



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

Gizem SİNANOĞLU

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof.Dr.Refiye YANARDAĞ

II. Danışman

Yard.Doç.Dr.Sevim TUNALI

Aralık, 2013

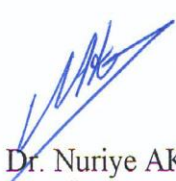
İSTANBUL

Bu çalışma 22/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Nuriye AKEV
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ayşen YARAT
Marmara Üniversitesi
Dış Hekimliği Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ayşe OGAN
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ayşe YUSUFOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü
Organik Kimya Anabilim Dalı

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-19731 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği tüm destek ve yardımlarından dolayı çok değerli sayın hocam Prof.Dr.Refiye YANARDAĞ'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Özlem SAÇAN'a, Yrd.Doç.Dr.Sevim TUNALI' ya, Ar.Gör.Dr.Bertan Boran BAYRAK'a , Ar.Gör.İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a, çalışma arkadaşlarıma ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan çok sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Aralık, 2013

Gizem Sinanoğlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. KOZMETOLOJİ VE TARİHÇESİ	3
2.2. DERİ	5
2.3.1. Derinin Yapısı	5
2.3.2. Derinin Görevleri	7
2.3. DERİ BİLEŞENİ KOLLAJEN.....	9
2.3.1. Kollajen Yapısı.....	9
2.4. CİLT YAŞLANMASI	12
2.4.1. Yaşlanma Süreci, Kollajen ve Kollajenaz	15
2.5. GENEL ENZİM TANIMI VE SINIFLARI	17
2.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	19
2.5.2. Hidrolazlar	22
2.5.3. Proteazlar	22
2.5.3.1. Proteazların Mekanizması	23
2.5.4. Matriks Metalloproteazlar (MMP)	25
2.5.4.1. Sınıflandırma ve Protein Yapısı	26
2.5.4.2. Matriks Metalloproteaz İnhibisyonu	27
2.6. KOLLAJENAZ ENZİMİ	29
2.6.1. Kollajenaz Tipleri	31
2.6.2. Bakteriyal Kollajenazın Keşfi	32

2.7. ENZİM İNHİBİSYONU.....	33
2.7.1. Yarışmalı İnhibisyon (Kompetitif);.....	33
2.7.2. Yarışmasız İnhibisyon (Non-kompetitif);.....	34
2.7.3. Yarıyarışmalı (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu;	35
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	36
3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER.....	36
3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	37
3.3. ENZİM İNHİBİSYONU TAYİNİNDE KULLANILAN BİTKİ MATERYALLERİ	37
3.3.1. Etil Alkollü Ekstrelerin Hazırlanması	42
3.4. KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİSYONUNUN ÖLÇÜLMESİ.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1.BİTKİ EKSTRELERİNİN KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİ..	45
4.2. KİMYASAL MADDELERİN KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİ	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Derinin yapısı.	6
Şekil 2.2: Kollajenin yapısındaki amino asidler.	11
Şekil 2.3: Kollajenin 3 boyutlu yapısı.	12
Şekil 2.4: Yaşlanma süreci.	16
Şekil 2.5: Genel reaksiyon mekanizması.	18
Şekil 2.6: Genel enzim çalışma prensibi.	19
Şekil 2.7. Genel hidrolaz enzim mekanizması.	22
Şekil 2.8: Proteazların mekanizması.	24
Şekil 2.9: Genel MMP yapısı.	27
Şekil 2.10: Metabolizmada MMP ve TIMP dengesi	28
Şekil 2.11: Kollajenaz enziminin yapısı.	30
Şekil 2.12: Yarışmalı inhibisyon.	33
Şekil 2.13: Yarışmasız inhibisyon.	34
Şekil 2.14: Yarı yarışmalı inhibisyonun inhibisyon reaksiyon şeması.	35
Şekil 4.1: Karadutun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	54
Şekil 4.2: Salatalık etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	54
Şekil 4.3: Asma yaprağı ve dalının etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	55
Şekil 4.4: Tetranın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	55
Şekil 4.5: Soğanın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	56
Şekil 4.6: Beyaz üzümün etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	56
Şekil 4.7: Ananasın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.	57
Şekil 4.8: U vitaminin % inhibisyon grafiği.	63
Şekil 4.9: Rutinin % inhibisyon grafiği.	63

Şekil 4.10: GSH'ın % inhibisyon grafiği.	64
Şekil 4.11: Sisteinin % inhibisyon grafiği.	64
Şekil 4.12: Tartarik asidin % inhibisyon grafiği.	65
Şekil 4.13: Gallik asidin % inhibisyon grafiği.	65
Şekil 4.14: Rezorsinolün % inhibisyon grafiği.	66
Şekil 4.15: Kateşinin % inhibisyon grafiği.	66
Şekil 4.16: Doksisiklin hilkatın % inhibisyon grafiği.	67

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.	20
Tablo 2.2: Kollajenaz türleri.	31
Tablo 3.1: Enzim inhibisyonu tayininde kullanılan bitki materyalleri	38
Tablo 4.1: Çeşitli bitkilerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC ₅₀ değerleri.	46
Tablo 4.2: Vitaminlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC ₅₀ değerleri.	58
Tablo 4.3: Amino asid ve peptidlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC ₅₀ değerleri.	59
Tablo 4.4: Çeşitli asidlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC ₅₀ değerleri.	59
Tablo 4.5: Çeşitli kimyasal maddelerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC ₅₀ değerleri.	61

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AP	: Aktivatör proteinler
CTFA	: The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGCG	: Epigallokateşingallat
ES	: Enzim-Substrat
FALGPA	: N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala
Gly	: Glisin
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
IUBMB	: Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji = International Union of Biochemistry and Molecular Biology
MMP	: Matriks metalloproteaz
mRNA	: Messenger RNA
ROS	: Reaktif oksijen türlerinin
SLES	: Sodyum lauril eter sülfat
SLS	: Sodyum lauril sülfat
SOD	: Superoksid dismutaz
TIMP1	: (Tissue Inhibitor of Matriks Metalloprotease) Matriks metalloproteazların dokudaki inhibitörleri
UV	: Ultraviole
UVB	: Ultraviole B

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRLERİ

Gizem SİNANOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr. Refiye YANARDAĞ

II. Danışman : Yard.Doç.Dr. Sevim TUNALI

Bu çalışmada son yıllarda sağlık ve kozmetik sektöründe önemli bir yer edinen kollajenaz enzim aktivitesi üzerine, çeşitli bitkilerden hazırlanan etanollü ekstrelerin ve bazı kimyasal maddelerin, kollajenaz inhibitör etkileri incelendi. Çalışmamızda kullandığımız bitki ekstrelerinin ve kimyasal maddelerin tümünde kollajenaz inhibitör etkisi saptandı. Elde edilen sonuçlardan bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin kollajenaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı belirlendi. Yüksek oranda kollajenaz inhibitör aktivitesi gösteren bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin kollajenaz inhibitörü olarak sağlık alanında ilaç tedavisine ilave olarak kullanımının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

Aralık 2013, Tezin sayfa sayısı: 107.

Anahtar kelimeler: Enzim, kollajenaz, inhibisyon.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INHIBITORS OF COLLAGENASE ENZYME

Gizem SİNANOĞLU

Istanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Prof.Dr.Refiye YANARDAĞ

Co-Supervisor : Yard.Doç.Dr. Sevim TUNALI

In this study, the inhibitory effects of chemical compounds and ethyl alcohol extracts prepared from different plants were investigated on the activity of collagenase which has an important value in health and cosmetic area. It was determined that all the plant extracts and chemical substances used in our study showed collagenase inhibitory effect. The results showed that inhibition % values of plant extracts and chemical compounds on the collagenase were increased with increasing concentration. It can be suggested that several plant extracts and chemical compounds which are potential sources of collagenase inhibitors may be appropriate to be used as an additional support to drug treatment in the field of health.

December 2013, The number of page of the thesis: 107.

Keywords: Enzyme, collagenase, inhibition.

1. GİRİŞ

Enzimler, yaşamın her alanında her proseste esansiyel rolü olan ve üzerine en çok çalışılan biyomoleküllerdir. Enzimler ve aktif bölgeleri hakkında elde edilen detaylı bilgiler ile kataliz ve protein yapısı, proteinlerin fonksiyonu arasındaki ilişki daha iyi anlaşılmış ve bu doğrultuda yeni enzimlerin ve enzim inhibitörlerinin tasarlanması mümkün hale gelmiştir (Porter ve diğ., 2004). Enzimler ve enzim inhibitörleri tıpta, gıda endüstrisinde, pestisitlerde, kozmetik sanayinde ve tarım sanayinde kullanılmaktadır (Friedman, 1996).

