *T. polium* sırasıyla 500 μg/ml konsantrasyonda % 51.3 ve % 43.7 inhibe etmektedir (Şekil 4.10.3.3 ve Şekil 4.10.3.4.). Pozitif kontrol olarak kullanılan AG

(3mM) ile QUE (500 μg/ml) ise sırasıyla % 71.2 ve % 67.4 inhibisyon etkisine sahiptir.

Li ve ark. (2014), **Quercetin'in** BSA-MGO/GO sisteminde AGE oluşumunu önleyici etkisini araştırdılar. BSA-MGO sisteminin 24. saatinde quercetinin inhibisyon etkisinin % 91, BSA-GO sisteminin 30 günlük inkübasyonu sonucunda ise inhibisyon etkinin % 76.8 olarak tespit ettiler. Ayrıca GO ile AGE oluşumunun MGO' ya göre daha yavaş olduğunu ileri sürdüler.

Shao ver ark. (2014); beş basit fenolik bileşiğin; gallik asit, pirogallol, resorkinol, ploroglukinol, pirokatekol'un MGO söndürme etkisini araştırdılar. 24 saatlik inkübasyon sonunda pirogallol MGO' daki karbonil gruplarını bloke en yüksek inhibisyon etkiyi (% 90) gösterdi (Şekil 5.5.). Resorkinol ve pirokatekol sırasıyla % 31.6 ve % 21.8 inhibisyon ve gallik asit ise en düşük MGO inhibisyonu (% 14) gösterdi.



Şekil 5.2.2. Metilglioksal'ın Pirogallol ile Reaksiyonu

5.2.4. Glikolizlenmiş Proteinin SDS-PAGE Karakterizasyonu

Glikasyonun ileri basamağında oldukça reaktif olan DG, proteinde lizin kalıntısı ile reaksiyona girerek pentosidin veya diğer AGE'leri oluşturur. Sonuç olarak proteinde intermoleküler ve intramoleküler heterosiklik çapraz bağlanmalar ve parçalanma meydana gelir, geri dönüşümsüz protein hasarı ve denatürasyonu oluşur.

BSA-glukoz sisteminde inkübe edilen örneklere SDS-PAGE protein jel elektroforezi uygulanarak glikasyona uğramış proteinin karakterizasyonu yapıldı. Glikolizlenmiş BSA bandı jelde 97 kDa civarında gözlemlendi (Şekil 4.10.4.2.a). İnkübasyon süresi (gün) artıkça glikolizlenmiş BSA bant yoğunluğunun artığı görüldü. Bu sonuç glikasyonun ileri evresinde oluşan AGE ürünlerinin proteine bağlanarak

denatürasyon oluşturduğunu göstermektedir. Bant yoğunluğu; glikasyona uğramış BSA bandının yoğunluğunun, orijinal BSA bant yoğunluğuna oranıyla tespit edildi (glc-BSA/ori BSA) (Şekil 4.10.4.1.b).

J. regia ve *T. polium* bitkilerinin pozitif kontrollerle kıyaslandığında, glikolizlenmiş BSA bant yoğunluğunu ılımlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmektedir (Şekil 4.10.4.2 ve Şekil 4.10.4.3.) Pozitif kontrol olarak kullanılan AG ve QUE ise glikolizlenmiş BSA bant yoğunluğunu etkili bir şekilde azaltmaktadırlar. (Şekil 4.10.4.2. ve Şekil 4.10.4.5.)

Wang ve ark (2011), BSA-fruktoz sisteminde glikasyona uğramış BSA proteinini SDS-PAGE ile analiz edip glikolizlenmiş BSA bandını jelde 97 kDa civarında gözlemleyip bant yoğunluğunun zamana bağlı olarak arttığını tespit ettiler.

Glikasyon kaynaklı oksidatif stresin artışı ve antioksidant kapasitenin azalması diyabetin komplikasyonlarının en önemli sebebidir. Antiglikasyon ve antioksidant özelliği olan bileşikler glikasyon kaynaklı komplikasyonları ve serbest radikallerin sebep olduğu toksisiteyi önlerler. Antiglikasyon aktivitesi olan bitkilerin bu özelliği antioksidant etkilerinden kaynaklanabilir.

Sonuçlar göstermektedir ki, Ceviz yaprağı (*J.regia*) ve Acı yavşan otu (*T.polium*) AGE oluşumunun her üç basamağında da inhibisyon etkisine sahiptirler. Amadori ürünlerinin oluşumunun inhibisyonunda, dikarbonil bileşiklerinin indirgenmesinde ve son olarak glikasyon kaynaklı protein hasarının önlenmesinde etkili oldukları gözlemlendi. *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin non-enzimatik protein glikasyonunu önleyici etkileri yapılarında bulunan antioksidant özelliğe sahip polifenollerin glikasyonu önleme mekanizmalarından (Şekil 1.5.) biri veya birkaçına sahip olmasından kaynaklanabilir.

5.3. Anti-diabetik Aktivite

5.3.1. α-Amilaz ve α-Glukozidaz Enzim Aktivitesi

Fenolik bileşiklerin proteinlere bağlanarak enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği bilinmektedir. Birçok tıbbi bitkinin ve şifalı otların α-amilaz ve α-glukozidaz enzim aktivitesini inhibe edici özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Şuan tıbbi olarak kullanılan antidiabetik ilaçlardan nojirimycin ve 1-deoksinojirimycin bitkisel

kökenlidir yine aynı amaçla kullanılan akarboz, miglitol ve vogliboz mikroorganizmalardan elde edilmiştir.

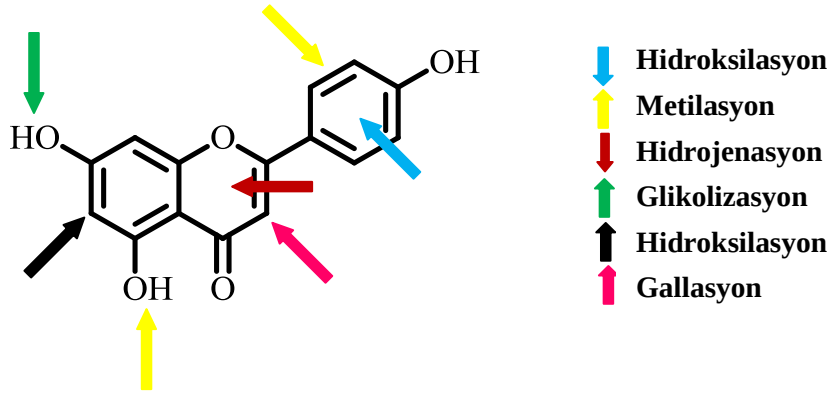
α-Amilaz, insan vücudunda nişastanın daha basit şeker moleküllerine parçalanmasını sağlayan ana enzimlerden biridir. Bu enzimin inhibisyonu karbohidrat sindirimini geciktirerek glukoz absorbsiyonunun azalmasını sağlar. Sonuç olarak postprandial kan şekeri düzeyi azalmış olur. Diyet bitkilerinden elde edilen doğal inhibitörler α-amilaz aktivitesine karşı düşük inhibisyon etki, α-glukozidaz aktivitesine karşı güçlü inhibisyon etki göstererek post prandial hiperglisemiyi minimal yan etkilerle azaltmaktadırlar (Hasenah ve ark. 2006).

J. regia ve *T. polium* bitkilerinin etenol:su ekstraktlarının α-amilaz ve α-glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendiğinde, *J.regia* (1 mg/ml), α-amilaz aktivitesine karşı düşük inhibisyon etki gösterirken (% 36.3) (Şekil 4.11.) α-glukozidaz aktivitesine karşı güçlü inhibisyon etki (% 85.3) göstermektedir (Şekil 4.12.) *T. polium* (1 mg/ml) ise % 31.6, α-amilaz ve % 49.3, α-glukozidaz inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz α-amilaz enzimini % 53.3 ve α-glukozidaz enzimini ise % 66.0 oranında inhibe etmektedir. Metformin α-glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi % 81.3 olarak bulundu.

J. regia bitkisinin, mevcut tedavide ilaç olarak kullanılan metforminden daha fazla α-glukozidaz enzim inhibisyonu göstermesi çalışmanın dikkat çekici sonuçlarından bir tanesidir. Fenolik bileşiklerin proteinlere bağlanarak enzimatik aktiviteyi inhibe ettiği bilinmektedir buna dayanarak *J. regia* 'nın güçlü α-glukozidaz inhibisyon aktivitesi; yapısında bulunan polifenollerin enzime bağlanarak enzimatik aktiviteyi inhibe etmesi ile açıklanabilir.

α-amilaz inhibitörü olan doğal polifenollerin yapı-aktiviteleri arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmüş ve şu şekilde sıralanmıştır: (Xiao ve ark. 2013) (Şekil 5.3.) **(1)** Flavanoidlerin hidroksilasyonu inhibisyonu artırır. **(2)** Flavanoidlerin glikolizasyonu inhibisyonu zayıflatır. **(3)** Flavanoidlerin metilasyon ve metoksilasyonu inhibisyonu azaltır. **(4)** Gallasyon katekinlerin inhibisyonu, non-gallasyon katekinlerden fazladır; katekol tipi katekinler, pirogallol tipi katekinlerden daha güçlü aktivite gösterirler. **(5)** 2,3-trans yapılı katekinlerin inhibisyon potensiyelleri, 2,3-cis

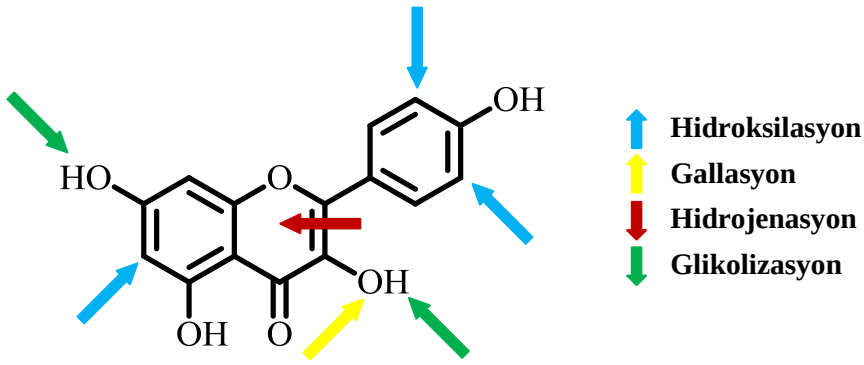
yapılı katekinlerden daha fazladır. **(6)** Siyanidin 3-glikozit, siyanidin-3-galaktozitten daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahiptir ve siyanidin 3,5-diglikozitin inhibisyon etkisi yoktur. **(7)** C1 pozisyonunda glukoz içeren β-gallol gruplu ellagitanninler , β-gallol ve nongallol bileşiklerden daha yüksek inhibisyon aktivitesine sahiptirler**.** α-Amilaz inhibitörü olan doğal polifenollerin yapıları ve aktiviteleri arasında ilişki vardır ancak her zaman bağlanma etkileri ve inhibisyon potensiyelleri arasında bir tutarlılık olmayabilir. Örneğin quercetinin inhibisyon etkisi ile bağlanma etkisi arasında bir tutarlılık yoktur. Bununla birlikte katekin hem yüksek α-amilaz inhibisyon etkisi hem de α-amilaza yüksek bağlanma etkisi gösterir.



Şekil 5.3.1. Flavanoidlerin α-amilaza bağlanma etkisi gösteren potensiyel grupları. Yukarı doğru olan oklar artan inhibisyonu; aşağı doğru olan oklar azalan inhibisyonu göstermektedir

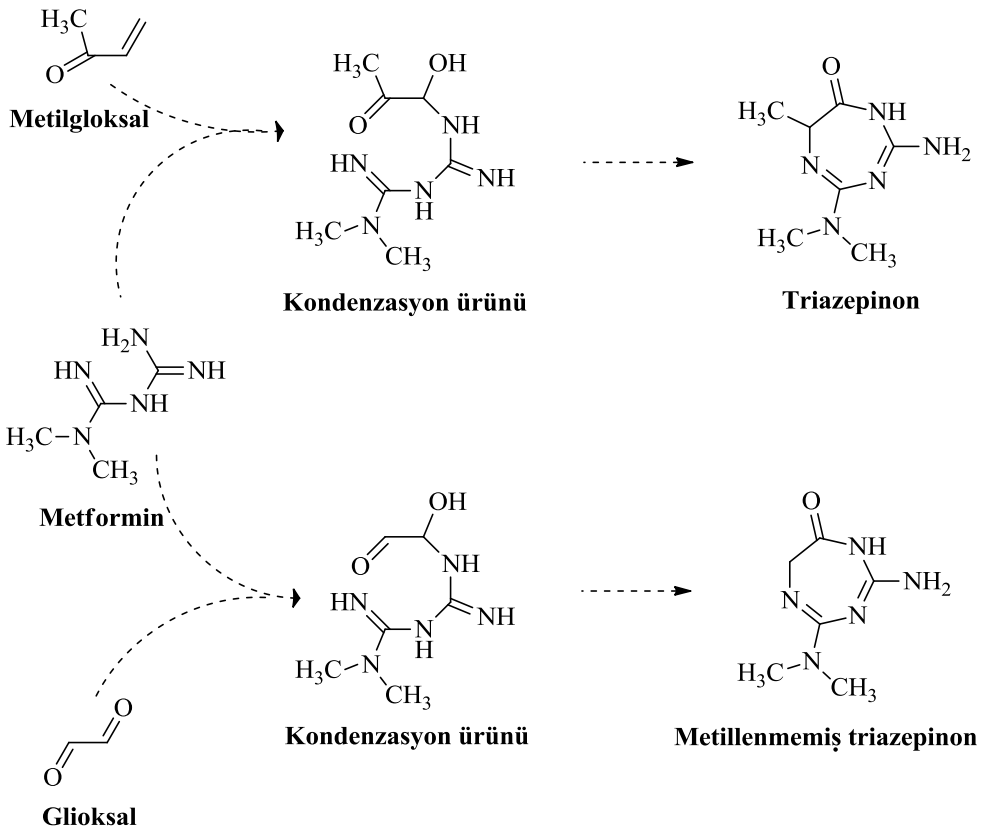
α-Glukozidaz karbohidrat sindiriminde anahtar enzimdir, inhibisyonu ince bağırsaklarda aşırı glukoz absorpsiyonunu önler. α-Glukozidaz inhibitörleri tip II diyabet tedavisinde terapötik ilaç olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki diyet polifenolleri etkili bir şekilde α-glukozidazı inhibe etmektedir (Schäfer ve ark. 2007, Boath ve ark. 2012, Du ve ark. 2012). α-Glukozidaz inhibitörlerinin yapı-aktivite ilişkileri şu şekilde açıklanmıştır: (Xiao ve ark. 2013) (Şekil 5.4.) **(1)** Flavanoidlerin ve katekinlerin hidroksilasyonu ve gallasyonu inhibisyonu artırır; **(2)** Flavanoidlerin glikozilasyon ve hidrojenasyonu inhibisyonu azaltır; **(3)** Siyanidin glikozitleri, glikozitlerden daha yüksek inhibisyon gösterirler; **(4)** Proantasiyanidin oligomerleri, polimerlerinden daha güçlü inhisyon gösterirler; **(5)** Stilbenoidlerin hidroksilasyonu ve glikozilasyonu inhibisyonu azaltır.**(6)** Klorejenik

asit güçlü inhibisyon göstermesine karşın ferulik asit ve hidroksisinamik asit ve gallik asit α-glukozidazı güçlükle inhibe eder; **(7)** transsinamik asitin 4-OH metilasyonu inhibisyon aktivitesini değiştirir; **(8)** Kalkonların mono-glikozilasyonu inhisyonu azaltmasına karşın; diglikozilasyonu önemli ölçüde inhibisyonu azaltır.



Şekil 5.3.2. Flavanoidlerin α-glukozidaza bağlanma etkisi gösteren potansiyel grupları. Yukarı doğru olan oklar artan inhibisyonu; aşağı doğru olan oklar azalan inhibisyonu göstermektedir.

Tip II diyabetin tedavisinde ilaç olarak kullanılan **metformin** diyabetik hastalarda metilglioksal seviyesini azaltmaktadır. Metforminin MGO ile *in vitro* reaksiyonu sonucu triazepinon (TZP) gibi kondensasyon ürünleri meydana gelir (Ruggiero-Lopez ve ark. 1999) (Şekil 5.6.). Metformin dikarbonil gruplarını bloke ederek etki gösterir, glikooksidasyon reaksiyonlarını önler ve AGE seviyesini düşürür (Beisswenger ve Lopez 2003).



Şekil 5.3.3. Metforminin α-dikarbonil bileşikleri ile olası reaksiyon basamakları

5.4. HPLC Sonuçları

J. regia ve *T. polium* ekstraktlarının yapısında bulunan fenolik ve flavonoid bileşikler HPLC ile analiz edildi. HPLC, biyolojik aktivitesi olan polifenollerin aynı anda ölçülmesine olanak tanıdığından önemli bir analiz yöntemidir.

Bitki ektraktlarına ait kromatogramlar incelendiğinde ceviz yaprağında daha fazla bulunmakla birlikte her iki bitkinin de baskın olarak rosmarinik asit içerikleri dikkat çekmektedir (Şekil 4.13.2 ve 4.13.3.). Ceviz yaprağının rosmarinik asit içeriğinin yanısıra prokateşik asit, vanilik asit ve kumarin içerikleri de anlamlı değerdedir. Yavşan otunun kimyasal içeriğine bakıldığında, ceviz yaprağından farklı olarak t-OH-sinnamik asit içerdiği görülmektedir.

Yapılan tüm deneyler sonucunda ceviz yaprağının diğer bitki ektraktları ile kıyaslandığında en yüksek antioksidant ve antidiyabetik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ceviz yaprağının antioksidant ve antidiyabetik aktivitesine en büyük katkının yapısında yüksek oranda bulunan rosmarinik asitten (RA),

kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Rosmarinik asit (α-*o*-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyllactic acid; RA), güçlü antioksidant etkiye sahip fenolik bir bileşendir ve farmakolojik özelliği olan bitkiler tarafından üretilir (Malencic ve ark. 2000, Exarchou ve ark. 2000).