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler, yüzyıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Türkiye florasının önemli bir özelliği, oldukça zengin bir yapıya sahip olmasıdır. Ülkemizde 9000'e yakın bitki türü doğal olarak yetişmesine rağmen bunlardan yeterince istifade edilmemektedir. Kimyasal içerikleri üzerindeki çalışmalar ise çok yavaş yürümektedir (İlçim ve Dıgırak, 1998).

Günümüzde sağlığa verilen öneme paralel olarak, doğal, doğaya yakın olana gösterilen eğilim, bitkilerin her alanda kullanılmasını gündeme getirmekle birlikte, bitkileri kozmetik alanında da tercih edilen bir kaynak haline getirmiştir.

Kollajenaz (EC 3.4.24.3) enzimi hidrolaz sınıfına ait bir enzim olup, kollajenin 3'lü sarmal yapısını parçalar. Hidrolazlar, hidroliz reaksiyonlarını yani suyun H^+ ve OH^- iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını sağlarlar. Adını substratından alan enzim diğer adıyla matriks metallopeptidaz-1 veya matriks metalloproteaz-1 olarak da bilinir. Kollajenazlar, tiplerine göre değişmekle birlikte 50-60 kDa arasında değişen bir ağırlığa sahiptirler, kofaktör Zn metalidir. Ekstrasellüler proteolitik enzimler olan proteazların bir grubu aktivasyonları için bağlı durumda Ca^{2+} veya Zn^{2+} iyonlarına gereksinim duyan metalloproteazlar, diğer grubu aktif bölgelerinde reaktif serin içeren serin proteazlardır.

Kollajen, laninin ve fibronektin gibi matriks proteinlerinin metalloproteazlar ve serin proteazlar tarafından yıkılması hücre göçünü kolaylaştırır. Kollajenaz da bu enzimlerden biridir (Moon ve diğ., 2010). Bu enzimler dokunun yeniden yapılanması, dokuların ve sistemlerin normal yaplanması, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücrelerinin çevre dokulara yayılma ve işlevini bozma gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (Visse ve Nagase, 2003).

Tüm bu bilgilerden yola çıkılarak, kollajenaz enziminin cilt yaşlanması ve yara iyileşmesindeki rolü göz önünde bulundurularak, çeşitli bitki ekstraktlarının, çeşitli kimyasal maddelerin, asidlerin, vitaminlerin, amino asit ve peptidlerin bu enzim üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KOZMETOLOJİ VE TARİHÇESİ

Kozmetoloji, insan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve vücut kokularını düzeltmek ve korumak ve iyi bir durumda tutmak olan bütün preparatları veya maddeleri inceleyen ve geliştiren bilim dalıdır.

İnsanlar, kadın ya da erkek binlerce yıldan beri güzelleşmek, kendilerini başkalarına beğendirmek, genç görünmek, yüzlerindeki kırışık, yara, sivilce ya da çeşitli izleri gizlemek, güneşten, rüzgardan, soğuktan ciltlerini korumak, vücutlarındaki istenmeyen tüyleri gidermek, saçlarının dökülmesini önlemek ya da rengini değiştirmek için boyalar, merhemler, losyonlar ve parfümler yapmışlardır. Kozmetik, Yunanca “süslemekte usta” anlamına gelen *kos-metikos* sözcüğünden türetilmiştir (MsXLabs.org).

Kozmesötikler ya da “aktif kozmetikler” olarak adlandırılan ürünler ise, kozmetiklerle ilaçlar arasında geniş bir yelpazede yer alırlar. Kozmesötikler, deri ve deri eklerinin yapı ve fonksiyonlarını biyofizyolojik etki yoluyla olumlu yönde değiştirmek suretiyle kozmetik etki gösteren preparatlardır. Bunlar klasik kozmetik tanımına tam olarak uymayan ilaç ve kozmetik arasında bir grup preparattır (<http://www.drcanceylan.com/tr/dermokozymetik-urunler.html>).

Ölümlerle birlikte eşyaların da mezara konulduğu Eski Mısır’da yapılan arkeolojik kazılarda bulunan, yüze sürülen boyaların karıştırıldığı küçük kaseler, binlerce yıl sonra hala güzel kokusunu koruyan merhem kapları, İÖ 4000’lerde kozmetiklerin yaygın olarak kullanıldığının kanıtıdır. Genellikle rahiplerin hazırladığı bu güzellik ürünlerinin hoş kokulu bitkilerden, tohumlardan ve yağlardan elde edildiği bilinmektedir. Kekik,

tır, sedir ağacı, günlük, amber, misk, sakız, reçine ve çeşitli çiçekler, yapraklar ve kökler kullanılarak hazırlanan kozmetiklerin formülleri çok gizli tutulmuştur. İÖ 1400’lerde yaşamış olan Mısır Kraliçesi Nefertiti’nin yaşadığı dönemin kozmetik uzmanı olduğu ve Mısır Kraliçesi Kleopatra’nın ise güzelliğini bir bakıma kendi yaptığı kozmetiklere borçlu olduğu söylenebilir. Çeşitli kaynaklarda, I’inci Elizabeth dönemi İngiltere’inde saraylı kadınların güzelleşmek için sıcak bir banyodan sonra vücutlarını ve yüzlerini şarapla ovdukları ve süt banyosunun soylular arasında güzelliğin vazgeçilmez koşulu olduğu anlatılmaktadır. Fransa’da, XIII’üncü Louis döneminde ve İtalya’da, kozmetikler ön plandaki süslenme öğeleri olarak kullanılmıştır. İspanya’dan getirtilen vanilya ve kakao kremlerinden hanımların ciltlerini beyazlaştırma ve yumuşatmada yararlanılmıştır. 18. yüzyılda Fransa’da parfüm ve güzellik gereçleri bir sanayi dalı durumuna gelmiştir. 1880’lere doğru teknolojiye ve bilhassa yayıncılıktaki gelişmeler ve reklamın keşfi ile kozmetik tarihinde yeni bir devir açılmıştır. 1990’lı yıllardan sonra ise yaşlanma karşıtı, bilimsel verilere dayanan dermo-kozmetik ürünler, peptidler, bitkisel ajanlar içeren ürünler, doğaya zarar vermeyen renkli kozmetikler, amonyak içermeyen organik saç boyaları, doğal tüy azaltıcılar, sodyum lauril eter sülfat (SLES) ve sodyum lauril sülfat (SLS) içermeyen özel şampuanlar, erkekler ve çocuklar için özel olarak üretilmiş kozmetikler artan oranlarda pazar payı bulmaktadır (Kapucu ve diğ., 2010).

“Look good, Feel Better” (iyi görün, iyi hisset) bugün Amerika’da tüm radyoterapi ve kemoterapi alan kanser hastaları için The Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA), American Cancer Society ve National Cosmetology Association işbirliği ile yürütülen çok kapsamlı bir programdır. Bu program çerçevesinde kanser hastalarında tedavi ile ortaya çıkan saç kaybı, pigmentasyon değişiklikleri ve diğer kozmetik problemlere çözümler önerilmekte ve uygulanmaktadır. Kozmetik kamufraj vitiligo, skar oluşumu, pigmentasyon (renk) bozuklukları ve alopesi (kellik) gibi deri ve deri görünümünü etkileyen hastalıkların tedavisi sırasında veya sonrasında uygulanması gereken özel yöntemlerdir. Diğer yandan sağlıklı deriyi korumak, uygun bakımla fotoyaşlanmayı geciktirmek ve deride oluşan yüzeysel kırışıklıkları giderebilmek günümüzde uygun kozmetiklerin kullanımıyla mümkün olabilmektedir. Deriye uygulanan kozmetik ürünlerin bir kısmı da bitkisel kökenlidir. Deriye uygulanan kozmetik preparatlarda kullanılan bazı bitkisel kaynaklı maddeleri kullanılış amaçlarına

göre şu şekilde sıralayabiliriz: *Aloe vera* (sarısabır) nemlendirici ve yumuşatıcı, *Aloe ferox* Mill. vb. türler UVB'ye karşı koruyucu, nemlendirici ve cilt gerginliğini azaltıcı, *Anthemis nobilis* (Alman papatyası) rahatlatıcı, canlılık verici, *Matricaria chamomilla* L. ekstre (Papatya) rahatlatıcı, temizleyici, *Cucumis sativus* L. özsu (hıyar) yumuşatıcı, canlılık verici, *Fucus vesiculosus* L. Ekstre (esmer su yosunu) yumuşatıcı, rahatlatıcı, *Camellia sinensis* ekstre (çay) yumuşatıcı, nemlendirici, koruyucu, *Melaleuca alternifolia* (çay ağacı yağı), tonik, temizleyici, *Vitis vinifera* L.(asma) yumuşatıcı, koruyucu, *Calendula officinalis* L. ekstre (kandil çiçeği) yumuşatıcı, koruyucu, yara iyi edici, *Centella asiatica* L.ekstre (Gotu kola bitkisi), temizleyici (Çomoğlu, 2012).