Fenolik bileşen olarak baskın RA içeren bitkiler, Güney Avrupa, Japonya, ve Hindistan gibi ülkelerde, Diabetes mellitus, karınağrısı, başağrısı, böcek sokması ve akne gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Javanmardi ve ark. 2002, Maroo ve Ark. 2002). Yapılan farklı çalışmalarda; RA içeren extraktların, bitki yapraklarının ve baharatların aynı zamanda antioksidant, antimutajenik, anti-tümörojenik, anti-HIV, anti-proliferatif ve anti-siklooksigenaz özellikleri olduğu rapor edilmiştir (Inatani ve ark. 1983, Santamaria ve ark. 1987, Zhu ve ark. 1998, Al-Sereiti ve ark. 1999, Kim ve Ark. 1999, Makino ve ark. 2000, Kelm ve ark. 2000).

Patrick ve Ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, rosmarinik asitin α-amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. Safra'nın (% 97), inhibisyon etkisinin % 85 olduğu, % 50 oranında RA içeren ektraktın % 50 ve % 7 oranında RA içeren ektraktın ise % 42 inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir.

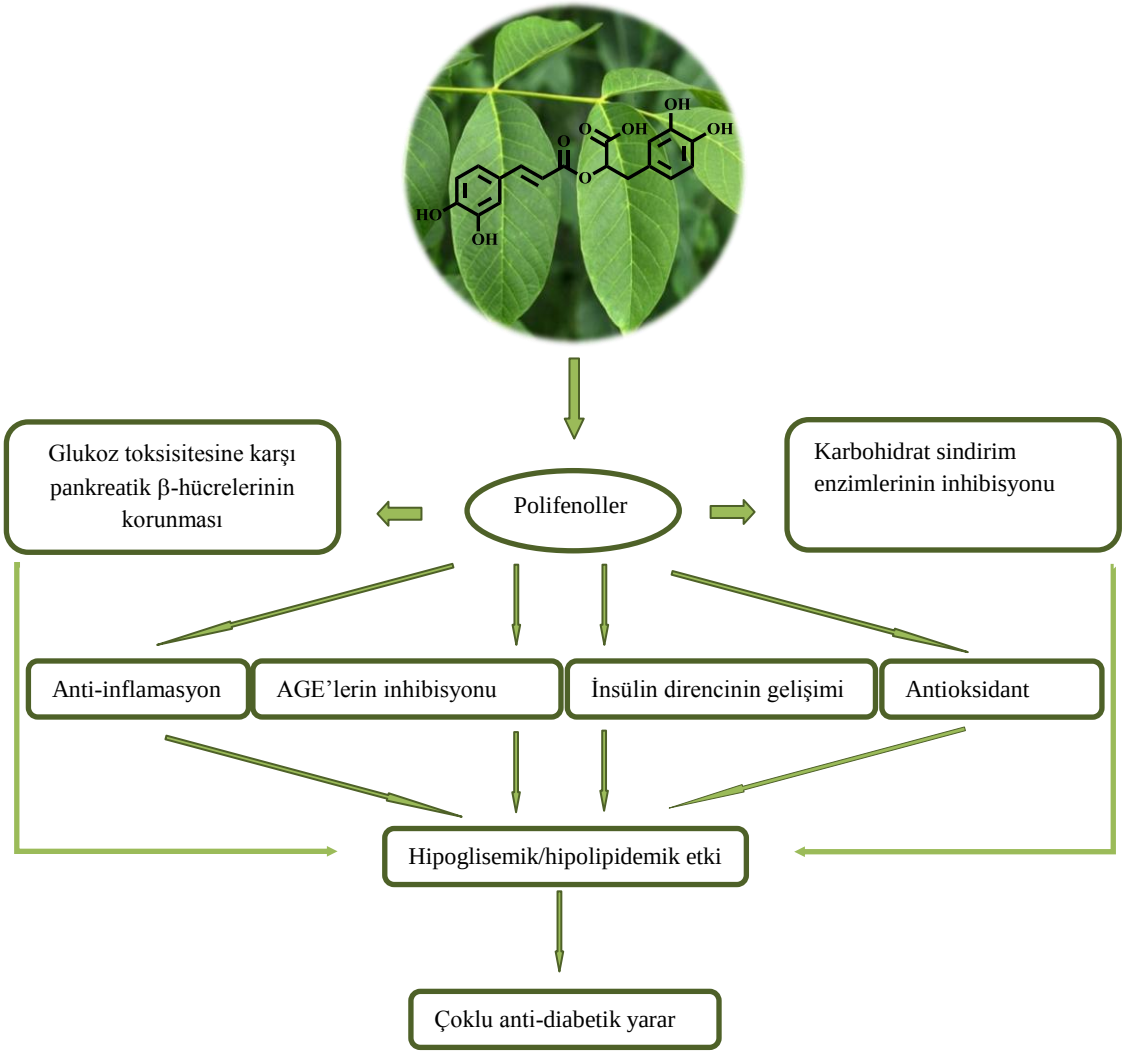
5.5. Polifenollerin Anti-Diabetik Mekanizması

Hiperglisemi ve hiperinsülineminin ana kaynağı yiyeceklerden gelen karbohidratlardır. Diyetle alınan polifenoller hiperglisemiyi kontrol altına alır (Chang 2014). Diyet polifenoller, hipoglisemik ve hipoinsülinemi etkilerini; glukoz toksisitesine karşı pankreatik β-hücrelerinin korunması, anti-inflamasyon ve antioksidant etki, karbohidrat sindirim enzimlerinin inhibisyonu, insülin direnci geliştirilmesi ve AGE oluşumunun inhibisyonu gibi farklı şekillerde gösteririler (Aguirre ve ark. 2011, Cao ve ark. 2014) (Şekil 5.3.).

Hanhineva ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada polifenollerin karbohidrat metabolizması üzerine etkilerinin olası mekanizmalarının; insülin salınımının düzenlenmesi, glukoz absorbsiyonunun inhibisyonu, karbohidrat sindirim enzimlerinin inhibisyonu, hücrelerarası sinyal iletim yolaklarının modülasyonu ve gen ekspresyonu ve insülin reseptörlerinin aktivasyonu olduğunu ileri sürmektedirler.

Turan ve ark. (2012), resveratrolun (Şekil 1.21) diyabetik kardiyak fonksiyon bozukluğu üzerine etkisini, antioksidant koruma içeren endogenos sinyal yolaklarını ve insülin/glukoz metabolizmasını düzenlemesi ile açıkladılar.

Pinent ve ark. (2012), prosiyanidin (Şekil 1.24.) glukoz homeostaz bozukluğu üzerine potensiyel etkilerini incelediler. Prosiyanidin yiyeceklerle karıştırılarak verildiği duruma göre tek başına verildiğinde daha fazla aktivite gösterdiğini ileri sürdüler. Sears ve Ricordi 2012 yılında yayınladıkları çalışmalarında polifenollerin metabolik sendrom ve diyabet üzerine etkilerini ve inflamasyondaki rollerini tartışarak anti-inflamatuar yiyeceklerin diyabet tedavisi için non-farmakolojik bir öneri olduğunu savunmaktadırlar.



Şekil 5.4.1. Polienollerin farklı anti-diyabetik mekanizmaları

Sonuç olarak *J. regia* ve *T. polium* bitkilerinin etanol:su ektraktlarının hem reaktif oksijen türlerini, lipid peroksidasyonunu, DNA ve protein oksidasyonunu inhibe ederek gösterdikleri güçlü antioksidant etkiyle hem de AGE ürünlerini ve α-amilaz ve α-glukozidaz enzimlerini inhibe ederek gösterdikleri antidiyabetik etkiyle Tip II diyabetin tedavisinde etkin olabilecekleri düşünülmektedir. Bu çalışmanın daha sonra *in vivo* çalışmalarla desteklenerek endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

Adediwura, F.J., Abo, K., Wilkins, R. 2009. α-Amylase Inhibitory Effect of 3-β-olean-12-en-3-yl (9*Z*)-hexadec-9-enoate Isolated from *Spondias mombin* Leaf. *Food Chem*, 116(1): 285-288.

Aguirre, L., Arias, N., Macarulla, M.T., Gracia, A., Portillo, M.P. 2011. Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes. *The Open Nutraceut J, 4*: 189-198.

Ahmad, M.S., Ahmed, N. 2006. Antiglycation Properties of Aged Garlic Extract: Possible Role in Prevention of Diabetic Complications. *J Nutr*, 136: 796S.

Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P. 1999. Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and Its Therapeutic Potentials. *Indian J Exper Biol*, 37: 124-130.

Altomore, E., Veldemiale, D., Chicco, D., 1992. Increased Lipid Peroxidationin Type 2 Poorly Controlled Diabetic Patients. *Diabetes Metab*, 18: 264-271.

American Diabetes Association (ADA). 2011. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 34: S62-9.

Ames, B.N. 1983. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens: Oxygen Radicals and Degenerative Diseases. *Science*, 221: 1256-1264.

Andrae-Marobela, K., Ghislain, F.W., Okatch, H., Majinda, R. 2013. Polyphenols: A Diverse Class of Multi-target anti-HIV-1 Agents. *Curr Drug Metab*, **7**: 392-413.