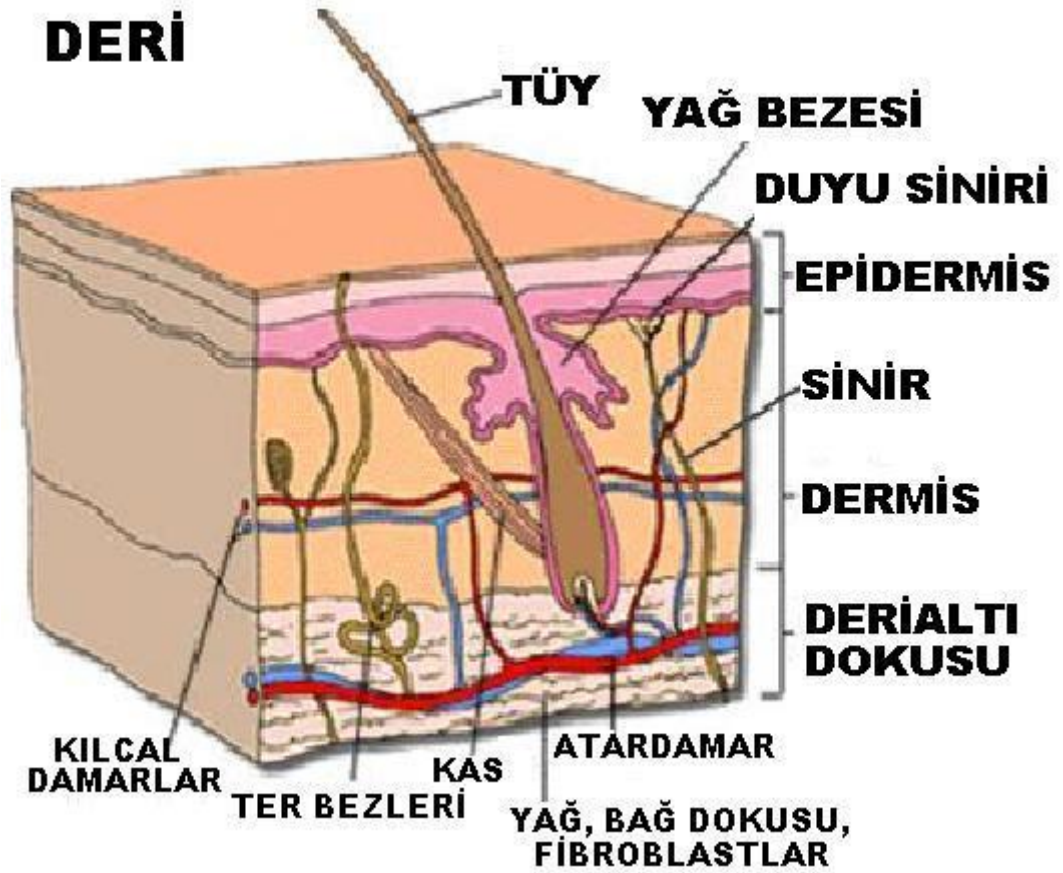
2.2. DERİ

İnsan derisi, vücudun en büyük organı olup, vücut ağırlığının % 16'sını oluşturmaktadır ve dolaşımımızdaki kanın 1/3'ünü bulundurur. Yetişkin bir insanda 1,8 – 2,0 m² bir alanı kaplayan derinin ağırlığı; 9 – 10 kg civarındadır.

Deri, vücudumuzdaki diğer birçok organ ve sistem gibi yaşam için vazgeçilmez öneme sahiptir. Vücudun farklı kısımlarında kalınlığı ve bileşimi değişiklik göstermektedir. Derinin normal pH'sı 5.5 - 6.5 arasındadır. Buna derinin asid mantosu adı verilir. Deriyi dış etkenlere karşı korur (Lee ve diğ., 2012).

2.3.1. Derinin Yapısı

Deri iki ana tabakadan oluşur bunlar, epidermis ve dermistir (Şekil 2.1.). Burada meydana gelen kalınlaşma intrinsik yaşlanma olarak adlandırılır (Varani ve diğ., 2000).



Şekil 2.1: Derinin yapısı (<http://selliogfenci.blogspot.com/2012/05/derimiz-ve-yaps.html>).

Dermis, deriye esneklik ve dayanıklılık verir. Kalınlığı 1-4 mm arasındadır. Fibröz bir yapıdadır. Ana bileşen olarak kollajen içerir. Kan damarlarını, sinirleri ve derideki yapıları destekler. Mast hücreleri ve makrofajlar yoluyla enflamatuvar reaksiyonun ve immün yanıtın oluşumunu sağlar.

Deri altı dokusu, dermisin hemen altında yer alan, büyük miktarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşur, bu doku deriye fiziksel destek sağlar, kollajen yoluyla derinin esnekliğini temin eder, ısı yalıtımında görev alır.

Bağ dokusu, vücutta yaygın olarak bulunan ve hücreler arası (intersellüler) boşlukları dolduran, çok miktarda ekstrasellüler matriks (hücreler arası madde) ve bunun içerisinde dağılmış hücreler ve lifsel proteinlerden oluşan destek dokudur. Vücuttaki birçok önemli yapının başlıca bileşeni olan bağ dokusu kemik, kıkırdak, tendonlar, deri, damar

duvarı ve yağ dokusunda birbirlerinden farklı özellikler gösterir. Bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinde başlıca 3 tip makromolekül bulunur.

Bunlar;

1-) Yapısal proteinler olan kollajen, elastin, fibrilin

2-) Fibronektin ve laminin gibi özelleşmiş proteinler

3-) Glikozaminoglikanların proteinlerle bağlanarak oluşturduğu proteoglikanlardır.

Örneğin yüksek gerilme direnci gösteren tendonlarda kollajen, kıkırdak gibi kompresyona karşı koyması gereken dokularda ise proteoglikanlar fazladır. Ekstrasellüler matriks etkileşim halinde olduğu hücrelerin gelişimi, yaşam süresi, göçü, çoğalması, biçim ve fonksiyonunu düzenler (Mathisen ve diğ., 2006).

2.3.2. Derinin Görevleri

- Koruma; deri mikropları geçirmeyen anatomik bir bariyerdir.
- Hissetme; içerdiği sinir hücreleri ile sıcak soğuk, dokunma, basınç, titreşim ve doku yaralanmalarını hissetme özelliği vardır.
- Isı dengeleme, vücut ısısının su iletimi ile dengelenmesi; gerektiğinde terleme, buharlaşma yolu ile sıcaklık azaltılır. Gerektiğinde derideki gözenekler büzülerek sıcaklık kaybı önlenir.
- Depolama ve sentez; yedek besin olan lipidler ve su için depolanma merkezidir. Ultraviyole ışınlar ile derideki kolesterolü D vitaminine dönüştürür.
- Su dengesi; terleme ile deriden sıvı kaybedilir.
- Solunum; oksijen, azot ve karbondioksit epidermisten difüze olur. Bazı hayvanlar solunum organı olarak deriye sahiptirler (Stücker ve diğ., 2002; Madison, 2003).

Deriye tatbik edilen kozmetiklerin en önemli amacı derinin fizyolojik özelliklerini değiştirmeden güzelleştirmek ve korumaktır. Kozmetiklerin deri sağlığında kullanımı 3 temel aşamadan oluşur:

- 1) Deri temizliği
- 2) Derinin nemlendirilmesi
- 3) Deri bakımı

Deride ilerleyen yaşla birlikte belirgin bazı değişiklikler ortaya çıkar. Epidermal ve dermal incelme, epidermal yenilenme sürecinin uzaması, epidermal ve dermal hücrelerin sayı ve aktivitelerinde azalmanın yanısıra temel yapıyı oluşturan glikozaminoglikan ve proteoglikanlar gibi mukopolisakkaritler de azalır. Kollajen liflerin miktarı azalır ve yapısı bozulur. Elastik liflerde kalınlaşma ve parçalanmalar oluşur. Sonuçta deri sarkar ve kırışır. İntrensek veya gerçek yaşlanma olarak bilinen bu durum genler ile planlanmış doğal bir süreçtir ve engellenemez. Ancak çeşitli çevresel etkenlerin bu doğal süreci arttırdığı, hızlandırdığı veya erken başlattığı bilinmektedir. Deri yaşlanmasını hızlandıran çevresel etkenlerin başında solar radyasyon (UV) gelir. Fotoyaşlanma olarak bilinen bu tablo, beklenenden daha erken dönemde derin ve üst dermiste elastik liflerin harabiyeti ile ortaya çıkmaktadır. Deride kalınlaşma, kabalaşma ve daha derin kırışıklıklar oluşur. Bu bulguların yanında deride kuruluk, aktinik keratoz (kansereleşebilen cilt kalınlaşmaları), düzensiz pigmentasyon, lentigolar (kahverengi lekeler), telenjektaziler (kılcal damar genişlemesi) ve sebase hiperplazi (yağ bezlerinin genişlemesi ile oluşan sarı kabartılar) görülür. Fotoyaşlanma yaşa bağlı gelişen kozmetik problemlerin en önemli nedenidir ve engellenebilir. Epidermal kalınlaşma, özellikle papiller dermiste mukopolisakkaritlerde artış, elastik fibrillerde düzen ve kollajen dansitesinde artış sağlar (Çomoğlu, 2012).

2.3. DERİ BİLEŞENİ KOLLAJEN

2.3.1. Kollajen Yapısı

Kollajen yüksek çekme gücüne sahip, erimez lifler (fibers) oluşturan yapısal proteindir. Sertlik ve dayanıklılık gerektiren dokularda bulunur. Vücudun total protein kütlesinin 1/3'ünden fazlasını oluşturan kollajen kemik, deri, tendonlar, kıkırdak, diş, ve korneanın en önemli fibröz elementidir. Kornea ve kemik gibi farklı özellikteki dokularda kollajenin temel yapısı bu dokuların gereksinimine göre düzenlenmiştir. Korneadaki kollajen saydam olacak şekilde yapılanmıştır. Tendonlardaki kollajen, gerilmeye dirençli halat şeklinde lifler oluşturur. Deride ise kollajen tüm yönlere uzayabilen gevşek dokulu lifler halindedir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

Deney hayvanları üzerine yapılan çalışmalar, bu önemli bağ doku proteininin biyolojik fonksiyonunun ve biyosentezinin anlaşılmasını sağlamıştır. Kollajenin amino asid kompozisyonu ve dizilimi, kollajen monomerinin 3'lü heliks yapısı, kollajen ve jelatin arasındaki ilişki hakkında yoğun araştırmalar yapılmıştır. Daha çok proteinlerin α -(helezon) ve β -(kırmalı tabaka) yapılarında bulunan ikincil yapı bağlarının sıcaklıkla denatürasyonu sonucu çözünebilir kollajen elde edilmiştir. Bu da kollajen molekülündeki 2 zincirin amino asid diziliminin 3'üncü zincirden farklı olduğunu kanıtlamaktadır. Sonuç olarak bağ dokudaki bazı düzensizlik ve bozuklukların oluşmasında çapraz bağların önemli rol oynadığı, kollajen yapısında molekül içi ve moleküller arası kovalent bağların varlığı ve böylece kollajen monomerlerinden oluşan büyük kollajen polimerlerinin varlığı bilinmektedir.

Kollajen türleri hakkında yapılan araştırmalar diğer memeli türlerindeki kollajen yapısının, insan protein yapısıyla uygunluk gösterdiğini açıklamıştır (Bornstein ve Piez, 1964).

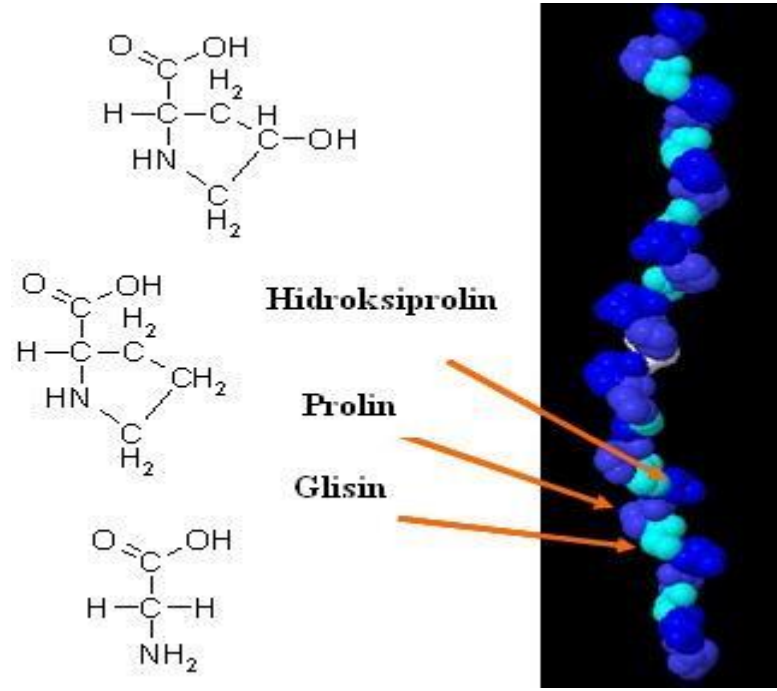
Kollajenin yapısında % 35 oranında glisin ve % 11 oranında ise alanin bulunmaktadır. Kollajen diğer proteinlerden farklı olarak ayrıca % 12 oranında prolin ve % 9 oranında ise hidroksiprolin ihtiva etmektedir (Şekil 2.2) Bu amino asidlere diğer proteinlerde nadir olarak rastlanmaktadır (Champe ve Harvey, 2005). Özellikle hidroksiprolin

kollajenin üçlü heliks yapısının stabilizasyonunda önemlidir (Engin, 2004). Kollajenin amino asit dizilimi genellikle tekrarlayan bir tripeptid birimidir ve glisin-x-prolin veya glisin-x-hidroksiprolin şeklinde dizilim görülür ve arada bulunan x herhangi bir amino asit olabilir. Kollajenin üçlü heliks yapısındaki α zincirlerinin sıkıca sarılması, kollajene eşit boyuttaki bir çelik telden daha fazla gerilme kuvveti sağlar (Nelson ve Cox, 2005). Zincirlerin biyokimyasal yapılarına göre birçok kollajen tipi bulunmaktadır (Rigler, 1997).

Tip I kollajen cildin başlıca bağ doku proteindir. Bunun yanında bağ dokuda kollajenin diğer türleri olan (III,V,VII), elastin, proteoglikanlar, fibronectin ve diğer ekstrasellüler matriks proteinleri bulunur. Yeni sentezlenen tip I prokollajen enzimatik işleme uğradığı dermal ekstrasellüler boşlukta saklanır ve 3'lü heliks yapısını kendi oluşturur. 3'lü heliks kompleksi diğer ekstrasellüler matriks proteinleriyle bağlantılıdır ve böylece düzenli ağısı yapı oluşur. Bu fibrilogenesis adı verilen süreç kollajen demetlerinin oluşmasıyla sonuçlanır. Bu yapı cildin dayanıklı, esnek formda olmasından sorumludur (Rittie ve Fischer, 2002).

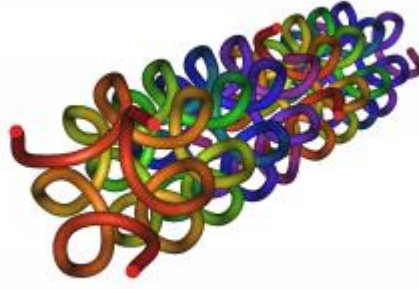
Kollajenin temel yapısal birimi olan “tropokollajen” üç polipeptid zincirinden meydana gelmiştir (Ohtsuki ve diğ., 2008). Kollajenin ön maddesi pro-kollajenin hidroksilasyonu ile tropokollajen oluşur. C vitamini pro-kollajenin hidroksilasyonunu sağlar.

Her bir polipeptid zincirinin genel formülü (-Gly-x-y-)'tür. X ve y pozisyonlarındaki amino asit kalıntıları genellikle prolin ve hidroksiprolindir (Şekil 2.2). Bir glikoprotein olan kollajenin yapısındaki karbohidrat birimleri, hidroksilizin kalıntılarına O-glikozidik bağla bağlanmış glukoz ve galaktozdur (Donahue ve diğ., 2006).



Şekil 2.2: Kollajenin yapısındaki amino asitler (<http://www.joint-muscle-relief.com/how-to-build-collagen.html>).