Appel, G., Bolton, K., Freedman, B., Wuerth, J.P., Cartwright, K. 1999. Pimagedine (PG) Lowers Total Urinary Protein (TUP) and Slows Progression of Overt Diabetic Nephropathy in Patients with Type I *Diabetes Mellitus* (DM). *J Am Soc Nephrol*, 10: 153A.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007. *Cyperus Rotundus* Suppresses AGE Formation and Protein Oxidation in A Model of Fructose-Mediated Protein Glycoxidation. *Int J Biol Macromol*, 41: 572-578.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007a, Inhibitory Effects of Ethyl Acetate Extract of *Teucrium polium* on *in Vitro* Protein Glycoxidation. *Food Chem Toxicol*, 45(12): 2402-2411.

Aufa, Z.A., Hassan, F. A., Ismail, A., Yusof, B.N.M., Hamid, M. 2014. Chemical Compositions and Antioxidative and Antidiabetic Properties of Underutilized Vegetable Palm Hearts from *Plectocomiopsis geminiflora* and *Eugeissona insignis*. *J Agric Food Chem*, 62(9): 2077-2084.

Ayoola, G.A. 2008. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop J Pharm Res*, 7(3): 1019-1024.

Bailey, C.J., Day, C. 1989. Traditional Plant Medicine as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care*, 12(8): 553-564.

Baker, J.R., Zyzak, D.V., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. 1994. Chemistry of the Fructosamine Assay: D-glucosone Is the Product of Oxidation of Amadori Compounds During the Fructoseamine Assay. *Clin Chem*, 40: 1950-1955.

Bakırel, T., Sener, S., Bakırel, U., Keles, O., Sennazlı, G., Gurel, A. 2003. The Investigation of the Effects of Pistacia terebinthus L. Upon Experimentally Induced Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Rabbits. *Turk J Vet Anim Sci*, 27: 1283-1292.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 2.baskı, Nobel Tıp Kitapevi, Türkiye.

Bierhaus, A., Hofmann, M.A., Ziegler, R. 1998. AGEs and Their Interaction with AGE-Receptors in Vascular Disease and Diabetes Mellitus. I. The AGE Concept. *Cardiovasc Res*, 37: 586-600.

Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Touchette, A.D., Lal, S., Szwergold, B.S. 1999. Metformin Reduces Systemic Methylglyoxal Levels in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 48: 198-202.

Beisswenger, P., Ruggiero-Lopez, D., 2003. Metformin Inhibition of Glycation Processes. *Diabetes Metab*, 29: 95-103.

Beppu, H., Koike, T., Shimpo, K., Chihara, T., Hoshino, M., Ida, C., Kuzuya, H., 2003. Radical-scavenging Effects of *Aloe arborescens* Miller on Prevention of Pancreatic Islet β-cell Destruction in Rats. *J Ethnopharmacol*, 89(1): 37-45

Bischoff, H. 1994. Pharmacology of Alpha-Glucosidase Inhibition. *Eur J Clin Invest*, 24(S3), 3-10.

Bnouham, M., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. 2006. Medicinal Plants with Potential Antidiabetica a Review of Ten Years of Herbal Medicine Research (1990-2000). *Int J Diab Metab*, 14: 1-25.

Boath, A.S., Stewart, D., McDougall, G.J. 2012. Berry Components Inhibit α-Glucosidase *In Vitro*: Synergies Between Acarbose and Polyphenols from Black Currant and Rowanberry. *Food Chem*, 135: 929-936.

Bonnefont-Rousselot, D. 2001. Antioxidant and Anti-AGE Therapeutics. *J Soc Biol*, 195: 391-398.

Booth, A.A., Khalifah, R.G., Todd, P., Hudson, B.G. 1997. *In Vitro* Kinetic Studies of Formation of Antigenic Advanced Glycation End Products (AGEs). *J Biol Chem*, 272: 5430-5437.

Caballero, F., Gerez, E., Batlle, A., Vazquez, E. 2000. Preventive Aspirin Treatment of Streptozotocin Induced Diabetes: Blockage of Oxidative Status and Revertion of Heme Enzymes Inhibition. *Chem Biol Interact*, 126: 215-225.

Cao, H., Xie, Y.X., Chen, X.Q. 2014. Type 2 Diabetes Diminishes the Benefits of Dietary Antioxidants: Evidence from the Different Free Radical Scavenging Potential. *Food Chem*, 186: 106-112.

Casley-Smith, J.R. 1997. Coumarin in the Treatment of Lymphoedema and Other High-Protein Oedemas. O'Kennedy, R., Thornes, RD. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. Chichester, John Wiley & Sons, 360, New York, USA.

Cerutti, P., 1994. Oxy-Radical and Cancer: *Lancet*, 344(2): 862-863.

Chandler, S. F., Dodds, J. H. 1983. The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose onthe Production of Phenolics and Solasidine in Callus Cultures of *Solanum lacinitum. Plant Cell Reports*, 2: 105.

Chandrasekaran, K., Swaminathan, K., Kumar, S.M., Clemens D.L., Dey, A. 2012. Increased Oxidative Stress and Toxicity in ADH and CYP2E1 Overexpressing Human Hepatoma VL-17A Cells Exposed to High Glucose. *Integr Biol*, 4(5): 550-563.

Chompoo, J., Upadhyay, A., Kishimoto, W., Makise, T., Tawata, S. 2011. Advanced Glycation End Products Inhibitors from *Alpinia zerumbet* Rhizomes. *Food Chem*, 129: 709-715.

Davies, K.J., Delsignore, M.E., Lin, S.W. 1987. Proteins Damaged by Oxygen Radicals Are Rapidly Degraded in Extracts of Red blood Cells. *J Biol Chem*, 262, 8227-8234.

Davis, P. H., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *VO1. 10*, Edinburg University Pres. Edinburg, 590, UK.

Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J. 1993. Reactive Species and Their Accumulation on Radical-damaged Proteins. *Trends Biochem Sci*, 18(11): 437-41.

Delgado, A.C., Morales, F. J. 2005. Unraveling the Contribution of Melanoidins to the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *J Agric Food Chem*, 53(5): 1403-1407.

Diplock, A.T., Rice-Evans, C.A., Burdon, R.H., 1994. Is There a Significant Role for Lipid Peroxidation in The Causation of Malignancy and for Antioxidants in Cancer Prevention? *Cancer Res*, 54(7S): 1952s-1956s.

Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. 2004. Fe(III) Reductive and Free Radical-Scavenging Properties of Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Extract and Subfractions. *Food Chem*, 88(2): 193-199.

Du, W.H., Peng, S.M., Liu, Z.H., Shi, L.,Tan, L.F., Zou, X.Q. 2012. Hypoglycemic Effect of the Water Extract of Puerh Tea. *J Agric Food Chem*, 60: 10126-10132.

Duke, J.A., 1985. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton, CRC Press, 677, Florida, USA.

Fang, L., Cao, J., Duan, L., Tang, Y. ve Zhao, Y. 2014. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and α-Glocosidase Inhibitory Activities of Schisandra Chinensis (Turcz.) Baill, *J Funct Foods*, 9: 264-270.

Fayle, S.E., Gerrard, J.A. 2002. The Maillard Reaction, Belton, P.S. Chemistry, Biochemistry, and Implications, Royal Society of Chemistry, 1-6, Cambridge, UK.

Finot, P.A., Magnenat, E. 1981. Metabolic Transit of Early and Advanced Maillard Products. *Prog Food Nutr Sci*, 5: 193-207.

Freedman, B.I., Wuerth, J.P., Cartwright, K., Bain, R.P., Dippe, S., Hershon, K., Mooradian, A.D., Spinowitz, B.S. 1999. Design and Baseline Characteristics for the Aminoguanidine. Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Controlled Clin Trials*, 20: 493-510.

Edwards, R., Gatehouse, J. A., 1999. Secondary Metabolism. Lea, P., Leegood, R.C. Plant Biochemistry and Moleküler Biology. Wiley, 384, New York, USA.

Edwards, J.L., Vincent, A.M., Cheng, H.T., Feldman, E.L. 2008. Diabetic Neuropathy: Mechanisms to Management. *Pharmacol Ther*, 120: 1-34.

Evans, J.L., Maddux, B.A., Goldfine, I.D. 2005. The Molecular Basis for Oxidative Stress-induced Insulin Resistance. *Antioxid Redox signal*, 7: 1040-1052.

Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. 2000. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Cummer Savory. *J Agric Food Chem*, 50: 5294-5299.

Fukuhara, K., Miyata N. 1998. Resveratrol As a New Type of DNA-Cleaving Agent. *Bioorg Med Chem Lett*, 8(22): 3187-3192.

Giannoukakis, N. 2005. Pyridoxamine (BioStratum). *Curr Opin Investig Drugs*, 6: 410-418.

Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M. 2006. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*, 114: 597-605.

Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V. 2002. Medicinal Plants of India with Antidiabetic Potential. *J Ethnopharmacol*, 81: 81-10.

Gugliucci, A. Bastos, D.H., Schulze, J., Souza, M.F. 2009. Caffeic and Chlorogenic Acids in Ilex Paraguariensis Extracts Are the Main Inhibitors of AGE Generation by Methylglyoxal in Model Proteins. *Fitoterapia,* 80: 339-344.