Teorik olarak birbirinden farklı 42 α zincirinden, yaklaşık 40 tip kollajen molekülü meydana geldiği saptanmıştır. Alfa zinciri denilen her bir polipeptid zinciri yaklaşık 1000 amino asit içerir. Kollajeni oluşturan amino asitler helezon yapıyı bozucu olduklarından α -helezon yapısı meydana gelmez. Polipeptid zinciri çizgisel olur. 3 polipeptid zinciri saç örgüsü şeklinde birbirine sarılarak özel bir yapı meydana gelir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Kollajenin 3 boyutlu yapısı (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kollajen_heliks).

Bağ dokusunda bulunan başlıca kollajen tipleri, fibriler veya fibril oluşturan kollajenler olan tip I,II,III,V ve XI'dir. Vücutta en çok bulunan kollajen deri ve kemiğin başlıca kollajeni olan tip I'dir (Robertson, 1964).

Organ ve dokuların bütünlüğü ile dayanıklılığını sağlayan tip I kollajen, vücuttaki kollajenin % 90'ını oluşturur ve başlıca deri, kemik ve tendonda bulunur. Tip III kollajen ise deri, kan damarları ve iç organlarda bulunur ve dokulara esneklik sağlar. Yetişkin memelilerin derisinde % 80 tip I ve % 20 tip III kollajen bulunur (Calvin, 1998). Yara iyileşme evresinin başlangıç sürecinde tip III kollajen fazlaca bulunur. Kollajen, fibroblastların ribozomlarında üretildikten sonra endoplazmik retikuluma geçerek heliks yapısını alır (Diegelmann, 2001).

2.4. CİLT YAŞLANMASI

Yaşlılık deri hastalıklarından farklı olarak herkesi etkileyen bir durumdur. Yaşlılık altmış beş yaş üzeri olarak tanımlanır ancak derinin yaşlanması doğumla birlikte başlar. Yaşlanma belirtileri 20 yaşına kadar büyüme ve gelişme olarak görülürken, 20 yaşından sonra deride yaşlanma belirtileri görülmeye başlar (Mevlitoğlu ve diğ.,2009).

Gelişmiş ülkelerde değişen ve gelişen ilgi alanlarıyla, yaşlanmanın cildin işlev ve görünümü üzerine etkilerinin azaltılması yönünde beklentiler bir hayli artmıştır. Cilt yaşlanmasında bir çok faktör etkilidir. Bunlar; genetik içerikli faktörler, UV, radyasyon, ksenobiyotikler (ilaç ve zehirler gibi), mekanik stres gibi maruz kalınan çevresel etkiler, hormonal değişiklikler ve aktifleşmiş oksijen türleri, şekerler ve aldehitler gibi reaktif kimyasal bileşiklerin metabolitik yollarda metabolizmada oluşumudur.

Fotoyaşlanma ve kronik cilt yaşlanması iki farklı oluşumdur. Buna rağmen her ikisinde de ortak olarak son bulgularla, değişen sinyal yollarıyla matriks metalloproteazların (MMP) düzenlenmesi, azalan prokollajen sentezi ve bağ doku hasarlarının söz konusu olduğu kanıtlanmıştır. Bu işleyişteki moleküler mekanizmaya uyumlu olarak da UV ışımının insan derisinde kronik yaşlanmayı hızlandığı açıktır.

Zamanla yaşlanmış cilt ince, kuru, pürüzsüz, lekesiz ve elastik yapısını biraz kaybetmiş olur. Histolojik düzeyde, kronolojik olarak yaşlanmış cildin fibroblast sayısının azalmasıyla birlikte ekstrasellüler matrikste atrofi (körelme) ve kollajen ile elastin düzeyinde azalma görülür. Böylece elastin liflerinin ve kollajen liflerinin organizasyonu da bozulmuş olur. Bu bozulmayla birlikte derideki tip I ve tip III kollajenin etkilenmesine neden olan protein sentezlerinde azalma ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin bozunumunda ise artma görülür (Varani ve diğ., 2000).

Güneşten korunmuş ve güneş ışınlarının zararlı etkilerine maruz kalmış yaşlanmış ciltler görsel olarak karşılaştırıldığında, yaşlanma görünümünün ilk olarak güneş ışınlarından kaynaklandığı gözler önüne sergilemektedir. Fotoyaşlanmış ciltte kırışıklıklar, gevşeme, kalitesizleşme, dengesiz pigmentleşme ve kahverengi lekeler oluşur. Kollajen ve elastinin fibriler organizasyonundaki bozulma güneşten korunmuş cilde kıyasla fotoyaşlanmış ciltte çok daha şiddetlidir. UV radyasyonu insan derisindeki matriks metalloproteaz-1, matriks metalloproteaz-3 ve matriks metalloproteaz-9 genlerini *in vivo* olarak uyarır (Rittie ve Fischer, 2002).

Güneş ışınlarına maruz kalmış ya da diğer bir deyişle fotoyaşlanmaya uğramış ciltte kaba ve derin çizgiler, kırışıklar ve pigmentler oluşur. Diğer bir taraftan, güneşten korunmuş ciltte yaşlanmayla oluşan zararlı değişimler, fotoyaşlanmış ciltteki değişimlerle benzerlik gösterir. Her iki durumda da MMP aktivitesinde artış ve kollajen

I miktarında azalma gözlenmiştir. UV-ışımının etkisi elastin yıkımına ve kollajen dejenerasyona neden olur (Jenkins, 2002).

Intrinsik (iç kaynaklı) yaşlanmayla fibroblastların biosentetik kapasitesinde ve sayısında azalma meydana gelir. Yaşlanmayla deride kollajen içeriği azalır ve bebeklikte sık ve yoğun dağılım gösteren bu yapı zamanla daha dağınık, rastgele bir dağılım gösterir hale gelir. Yaşlanma öncesinde dermal fibroblastlarda, metalloproteazlardan olan kollajenaz (MMP-1)'in ve sitromelisin (MMP-3)'in aktivitesi nispeten düşüktür. Bu iki kilit matriks parçalayıcı enzim çok düşük miktarlarda gözlenir. Buna karşılık olarak metalloproteaz inhibitörleri olan Tissue inhibitor Matrix Metalloproteinase (TIMP1) ve TIMP3'ün miktarı ve indirgeme kapasitesi daha yüksektir. Yaşlanmayla birlikte ise metalloproteaz miktarları artarken, bu enzim sınıfının dokudaki inhibitörlerinde (TIMP) azalma tespit edilmiştir. Bu değişimlerin bileşimiyle, kollajen biyosentezi anne karnındaki dönemden başlayarak yıllar geçtikçe düşüş gösterir. Elastin geni oluşumunun 40-50 yaşlarından sonra düşüş gösterdiği, hücre kültüründeki fibroblastların mRNA'ları ile saptanmıştır ve böylelikle deride elastik dokuların azalma süreci başlamış olur (Jenkins, 2002).

Alternatif bir hücrel yaşlanma teorisi hipotezi ise oksidatif stres teorisidir. Bu teoride; redoks hassasiyeti yüksek genlerin genetik programının dış oksidatif strese maruz kaldığında gördüğü etkiden yola çıkılmıştır. Deneysel bulgular toplam oksidatif hasarın vücut için etken bir yaşlanma faktörü olduğunu göstermiştir. Cildin epidermis katmanı özellikle antioksidan aktivitesine karşı diğer dokulardan daha hassastır ve bu antioksidan sistemindeki azalma cilt yaşlanması için bir faktördür. Cilt yaşlanmasında, antioksidan kapasitesinin rolü bir takım farklı yorumları beraberinde getirmiştir. Bir takım bulgular, Cu-Zn içeren enzimler, superoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GP_x) gibi enzimler üzerine antioksidan kapasitenin etkisini savunurken, bazıları ise deri yaşlanmasının antioksidan kapasitesiyle gerilemediğini ve fare derisinde katalaz, SOD ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinin yaşlanmayla sabit kaldığını kanıtlamıştır. Buna karşılık, serbest radikallerin hücrel yaşlanmayı hızlandırdığı ve yaşlanmayı %100 etkilediği çeşitli araştırmacılar tarafından kabul edilmiş bir durumdur. Bunu destekleyici olarak bir başka çalışmada; yaşlı donörlerden alınan fibroblastların okside proteinlerinin genç fibroblastlara nazaran oksidatif stres

varlığında daha kolay zedelenebilir olduğu ve bu durumun ortadan kaldırılmasının yaşlanmış fibroblastlarda pek de mümkün olmadığı gösterilmiştir (Jenkins, 2002).