Gulçin, I., Kufrevıoglu I.O., Oktay, M. 2004. Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic Activities of Nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmcol,* 90(2-3): 205-215.

Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Mol Aspects Med,* 27 1-93.

Guyton, A. C., Hall, J.E. 2001. Textbook of Medicinal Physiology. 1. baskı, Nobel Tıp Kitapevi, Türkiye.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine 2ed. Clarendon Press: Oxford, 23-30.New York, USA.

Halliwell, B. 1991. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *Am J Med*, 91(3C): 14S-22S.

Halliwell, B. 1994. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence? *Lancet*, 344(8924): 721-724.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1995. The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems. *Free RadicBiol Med,* 18: 125-126.

Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K. 2010. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int J Mol Sci,* 11, 1365-1402.

Harding, J.J., Ganea, E. 2006. Protection Against Glycation and Similar Post-Translational Modifications of Proteins. *Biochim Biophys Acta,* 1764(9): 1436-1446.

Hasenah, A., Houghton, P.J., Soumyanath, A. 2006. α-Amylase Inhibitory Activity of Some Malaysian Plants Used to Treat Diabetes; with Particular Reference to *Phyllanthus amarus. J Ethnopharmacol,* 107(3): 449-455.

Heck, C.I., De Mejia, E.G. 2007. Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J Food Sci,* 72: 138-151.

Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli S., Romani, A. 2007. Polyphenol Content and Antioxidative Activity in Some Species of Freshly Consumed Salads. *J. Agri Food Chem,* 55: 1724-1729.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. 2004. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, Elsevier Science Ltd., UK.

Hidalgo, F.J., Zamora, R., 2005. Interplay Between the Maillard Reaction and Lipid Peroxidation in Biochemical Systems. *Ann N Y Acad Sci,* 1043(1): 319-326.

Hipkiss, A.R., Michaelis, J., Syrris, P., Kumar S., Lam, Y. 1994. Carnosine Protects Proteins Aganaist *In Vitro* Glycation and Cross-links. *Biochem Soc Trans,* 22: 399S.

Hipkiss, A.R. 1998. Carnosine, A Protective, Anti-ageing Peptide. *Int J Biochem Cell Biol,* 30: 863-868.

Ho, S.C., Wu, S.P., Lin, S.M. 2010. Comparison of Anti-Glycation Capacities of Several Herbal Infusions with That of Green Tea. *Food Chem,* 122(3): 768-774.

Hsieh, C.L., Peng, C.H., Chyau, C.C., Lin, Y.C., Wang, H.E., Peng, R.Y. 2007. Low-density Lipoprotein, Collagen, and Thrombin Models Reveal That *Rosemarinus officinalis* L. Exhibits Potent Antiglycative Effects. *J Agric Food Chem,* 55: 2884.

Huang, C.N,. Horng, J.S., Yin, M.C. 2004. Antioxidative and Antiglycative Effects of Six Organosulfur Compounds in Low-density Lipoprotein and Plasma. *J Agric Food Chem,* 52: 3674.

Hui, H., Dotta, F., Di Mario, U., Perfetti, R. 2004. Role of Caspases in the Regulation of Apoptotic Pancreatic Islet Beta-cells Death. *J Cell Physiol*, 200(2): 177-200.

Hui, H., Tong, G., Go, V.L. 2009. Hypoglicemic herbs and their action mechanism. *Chin Med*. 10, 1186/1749-8546-4-11.

Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Yoon, S.H. 2009. AMP-activated Protein Kinase: A Potential Target for the Diseases Prevention by Natural Occurring Polyphenols. *New Biotechnol*, 26: 17-22.

Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. 1983.Antioxidative Effect of Constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Their Derivatives. *Agric Biol Chem,* 47: 521-528.

Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. 2002. Chemical Characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Found in Local Accessions and Used in Traditional Medicines in Iran. *J Agric Food Chem,* 50: 5878-5883.

Joglekar, M.M., Panaskar, S.N., Arvindekar, A.U. 2014. Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation by Cymene – A Common Food Constituent. *J Funct Foods,* 6: 107-115.

Jung, M., Park, M., Lee, H.C., Kang, Y.H., Kang, E.S., Kim, S.K. 2006. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Curr Med Chem,* 13: 1203-1218.

Kassab, A., Piwowar, A. 2012. Cell Oxidant Stress Delivery and Cell Dysfunction Onset in Type 2 Diabetes. *Biochimie*, 94(9): 1837-1848.

Kathryn, R., David, S., Nalani, R.F., Mark, O., Michael, Z., Pamela S.R., Vincent, M. 2003. Green Tea Extract Suppresses the Age-related Increase in Collagen Crosslinking and Fluorescent Products in C57BL/6 Mice. *Int J Vitam Nutr Res*, 73: 453.

Kesavulu, M.M., Giri, R., Kameswara, B., Apparao, C. 2000. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Levels in Type 2 Diabetics with Microvascular Complications. *Diabetes Metab*, 26: 387-392.

Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., DeWitt, D.L. 2000. Antioxidant and Cyclooxygenase Inhibitory Phenolic Compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine,* 7 (1): 7-13.

Kiho, T., Kato, M., Usui, S., Hirano, K. 2005. Effect of Buformin and Metformin on Formation of Advanced Glycation End Products by Methylglyoxal. *Clin Chim Acta,* 358: 139-145.

Kim, H.K., Lee, H.K., Shin, C.G., Huh, H. 1999. HIV Integrase Inhibitory Activity of *Agastache rugosa*. *Arch Pharm Res,* 22 (5): 520-523.

Kim, J.S., Kwon, C.S., Son, K.H. 2000. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, A Flavonoid. *Biosci, Biotechnol Biochem,* 64(11): 2458-2461.

Kim, H.Y., Kim, K. 2003. Protein Glycation Inhibitory and Antioxidative Activities of Some Plant Extracts *In Vitro. J Agric Food Chem,* 51: 1586.

Kim, Y.M., Wang, M.H., Rhee, H.I. 2004. A Novel α-Glucosidase Inhibitor from Pine Bark. *Carbohydr Res*, 339(3): 715-717.

Kim, K., Kim, H., Kwon, J., Lee, S., Kong, H., Im, S.A., Lee,, Y.H., Lee, Y.R., Oh, S.T., Jo, T.H., Park, Y.L., Lee, C.K., Kim, K. 2009. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Processed *Aloe vera* Gel in a Mouse Model of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Phytomedicine*, 16(9): 856-863.

Kittakoop, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S. 2014. Alkaloids As Important s-Scaffolds in Therapeutic Drugs for the Treatments of Cancer, Tuberculosis, and Smoking Cessation. *Curr Top Med Chem,* 14(2): 239-252.

Kumar, R. S., Sivakumar, T., Sunderam, R. S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Murugesh, K., Kumar, K.A. 2005. Antioxidant

and Antimicrobial Activities of *Bauhinia racemosa* L. Stem Bark. *Braz J Med Biol Res,* 38: 1015-1024.

Kumar, A., Chattopadyay, S. 2006. DNA Damage Protecting Activity and Antioxidant Potential of Pudina Extract. Food Chem, 100(4): 1377-1384.

Kutchan, T.M., 2001. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. *Plant Physiol*, 125(1): 58-60.

Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K. 2008. *In Vitro* Studies of Eggplant (*Solanum melongena*) Phenolics As Inhibitors of Key Enzymes Relevant for Type 2 Diabetes and Hypertension. *Bioresour Technol*, 99(8): 2981-2988.

Ledl, F., Schleicher, E. 1990. New Aspect of Maillard Reaztion in Foods and in the Human Body. *Angew Chem Int Ed*, 29(6): 565-594.

Lee, S.E., Ju, E.M., Kim, J.H., 2001. Free Radical Scavenging and Antioxidant Enzyme Fortifying Activities of Extracts from *Smilax china* root. *Exp Mol Med*, 33(4): 263-268.

Leopoldini, M., Prieto Pitarch, I., Russo, N., Toscano, M. 2004. Structure, Conformation and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. *J Phys Chem A*, 108(1): 92-96.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. 2004a. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-atom Versus Electron Transfer Mechanism. *J Phys Chem A*, 108(22): 4916-4922.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., Toscano, M. 2004b. Density Functional Computations of the Energetic and Spectroscopic Parameters of Quercetin and Its Radicals in the Gas Phase and in Solvent. *Theor Chem Acc*, 111(2-6): 210-216.

Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chem*, 125(2): 288-306.

Li, X., Zheng, T., Sang, S., Lv,L. 2014. Quercetin Inhibits Advanced Glycation End Product Formation by Trapping Methylglyoxal and Glyoxal. *J Agric Food Chem*, 62(50):12152-8.

Lin, C.C., Yin, M.C. 2008. Antiglycative and Anti-VEGF Effects of S-ethyl Cysteine and S-propyl Cysteine in Kidney of Diabetic Mice. *Mol Nutr Food Res*, 52: 1358.

Lin, J., Tang, Y., Kang, Q., Chen, A. 2012. Curcumin Eliminates the Inhibitory Effect of Advanced Glycation End-products (AGEs) on Gene Expression of AGE Receptor-1 in Hepatic Stellate Cells *In Vitro. Lab Invest*, 92(6): 827-841.

Lo, K.M., Cheung, C.K. 2005. Antioxidant Activity of Extracts from the Fruiting Bodies of *Agrocybe aegerita* var. Alba. *Food Chem*, 89(4): 533-539.

Lunceford, N. Gugliucci, A. 2005. Ilex Paraguariensis Extracts Inhibit AGE Formation More Efficiently Than Green Tea. *Fitoterapia,* 76: 419.

Maillard, L., 1912. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des. Sciences, 154: 66–68.

Makino, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G., Sasayama, S. 2000. Inhibitory Effects of Rosmarin ic Acid on the Proliferation of Cultured murine Mesangial Cells. *Nephrol Dial Transplant*, 15: 1140-1145.

Malencic, D.J, Gasic, O., Popovic, M., Boza, P. 2000. Screening for Antioxidant Properties of *Salvia reflexa* Hornem. *Phytother Res*, 14: 546-548.

Malik, N.S., Meek, K.M. 1994. The Inhibition of Sugar-Induced Structural Alterations in Collagen by Aspirin and Other Compounds. *Biochem Biophys Res Commun*, 199: 683-686.

Mari, M., Colell, A., Moreless, A., von Montfort, C., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. 2010. Redox Control of Liver Function in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*, 12(11): 1295-1331.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. 2003. 3rd.Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17(1): 24-38.

Maroo, J., Vasu, V.T., Aalinkeel, R., Gupta, S. 2002. Glucose Lowering Effect of Aqueous Extract of *Enicostemma littorale* Blume in Diabetes: A Possible Mechanism of Action. *J Ethnopharm*, 81: 317-320.

Meade, S.J., Gerrard, J.A. 2002. The Structure-activity Relationships of Dicarbonyl Compounds and Their Role in the Maillard Reaction. *Int Congr Ser*, 1245: 455–456.

Memişoğulları, R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkileri. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi,* 3: 30-39

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., 2001. Natural Antioxidants from Residual Sources. *Food Chem*, 72: 145.

Musialik, M., Litwinienko, G. 2005. Scavenging of DPPH Radicals by Vitamin E Is Accelerated by Its Partial Ionization: the Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer. *Org Lett*, 7: 4951-4954.

Mustata, G.T, Rosca, M., Biemel, K.M., Reihl, O., Smith, M.A., Viswanathan, A., Strauch, C., Du, Y., Tang, J., Kern, T.S., Lederer, M.O., Brownlee, M., Weiss, M.F., Monnier, V.M. 2005. Paradoxical Effects of Green Tea (*Camellia sinensis*) and Antioxidant Vitamins in Diabetic Rats: Improved Retinopathy and Renal Mitochondrial Defects But Deterioration of Collagen Matrix Glycoxidation and Crosslinking. *Diabetes,* 54: 517-526.

Mycek, J.M., Harvey, R.A., Champe, P.C. 1998. Farmakoloji *(Lippincott's Illustrated Review Serisi)* 2. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, Türkiye.

Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S., Juneja, L.R. 2002. Protective Activity of Green Tea Against Free Radical and Glucose-mediated Protein Damage. *J Agric Food Chem,* 50: 2418.

Nickavar, B., Abolhasani, L., Izadpanah, H. 2008. α-Amylase Inhibitory Activities of Six Salvia Species. *Iran J Pharma Res,* 7(4): 297-303.

Nickavar, B., Mosazadeh, G., 2009, Influence of Three Morus Species Extracts on α-Amylase Activity. *Iran J Pharmal Res*, 8(2): 115-119.

Nursten, H.E. 2005. The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry, and Implications, H. Nursten, Royal Society of Chemistry, 1-4, Cambridge, UK.

Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J., 2008. A.Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husks. *Food Chem Toxicol,* 46: 2326-2331.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. 1989. New Methods of Analyzing Tannins. *J Nat Prod,* 52(1): 1-31.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C., 2002. Comparison Between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Non-distilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *J Agric Food Chem,* 50(23): 6882-90.

Patrick P.M., Shetty, K. 2004. Inhibitory Effects of Rosmarinic Acid Extracts on Porcine Pancreatic Amylase *In Vitro. Asia Pacific J Clin Nutr*, 13(1): 101-106.

Peng, X., Cheng, K.W., Ma, J., Chen, B., Ho, C.T., Lo, C., Chen, F., Wang, M. 2008. Cinnamon Bark Proanthocyanidins As Reactive Carbonyl Scavengers to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *J Agric Food Chem*, 56: 1907.

Peng, X., Ma, J., Chao, J., Sun, Z., Chang, R.C.C., Tse, I., Li, E.T., Chen, F., Wang, M. 2010. Beneficial Effects of Cinnamon Proanthocyanidins on the Formation of Specific Advanced Glycation Endproducts and Methylglyoxal-induced Impairment on Glucose Consumption. *J Agric Food Chem*, 58: 6692.

Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P.B., Isabel Ferreira, C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho,L. 2007. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic Compounds, Antibacterial Activity and Antioxidant Potential of Different Cultivars, *Food Chem Toxicol,* 45: 2287-2295.

Pietta, P.G. 2000. Natural Antioxidants and their Role against Human Cancer. *J Nat Prod*, 63: 1035-42.

Pinent, M., Cedo, L., Montagut, G., Blay, M., Ardevol, A. 2012. Procyanidins Improve Some Disrupted Glucose Homoeostatic Situations: An Analysis of Doses and Treatments According to Different Animal Models. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52: 569-584.

Qin, B., Panickar, K.S., Anderson, R.A. 2010. Cinnamon: Potential Role in The Prevention of Insulin Resistance, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Sci Technol*, 4: 685.

Rahbar, S., Natarajan, R., Yerneni, K., Scott, S., Gonzales, N., Nadler, J.L., 2000. Evidence That Pioglitazone, Metformin and Pentoxifylline Are Inhibitors of Glycation. *Clin Chim Acta*, 301: 65-77.

Rajani Kanth, V., Uma Maheswara Reddy, P. Raju, T.N. 2008. Attenuation of Streptozotocin-induced Oxidative Stress in Hepatic and Intestinal Tissues of Wistar Rat by Methanolic-garlic Extract. *Acta Diabetol Lat*, 45: 243.

Ramakrishnan, S., Sulochana, K.N., Punitham, R. 1999. Two New Funvtions of Inositol in the Eye Lens: Antioxidation and Antiglycation and Possible Mechanisms. *Indian J Biochem Biophys*, 36: 129-133.

Raskin, P., Cattran, D., Williams, M., Wuerth , J.P., Cartwright, K. 1999. Pimagedine (PG) Reduces Progression of Retinopathy and Lowers Lipid Levels in Patients with Type I Diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol*, 10: 179A.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal, B.B. 2010. Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer: How Are They Linked? *Free Radical Biol Med*, 49: 1603-1616.

Robbins, S.L. Cotran, R.S., Kumar, V., 1995. Basic Pathology, W.B. Saunders Company A Division of Harcourt Brace and Company, 770, California, USA.

Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y. 2011. Extracts of Maqui (Aristotelia chilensis) and Murta f(Ugni molinae Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and α-Glucosidase/α-Amylase Inhibitors. *J Agric Food Chem*, 59(5):1630-1637.

Ruggiero-Lopez, Lecomte, D.M., Moinet, G., Patereau, G., Lagarde, M., Wiernsperger, N. 1999. Reaction of Metformin with Dicarbonyl Compounds. Possible Implication in the Inhibition of Advanced Glycation End Product Formation. *Biochem Pharmacol*, 58: 1765-1773.

Santamaria, L., Tateo, F., Bianchi, A., Bianchi, L. 1987. *Rosmarinus officinalis* Extract Inhibits As Antioxidant Mutagenesis by 8- methoxypsoralen (8-MOP) and Benzo[a]pyrene (BP) in Salmonella typhimurium. *Med Biol Environ*, 15: 97-101.

Schafer, A., Högger, P. 2007. Oligomeric Procyanidins of French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol) Effectively Inhibit Alphaglucosidase. *Diabetes Res Clin Pract*, 77: 41-46.

Sears, B., Ricordi. C. 2012. Role of Fatty Acids and Polyphenols in Inflammatory Gene Transcription and Their Impact on Obesity, Metabolic Syndrome and Diabetes. *Euro Rev Med Pharmacol Sci*, *16*, 1137-1154.

Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food Phenolics Sources Chemistry Effects Aplications, Technomic Publication, 235-277, USA.

Shao, X., Chen, H., Zhu, Y., Sedighi, R., Ho, C.T., Sang, S. 2014. Essential Structural Requirements and Additive Effects for Flavonoids to Scavenge Methylglyoxal. *J Agric Food Chem*, 62: 3202-3210.

Shen, S.C., Chang, W.C. 2013. Hypotriglyceridemic and Hypoglycemic Effects of Vescalagin from Pink Wax Apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in High-Fructose Diet-induced Diabetic Rats. *Food Chem*, 136:858-863.

Singh, R., Barden, A., Mori, T. 2001. Advanced Glycation End-products: A Review. *Diabetologia*, 44: 129-46.

Song, J. H., Simons, C., Cao, L., Shin, S.H., Hong, M., Chung, M. 2003. Rapid Uptake of Oxidized Ascorbate Induces Loss of Cellular Glutathione and Oxidative Stress in Liver Slices. *Exp Mol Med*, 35(2): 67-75.