Ekstrinsik (dış kaynaklı) yaşlanma; öncelikle UV ışınlar maruz kalınması sonucunda ortaya çıkar. Yüzdeki yaşlanma % 80 oranla güneşe maruz kalınmasına dayandırılabilir. Kliniklerce; güneş ışınlarının zararları elastik yapının kaybedilişi, pürüzlülüğün ve kuruluğun artışı, derin kırışıklıklarla karakterize edilmiştir. Güneş ışınlarınca zarar görmüş, değişime uğramış epidermiste epidermal yoğunlukta artma ve azalma gösterir, epidermal yoğunluk kaybı gözlenir, dermal ekstraselüler bileşimdeki oranların değişimi ve buna bağlı gözle görünür başlıca değişimler UV kaynaklı ekstrinsik zararlar ilişkilidir (Jenkins, 2002).

2.4.1. Yaşlanma Süreci, Kollajen ve Kollajenaz

Derinin prensipte; kollajen lifleri, elastik lif ağı ve glikozaminoglikanlar olmak üzere üç adet bileşeni vardır. Kollajen, kuru cildin % 80'ini oluşturan ve cildin dayanıklı gerilme özelliğinden sorumlu yapısıdır. Elastik lif ağı cildin elastikiyetinden sorumlu olup, güneşten korunmuş cildin nemlenmesinde ve biyolojik sinyal gönderilip alınmasında önemli rol oynarlar. Bu kısım kuru cildin % 0.1 - 0.3'ünü oluşturur. Bu 3 bileşendeki değişim foto zarara uğramış cilt olarak tanımlanır (Jenkins, 2002).

İnsan derisinin bağ dokusundaki ekstrasellüler matriksin primer yapısını, yapısal proteini olan kollajen oluşturur. UV ışınlarına maruz kalındığında ciltteki kollajen ve elastik lifler denatürasyona uğrar, fotoyaşlanma denilen kırışıklıklara yol açar.

Kırışıklıklar, sarkmalar ve ciltteki aşırı lekelenmeler yaşlanmanın karakteristik göstergeleridir. Cilt yaşlanması iki basit prosese ayrılır. Bunlar instrinsik ve ekstrinsik faktörlerdir. Ekstrinsik, yani çevresel nedenlerle gelişen fotoyaşlanma, bir takım kırışıklıklar, yüz, boyun ve kolun ön kısmında oluşan lekelenmelerle tanımlanır.

Bağ dokusunun yapısal proteini olan tip I kollajen, asıl olarak fibroblastlarda sentezlenir, ciltte dayanıklılık ve esnekliği sağlar. Kollajenin yanı sıra hiyaluronik asid de cilt yaşlanmasıyla ilişkilidir.

UV-ışınlarının etkisiyle ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinden olan, tip I kollajen, elastin, proteoglikanlar ve fibronektinlerin bozulması deri hasarlarını meydana getirir. Bu proteinlerin düzensizliği ve parçalanması cilt yaşlanmasına yol açar. UV-ışınları ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna matriks metalloproteaz (MMP) 1-3 ve 9 adı verilen MMP'ların deride oluşumuna sebep olur.

Genel olarak MMP ile ilişkili kollajenin bağ dokuda hasar görmesiyle foto yaşlanmanın gerçekleştiğine inanılır. Bundan yola çıkılarak, doğal yollarla elde edilen bileşiklerle kollajen sentezinin canlandırılması ya da kollajen yıkımını sağlayan MMP'ların inhibisyonu yoluyla yaşlanmanın önlenmesinde (anti-aging) gelişme sağlanabilir. Yaşlanma, birçok faktörün etkisiyle oluşan kompleks bir olgudur (Resim 2.4). Çeşitli ajanlar yoluyla kollajenaz inhibisyonu, fotoyaşlanma ve kırıxık oluşumuna karşı potansiyel tedavi olarak kullanılabilir (Masuda ve diğ., 2012).



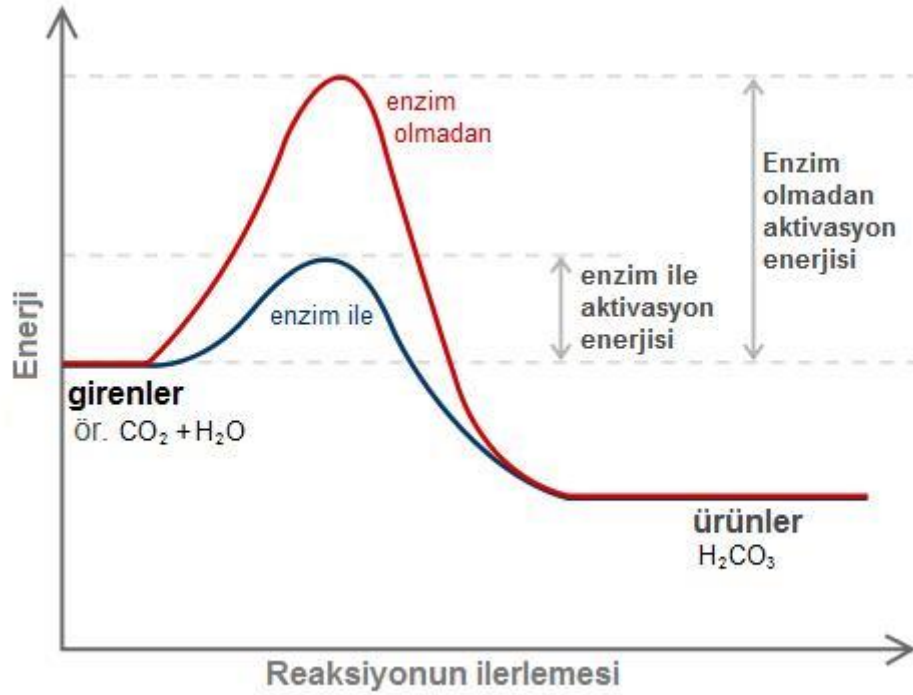
Şekil 2.4: Yaşlanma süreci.

2.5. GENEL ENZİM TANIMI VE SINIFLARI

Biyolojik kataliz, ilk olarak midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedildi ve tanımlandı. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirildi. 1850'lerde, Louis Pasteur şekerin mayayla alkole mayalanmasının "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna varmıştır. Pasteur bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapılarından ayıramaz olduğunu ileri sürmüş ve bu görüş uzun yıllar ön planda tutulmuştu. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştüğünü, bunun da fermentasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırmıştır. Yeni enzimlerin izolasyonu, özelliklerinin araştırılması biyokimya bilimini geliştirmiştir. James Sumner tarafından 1926'da üreazın kristallendirilmesi ve izolasyonu ilk enzim çalışmalarında yeni bir açılım sağlamıştır. Sumner üreazın kristallerinin tamamen protein olduğunu bulmuş ve bütün enzimlerin protein olduğunu ileri sürmüştür. 1930'larda John Northrop ve Moses Kunitz pepsin, tripsin ve diğer sindirim enzimlerini kristallendirmiş ve bunların da protein olduklarını bulmalarından sonra Sumner'in fikri geniş bir kabul görmüştür.

Canlılığın sürdürülebilmesi için iki temel koşul, organizmanın kendini kopyalaması ve kimyasal reaksiyonları yüksek seçicilik ve verimlilik ile biyolojik ortamda kataliz edebilmesidir. Bu bahsi geçen kimyasal reaksiyonların metabolizma ortamında gerçekleşmesini sağlayan özelleşmiş biyopolimere enzim adı verilir (Gürdol ve Ademoğlu, 2006).

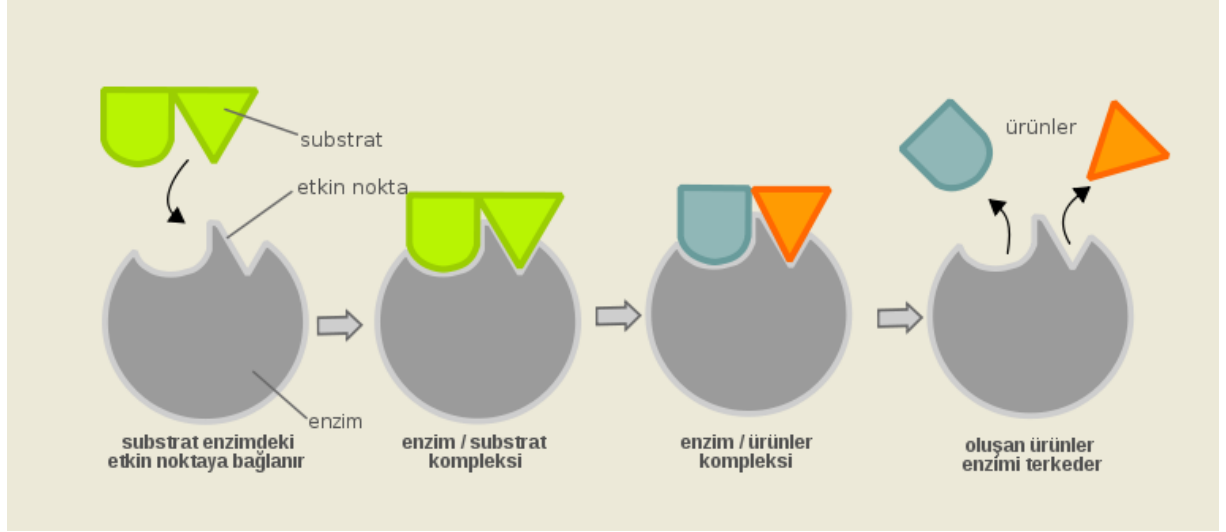
Tüm kimyasal reaksiyonlarda reaktifler ürüne dönüştürülmeden önce aşılması gereken enerji engeli vardır. Bu enerji bariyerine aktivasyon enerjisi adı verilir. Enzimler, biyolojik reaksiyonların hızını, moleküllerin aşması gereken bu enerji engelini yani aktivasyon enerjini düşürerek arttırırlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Genel reaksiyon mekanizması (<http://www.biyolojidersnotlari.com/cgi-sys/suspendedpage.cgi>).

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık olarak 12.000'den 1 milyona değişen molekül ağırlığına sahiptir. Enzimler son derece spesifiktirler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimler de bulunmaktadır. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrede bile aynı anda pek çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelir (Tüzün, 1997). Enzimler hücredeki reaksiyonlarda yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar % 100 verimle sonuçlanır. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymazlar. Diğerleri, kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks inorganik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu bir prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein

kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır. Genel enzim çalışma prensibi Şekil 2.6 da gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Genel enzim çalışma prensibi (http://tr.wikibooks.org/wiki/Dosya:Bir_substrat.svg).

2.5.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre sınıflandırılır. Birçok enzim; aktivitesini tarif eden deyim veya bir kelime ya da substratın adına “-az” son eki ilavesiyle adlandırılır. Yeni keşfedilen enzimlerin sayısındaki sürekli artış nedeniyle enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için uluslararası anlaşmayla bir sistem benimsenmiştir. IUBMB (Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji = International Union of Biochemistry and Molecular Biology)’nin kabul ettiği bu sistemde enzimler, katalizlediği tepkime tipini esas alarak altı temel gruba ayrılır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.

ENZİMLERİN ULUSLARARASI SINIFLANDIRILMASI		
<u>No.</u>	<u>Sınıf</u>	<u>Katalizlenen tepkime tipi</u>
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (Hidrit iyonları ve H atomları)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondenzasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Her enzime 4 rakam ile belirlenen bir kod numarası verilmiştir.

1-Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme olaylarını katalizleyen enzimlerdir. Oksidoredüktazlar ayrıca dehidrojenazlar ve sitokromlar, oksidazlar, oksijenazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılabilirler. Solunum ve fermentasyon olaylarıyla ilgili enzimler oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Örneğin; katalaz, laktat dehidrojenaz.

2-Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Tek karbonlu grupları, aldehit ve keton gruplarını, açıl gruplarını, glikozil gruplarını, fosfat gruplarını, kükürt içeren grupları aktaranlar olmak üzere farklı alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; kreatin kinaz, aspartat transaminaz.

3-Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını, suyun H^+ ve OH^- iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar, ester bağlarına, glikozil bileşiklerine, eter bağlarına, peptit bağlarına, diğer C-N bağlarına, asetanhidrit bağlarına, C-C, C-P, C-halojen, C-S, P-N, S-S bağlarına etki edenler olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; lipaz, üreaz.

4-Liyazlar (Sentazlar): Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik veya oksidatif olmayarak ayrılmasını kataliz ederler. C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir veya tam tersi bir yolla etkenlik gösterirler. Örneğin; piruvat dekarboksilaz.

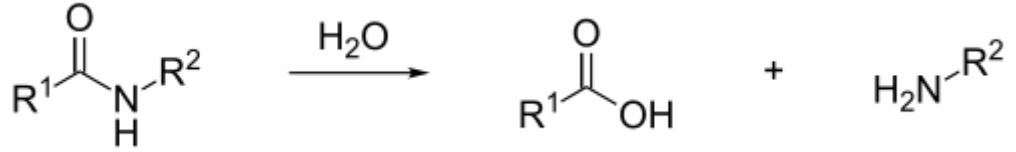
5-İzomerazlar: Substratın molekül içi değişilliklerini katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir. Rasemazlar ve epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksidoredüktazlar, intramoleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar ve diğer liyazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; glukoz-6-fosfat izomeraz.

6-Ligazlar (Sentetazlar): Ligazlar iki molekülün birleşmesini kataliz ederler. Bu birleşme için gerekli enerji ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır. Örneğin; piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz (Can ve Akev, 2008; Tekman ve Öner, 1981).

2.5.2. Hidrolazlar

Enzim teknolojisinde çokça yer alan enzim sınıfıdır. Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptid, glikozil, asid anhidrit, C-C, C-halojen, ya da P-N bağlarının hidrolizini kataliz ederler.

Bu enzim sınıfında, protein, peptin ve peptidlerin sınırlı hidrolizini kataliz eden enzim grubuna ise proteazlar denir (Şekil 2.7). Proteinaz da denilen bu enzim sınıfında yer alan, proteinlerin iç peptid bağlarını hidroliz eden enzimler ise endopeptidaz adını alır (Pekin, 1979).



Şekil 2.7: Genel hidrolaz enzim mekanizması.

2.5.3. Proteazlar

Proteazlar; proteinlerin hidrolizlerini katalizleyen ve peptidlere ya da amino asidlere yıkılmalarını sağlayan, aşamalı olarak bozulan enzimlerdir. Hücresel boyuttan organ ve organizma boyutlarına kadar uzanan çok çeşitli fonksiyonları yürüten homeostaz (kanamayı durduran süreçler) ve enflamasyon gibi kaskad sistemlerini üretirler. Hücrenin normal fizyolojik gelişiminde ve başkalaşımında, protein katabolizmasında, yer değiştirmesinde, doku düzenlenmesinde ve gelişme sürecindeki morfojenizde kompleks süreçlerden sorumludurlar. Genellikle tümör büyümesi ve metastaz gibi

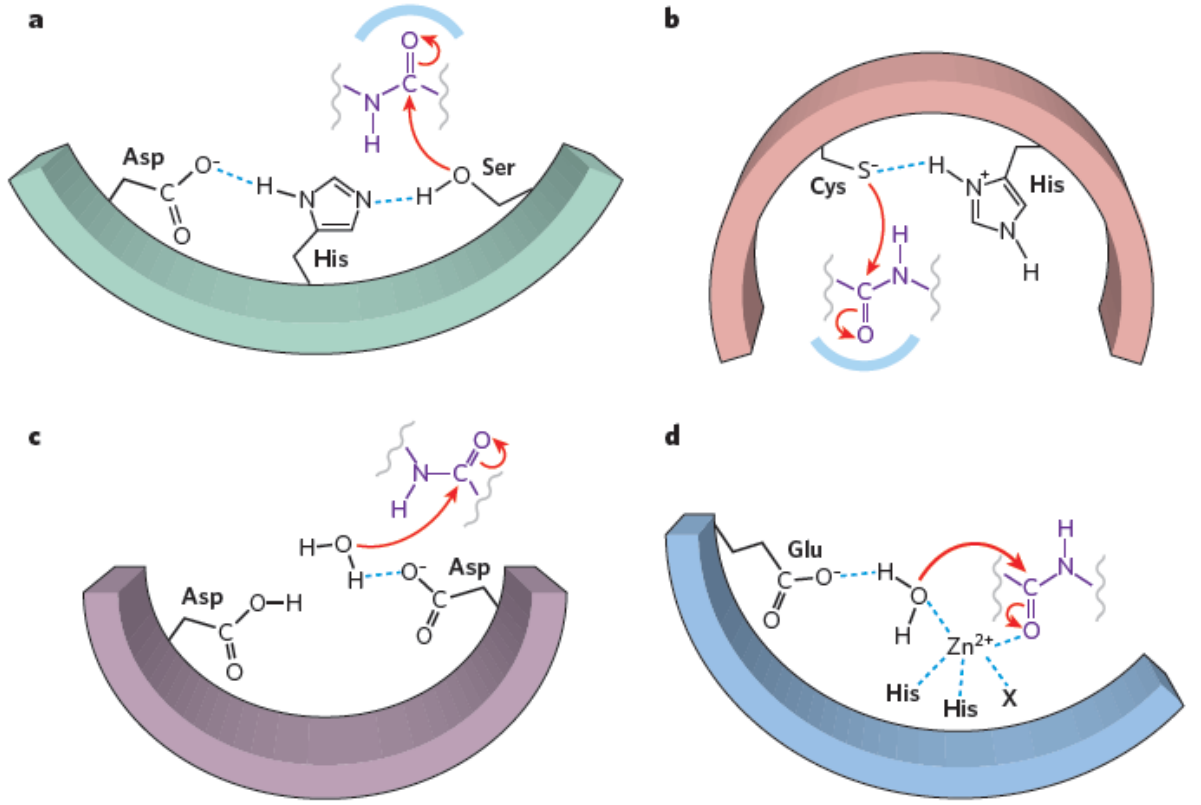
çeşitli patolojik süreçlerde kritik rol oynarlar. Proteazlar, fizyolojik olarak temel ve bulunması zorunlu moleküller olduklarından, virüsler, prokaryotlar, mantarlar, bitkiler ve hayvanları kapsayan çok çeşitli organizmalarda aynı anda organizmanın birçok kısımlarında meydana gelirler (Gupta ve diğ., 2002; Rao ve diğ., 1998).