Stefek, M. 2011. Natural Flavonoids As Potential Multifunctional Agents in Prevention of Diabetic Cataract. *Interdiscip Toxicol*, 4: 69-77.

Tavafi, M., Ahmadvand, H., Khalatbari, A., Tamjidipoor, A. 2011. Rosmarinic Acid Ameliorates Diabetic Nephropathy in Uninephrectomized Diabetic Rats. *Iran J Basic Med Scien*, 14(3): 275-283.

Thornalley, P.J. 2003. Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419: 31-40.

Tian, B., Hua, Y. 2005. Concentration-Dependence of Prooxidant and Antioxidant Effects of Aloin and Aloe-Emodin on DNA. *Food Chem*, 91(3): 413-418.

Toda, M., Okubo, S., Ohnihi, R., 1989. Antibacterial and Bactericidal Activities of Japanese Green Tea. *Jpn J Bacteriol*, 45: 561-566.

Turan, B.,Tuncay, E., Vassort, G. 2012. Resveratrol and Diabetic cardiac Function: Focus on Recent *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *J Bioenerg Biomembran*, 44: 281-296.

Turk, Z. 2010. Glycotoxines, Carbonyl Stress and Relevance to Diabetes and Its complications. *Physiol Res*, 59: 147-56.

Van Boekel, M.A., Bergh, P.J.V.D., Hoenders, H.J. 1992. Glycation of Human Serum Albumin: Inhibition by Diclofenac. *Biochi. Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol*, 1120: 201-204.

Van Nguyen, C. 2006. Toxicity of the AGEs Generated from Maillard Reaction: on the Relationship of Food-AGEs and Biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res*, 50(12): 1140-1149.

Videla, L.A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quinones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., Csendes, A., Rojas, J., Maluenda, F., Burdiles, P., Diaz, J.C., Smok, G., Thielemann, L., Poniachik, 2004. Oxidative Stress-related Parameters in the Liver of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Patients. *J Clin Sci*, 106: 261-268.

Vinson, J.A., Zhang, J. 2005. Black and Green Teas Equally Inhibit Diabetic Cataracts in A Streptozotocin-induced Rat Model of Diabetes. *J Agr Food Chem*, 53: 3710.

Voziyan, P.A., Metz, T.O., Baynes, J.W., Hudson, B.G. 2002. A Post-Amadori Inhibitor Pyridoxamine Also Inhibits Chemical Modification of Proteins by Scavenging Carbonyl Intermediates of Carbohydrate and Lipid Degradation. *J Biol Chem*, 277: 3397-3403.

Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1998. Antioxidant and Pro-oxidant Activity of Green Tea Extract in Marine Oils. *Food Chem.* 63: 335-342.

Wang, L., Yen., J.H., Liang., H.I. 2003. Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus plumule and Blossom (Nelumbo nucifera Gertn.). *J Food Drug Anal*, 11: 60-66.

Wang, S.H., Chang, J.C., Chiou, R.Y.Y. 2011. Modified Fast Procedure for the Detection and Screening of Antiglycative Phytochemicals. *J Agr Food Chem*, 59(13): 6906-6912.

Williams, M.E. 2004. Clinical Studies of Advanced Glycation End-product Inhibitors and Diabetic Kidney Disease. *Curr Diabetes Rep*, 4: 441-446.

Wink, M. 1999. Function of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology. Sheffield Academic Press and CRC Press, Annual Plant Reviews, Vol. 3, 362, Sheffield, UK.

Wright, J.S., Johnson, E.R., Dilabio, G.A. 2001. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects and Application to Major Families of Antioxidants. *J Am Chem Soc*, 123(6): 1173-1183.

Wu, J.W., Hsiehb,C.L., Wanga, H.Y., Chen, H.Y. 2009. Inhibitory Effects of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extracts and Its Active Compounds on the Glycation Process of Protein. *Food Chem*, 113,78-84.

Wu, C.H., Huang S.M., Lin, J.A., Yen, G.C. 2011. Inhibition of Advanced Glycation Endproduct Formation by Foodstuffs. *Food Funct*, 2: 224-234.

Xiao, J.B., Ni, X.L., Kai, G.Y., Chen, X.Q. 2013. A Review on Structure Activity Relationship of Dietary Polyphenols Inhibiting α-Amylase. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53: 497-506.

Xiao, J.B., Muzashvili, T.S., Georgiev, M.I. 2014. Advance on Biotechnology for Glycosylation of High-value Flavonoids. *Biotechnol Adv*, 32(6):1145-56.

Yamaguchi, F., Ariga, T., Nakazawa, H. 2000. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. *J Agr Food Chem*, 48(2): 180-185.

Yan, H., Harding, J.J. 2005. Carnosine Protects Against the Inactivation of Esterase Induced by Glycation and A Steroid. *Biochim Biophys Acta*, 1741: 120-126.

Yen, G.C., Hsieh, C.L. 1998. Antioxidant Activity of Extracts from Du-Zhong Eucommia ulmoides) toward Various Lipid Peroxidation Model *In Vitro*. *J Agr Food Chem*, 46(10): 3952-3957.

Yu, R., Hui, H. Shlomo, M. 2005. Insulin Secretion and Action. Melmed, S., Conn, P.M. Endocrinology (2nd). Humana Press, 311-319, New Jersey, USA.

Zamora, R., Hidalgo, F.J., 2005. Coordinate Contribution of Lipid Oxidation and Maillard Reaction to the Nonenzymatic Food Browning. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45(1): 49-59.

Zhang, L.S., Wang, X., Dong, L.L. 2011. Antioxidation and Antiglycation of Polysaccharides from *Misgurnus anguillicaudatus. Food Chem*, 124(1): 183-187.

Zhu, B.T., Loder, D.P., Cai M.X., Ho, C.T., Huang, M.T., Conney, A.H. 1998. Dietary Administration of An Extract from Rosemary Leaves Enhances the Liver Microsomal Metabolism of Endogenous Estrogens and Decreases Their Uterotropic Action in CD-1 Mice. *Carcinogenesis*, 19 (10): 1821-1827.

Zieman, S.J., D.A. Kass, D.A. 2004. Advanced Glycation Endproduct Crosslinking in the Cardiovascular System. *Drugs*, 64(5): 459.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chem*, 64: (4): 555-559.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	**:**	Sevil EMEN TANRIKUT
Doğum Tarihi:		15.12.1980
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri	**:**	Merkez/DİYARBAKIR
Medeni Hali	**:**	Evli
Adres	**:**	Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü 21280 Diyarbakır
Telefon	**:**	**GSM :** (0507) 8528585 **e-Mail :** sevil.emen@gmail.com

Eğitim ve Akademik Kariyer

Eylül 1987-Haziran 1999

İlkokul öğrenimimi Yunus Emre İlkokulunda, Ortaokulu Şair Sırrı Hanım İlköğretim Okulunda ve Lise Eğitimimi Ziya Gökalp Lisesinde (Yabancı Dil Ağırlıklı) tamamladım.

Eylül 2000-Temmuz 2004

Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünü bitirdim.

Eylül 2004-Temmuz 2006

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında "***Cylotrichium niveum* Bitkisinin Farklı Polariteye Sahip Çözücüler ile Hazırlanan Ekstraktlarının Antioxidant ve DNA'yı Serbest Radikallerden Koruma Etkisinin Araştırılması**" adlı yüksek lisans tezini Prof. Dr. Murat KIZIL danışmanlığında bitirdim.

Eylül 2007-Aralık 2014

Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında, "**Hipoglisemik Olarak Kullanilan Bazi Bitki Türlerinin Antioksidant ve Antidiabetik Aktivitelerinin Araştirilmasi**" adlı doktora tezini Prof.Dr. Murat KIZIL danışmanlığında bitirdim.

Makaleler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

"Solvent-Free synthesis of nitrilotriacetamide and diketopiperazines from nitrilotriacetic acid under microwave irradiation and their antimicrobial activity" Öztürk, G., Gümgüm, B., Kızıl, M ve **Emen, S,** *Synthetic Communications*, **2007**, 37, 3981-3988.

"Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of *Hypericum triquetrifolium* and *Hypericum scabroide"* Kızıl, G., Kızıl, M., Yavuz, M., **Emen, S** ve Hakimoğlu, F., *Pharm. Biol.*, **2008**, 46, 231-242.

"DNA Damage Protecting Activity and *in vitro* Antioxidant Potential of the Methanol Extract of *Cyclotrichium niveum"* S. Emen, B. Çeken, G. Kızıl ve M. Kızıl, *Pharm. Biol*., **2009**, 47 (3), 219-229.

"DNA cleavage protecting activity and in vitro antioxidant potential of aqueous extract from fresh stems of *Rheum ribes*" S. Emen Tanrıkut, B. Çeken, S. Altaş, M. Pirinççioğlu, G. Kızıl, M. Kızıl, *Acta Alimentaria*, **2013**, 42 (3), 461-472.

Sempozyumlar

A.Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

B. Çeken, **S. Emen**, M. Kızıl, **"Sübstitüe Aril Radikallerin Nükleik Asitler Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması"** *XIX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP111, Kuşadası, 30 Eylül-4 Ekim 2005.

B. Çeken, M. Kızıl, **S. Emen, "Arendiazonyum Tuzları ve Kanser"** *XX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKS1, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.

S. Emen, B, Çeken, M. Kızıl, **"*Cyclotrichium niveum* Bitkisinin Antioksidant, Radikal söndürücü ve DNA'yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması"** *XX. Ulusal Kimya Kongresi*, BKP32, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.

G. Öztürk, B. Gümgüm, M. Kızıl, **S. Emen**, **"Mikrodalga ile Farklı Nitrilotriasetamid Sentezi"** *XX. Ulusal Kimya Kongresi*, AKP40, Kayseri, 4-8 Eylül 2006.

Çeken, B., G. Kızıl, **S. Emen** ve M. Kızıl, **"*Hypericum triquetrifolium* Bitkisinin Etanol Ekstraktının Oksidatif DNA Hasarı ve Protein Oksidasyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması",** *XII. Ulusal Kimya Kongresi,* BKP009, Mağusa, 06-10 Ekim 2008.

Çeken, B, **Emen, S,** Kızıl, G ve Kızıl, M, **"*Hypericum lysimachoides* ve *Cyclotrichium niveum Bitkilerinin* Etanol Ekstraktlarının Protein Oksidasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması"** 23.Ulusal Kimya Kongresi, BP026, Sivas, 16-20 Haziran 2009

Emen, S, Çeken, B, Altaş S, Pirinççioğlu, M, Kızıl M, **"*Rheum ribes* Bitkisinin Su Ekstraktının Antioksidant ve DNA'yı Serbest Radikallerden Koruma Etkisinin Araştırılması"** 24. Ulusal Kimya Kongresi, BP 102, Zonguldak, 29 Haziran-2 Temmuz 2010.

Erdem, P., Altaş, **S., Emen Tanrıkut** S., Kızıl, M., Yurdakoç, M., **"Fe(III)-Tanen Kompleksinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antioksidant-Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi"** 25. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), IP-112, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011.

Emen Tanrıkut, S., Pirinççioğlu, M., Kızıl, G., Çeken, B., Kızıl, M., **"Karbon Tetraklorür (CCl4) İle Oluşturulan Doku Hasarında Nar (*Punica granatum*) Suyunun Önleyici Etkisinin Araştırılması"** 25. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), BP-154, Erzurum, 27. 06. 2011-02. 07. 2011

Emen, S., Kızıl, G., Kızıl, M., **"Ceviz (*Juglans regia*) Yaprağı'nın In Vitro Antioksidant ve Antidiyabetik Etkisinin Araştırılması/In Vitro Antioxidant and Antidiabetic Activity of Walnut (Juglans regia) Leaves"** 26. Ulusal Kimya Kongresi (Uluslararası Katılımlı), BP-TR-036, Muğla, 01. 10. 2012-06. 10. 2012.

Emen, S, Kızıl, M, Kızıl, G, Altaş, S, ***"Achillea millefolium* Bitkisinin Antioksidant, Radikal Söndürücü ve Protein Oksidasyonunu Önleme Aktivitesinin Araştırılması"** 2. İlaç Kimyası Kongresi, P 505, Antalya, 21-23 Mart 2014.

B.Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Kızıl, G., M. Yavuz, B. Çeken., **S. Emen** ve M. Kızıl, **"Antioxidant Activity and Protective Effect of Ethanol Extract of *Hypericum scabrum* L. on Protein Oxidation"** An Advanced Course sponsored by FEBS, IUBMB and IFCC on Mechanisms, Consequences and Detection of Free Radical-Mediated Oxidative Protein Modifications, P22, Kemer, Antalya, 15-20 April 2009.

Çeken, B., **Emen, S**., Erdoğan, S., Kızıl, G., Kızıl, M, **"Screening of Antioxidant Properties of Methanolic Extract of *Sideritis libanotica* Labill ssp. Linearis and Protective Activity Against DNA Damage and Protein Oxidation"** *International*

Symposium on Drug Research & Development "From Chemistry to Medicine", P23, Ankara, 04-07 Mayıs 2009.

Emen, S., Pirinççioğlu, M., Çeken, B., Kızıl, G., Kızıl, M, **"The protective Effect of Pomegranate juice and Peel Against DNA Against DNA Damage and Protein Oxidation"** *International Symposium on Drug Research & Development "From Chemistry to Medicine"*, P24, Ankara, 04-07 Mayıs 2009.

Ant Bursalı, E., Coşkun, S., **Emen Tanrıkut, S.,** Kızıl, M., Yurdakoç, M., **" Comparison of Some Properties of Synthesized Cross-linked starch/PVA/Boron Complexes"** 17th International Symposium on Boron, Borides and Related Materials, 257-P, İstanbul, 11-17 September 2011.

Uzan, S., **Emen, S.,** Kızıl, M., Aydın, H., Hoşgören H., **"Quaternary Ammonium Salts, The Antimicrobial Activities and their utilization in Design Pharmaceutical Salts"** 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, P42, Ankara, Turkey, 26-29 June 2012.

Altaş, S., Kızıl, G., Haris P.I., Kızıl, M., **Emen Tanrıkut, S., " Determination of lycopen, Element, Vitamin and sugar content of Diyarbakır watermelon"** International Mesopotamia Agriculture Congress, P.A. 6.32, Diyarbakır, Turkey, 22-25 September 2014.

Katıldığı Kurslar:

24-28 Ocak 2005 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından düzenlenen **"Serbest Radikaller, DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi"** konulu Teorik Kursa katıldım.

Projeler:

Farklı Habitatlardan Lokal Streptomyces Türlerinin İzolasyonu, Teşhisi ve Ürettikleri Biyoaktif Metabolitlerin Kimyasal Yapılarının Kısmi Aydınlatılması **TÜBİTAK Projesi**, 107T502, **Proje Bütçesi:** 180.225 YTL, **Proje Yürütücüsü:** Ebru İnce Yılmaz, **Proje Görevlileri:** Murat Kızıl, Göksel Kızıl, Murat Yavuz, **Sevil Emen** 2007

Proflavin içeren, (+)-Duocarmycin antibiyotiği analoglarının sentezlenmesi ve DNA üzerine etkilerinin araştırılması, **TÜBİTAK Projesi**, TBAG 109T788, **Proje Yürütücüsü**: Murat Kızıl **Proje Bütçesi:** 218.250,00 TL, **Proje Görevlileri:** Murat Kızıl, Bircan Çeken, Çetin Aytekin, Şafak ÖZHAN KOCAKAYA, **Sevil Emen Tanrıkut** 2010-2013

Halk arasında Antidiabetik Olarak Kullanılan, Juglans regia, Vaccinium nyrillus, Piperis longum, Rheum ribes, Apium graveuless ve Cupinus albus Bitkilerinin alfa-Amilaz ve alfa-Glukozidaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, **DÜBAP-10-FF-98**, **Projede Yürütücü, Proje Bütçesi:** 15.000 TL, **Proje Yürütücüsü:** Murat KIZIL, **Proje Görevlileri:** Murat Kızıl, **Sevil Emen Tanrıkut**, Haziran 2010-Haziran 2014.

Alıç (Crataegus monogyna) bitkisinin su ekstraktının antioxidant aktivitesi, oksidatif DNA hasarı ve protein oksidasyonu üzerine etkisi, Dicle Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, DÜBAP-14-FF-76, **Projede Araştırmacı, Proje Bütçesi:** 15.340 TL, **Proje Yürütücüsü:** Bircan Çeken Toptancı, **Proje Görevlileri:** Murat Kızıl, Göksel Kızıl, Veysel Güzel, Bircan Çeken Toptancı, **Sevil Emen Tanrıkut**, Sevcan Altaş, Hayyrettin Dinç, Mart 2014–Mart 2017 (3 yıllık, Proje devam ediyor).

Diğer Aktiviteler

Temmuz 2008- Ekim 2008 tarihleri arasında Ortadoğu Teknik Ünivesitesi, Kimya Bölümü'nde Biyoteknoloji Laboratuvarında **"Biyotransformasyon ve Enzimatik Reaksiyonlar"** konusunda Prof. Dr. Ayhan Sıtkı Demir denetiminde çalıştım. Çalışma kapsamında HPLC, FPLC, GS-MS cihazlarını kullandım.

Eylül 2009 -Aralık 2009 tarihleri arasında Erasmus programıyla Almanya Göttingen Georg- August Üniversitesi'nde Prof.Dr.Helmut Laatsch denetiminde **''Endofitik funguslardan sekonder metabolitlerin izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu''** üzerine çalışmalarda bulundum. Farklı kromatografik teknikler (TLC, PTLC, kolon kromatografisi, XAD kolon) kullandım. Bioautography tekniği ile antimikrobiyal analizler yaptım.

Sertifikalar

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu **''Deney Hayvanları Kullanım Sertikası ''** 10-18 Mayıs 2010 Diyarbakır

Varian optical Spectroscopy Instruments **''Model Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer''** kullanım sertifikası, Aralık 2010 Diyarbakır

Varian optical Spectroscopy Instruments **''Model Cary 100 UV-VIS Spectrometer''** kullanım sertifikası, Aralık 2010 Diyarbakır