2.5.3.1. Proteazların Mekanizması

Polipeptidler, kimyasal yolla ve enzimatik olarak iki şekilde parçalanırlar. Peptid bağlarının hidrolitik yıkılmasını katalizleyen enzimlere proteazlar denir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)'ne göre proteazlar 4 alt gruba ayrılırlar;

- 1-) Serin proteazlar (EC 3.4.21)
- 2-) Sistein proteazlar (EC 3.4.22)
- 3-) Aspartil proteazlar (EC 3.4.23)
- 4-) Metalloproteazlar (EC 3.4.24)

Bu sınıfa ait enzimler, ilk basamakta suyu kullanarak substratlarının peptid bağını hedef alır, diğerleri ise suyu daha sonraki basamaklarda enzim ile substrat arasında kovalent ara formu bozmak için kullanırlar (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Proteazların mekanizması (Erez ve diğ., 2009).

Serin proteazlar (Şekil 2.8-a), enzimin aktif bölgesinde katalitik üçlü denilen yapıya sahiptirler. Bu üçlü yapı 3 amino asitten oluşur: Histidin, serin ve aspartik asid. Bu üç amino asitten her biri proteaz mekanizmasında önemli role sahiptir. Aspartatın hidroksil grubu ile histidin hidrojeni arasında, histidin azotu ile serin hidrojeni arasında kurulan bağlar ile bu üçlü, substratın karbonyl karbonuna nükleofilik saldırı yapacak hale gelir.

Sistein proteazların (Şekil 2.8-b) çalışma mekanizması da serin proteazlarınkine benzerlik gösterir, onlar gibi güçlü nükleofil yapısı ile kovalent enzim-substrat kompleksini oluştururlar. Sadece tek fark olarak serinin oksijen atomu yerine sisteinin sülfür atomu kompleks oluşumuna katılır.

Aspartil proteazların (Şekil 2.8-c) aktif bölgelerinde, genel asid-baz mekanizmasında görevli olan iki aspartik asid bulunur. İki aspartik asid arasına girmesiyle proton grubu aktive olan su molekülü, substratın karbonil karbonuyla bağ oluşturur. Oluşan bu tetrahedral geçiş durumu, serin ve sistein proteazların kataliz prosesinde oluşan oksijen anyondan tamamen farklıdır.

Metalloproteazların (Şekil 2.8-d) kataliz mekanizmalarında, yapılarında koordine halde bulunan genellikle çinko iyonu olan metal iyonu bulunur. Matriks metalloproteazlar gibi çözünür metalloproteazlar, aktif merkezlerinde üç histidin ya da iki histidin ve asidik zincir içerirler. Çinko iyonu, bir su molekülünün glutamat ile oluşturduğu yapıyla ligant oluşturur. Böylece pozitif yüklü çinko iyonu, oksijen anyonunun stabilize olmasını sağlar (Erez ve diğ., 2009).

2.5.4. Matriks Metalloproteazlar (MMP)

Matriks metalloproteazlar (MMP) yapısal olarak matriks parçalayıcı enzimler olup, çeşitli yıkım proseslerinde, inflamasyonlarda, tümör oluşumu ve cilt yaşlanmasında etkilidirler. MMP'lar yaklaşık 20 kadar farklı tipte enzim içerirler. Bunlardan MMP-1, yani interstitial kollajenaz, insan derisi fibroblastlarından salgılanır, insan derisindeki dermal kollajenin bozulmasından ve fotoyaşlanma sürecinden sorumludur. Nötrofiller UV-ışınlarının yol açtığı fotoyaşlanma sürecinde önemli rol oynarlar. Bu nötrofiller cilt içerisine sızarak bazı aktif enzimleri salgırlar. Bu enzimler MMP'lar ve insan lökosit elastazıdır. Lökosit elastaz insan derisindeki tip I kollajenin yapısını parçalar ve aynı zamanda derideki fibroblastlarda bulunan MMP-1 enzimini direkt olarak aktive eder. Bu durumda MMP-1 (kollajenaz I) inhibitörleri insan derisindeki fotoyaşlanma sürecinin engellenmesinde yararlı olurlar.

MMP'lar, diğer serin ya da sistein proteazlar gibi endopeptidaz grubuna ait enzimlerdir. Parçalama özelliklerinden dolayı, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesinde önemli rol oynarlar. Birçok fizyolojik proseste önemleri büyüktür. Bu proseslerden bazıları, sinir gelişimi, yara iyileşmesi, çekirdek şekillenmesi, anjiyogenesistir. Ayrıca

MMP'lar kanser oluşumu ve metastaz gibi patolojik süreçlere de katılırlar. Aort anevrizması, romatoid artrit, gastrik ülser, fibrotik akciğer hastalığı, merkezi sinir sistemi hastalıkları gibi doku tahribatı görülen durumlarla da bu enzimler ile ilgilidir. İntrasellüler MMP'ların bulundukları enzim grubundaki fonksiyonlarıyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. MMP'lar endositoz prosesindeki hücreleri işgal eder, sitosol ve organellerdeki protein bölünmesinde yer alırlar. Yapılan çalışmada, bazı MMP'ların hücre çekirdeğine girerek gen transkripsiyonuna ve DNA onarımına etki ettiği, poli-ADP-riboz polimeraz-1'e ve DNA onarımından sorumlu çapraz tamamlayıcı protein-1'e ulaştığı vurgulanmıştır (Florczak-Rzepka ve diğ., 2012).

2.5.4.1. Sınıflandırma ve Protein Yapısı

MMP'lar çinko ve kalsiyuma bağlı olmak üzere insanda 23 (sıçanda 24) kadar endopeptidaz grubu enzim içerirler. MMP'lar protein yapısına ve substrat spesifikliğine göre;

- Kollajenazlar (MMP-1, MMP-8, MMP-13, ve MMP-18),
- Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9),
- Stromelisinler (MMP-3, MMP-10, MMP-11),
- Membran-tip MMPlar (MMP-14 [MT1-MMP], MMP-15 [MT2-MMP], MMP-16 [MT3-MMP], MMP-17 [MT4-MMP], MMP-24 [MT5-MMP], ve MMP-25 [MT6-MMP]),
- Diğer MMP'lar olarak sınıflandırılırlar.

Yapısal olarak MMP'lar 3 kısımdan oluşurlar (Şekil 2.9).

- N- terminal polipeptid kısmı
- Katalitik kısım
- C-terminal hemopeksin kısmı (Zhang ve diğ., 2011).



Şekil 2.9: Genel MMP yapısı (Zhang ve diğ., 2011).

Bütün olarak MMP'lar tüm ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanmasından sorumludur. MMP'lar genellikle zimojenler olarak adlandırılan inaktif, latent formda sentezlenir. Bu inaktif pre-/pro kısımlarının korunmasıyla sağlanır. Bu durum, katalitik kısmın Zn^{2+} iyonlarıyla ve serbest sisteinin SH grubunun bağlanmasıyla elde edilir (Şekil 2.9). MMP'ların aktivasyonu 3 temel basamaktan oluşur; transkripsiyon ile başlar, latent formun aktivasyonu üzerinden devam eder, inhibisyon basamağında ise son bulur (Zhang ve diğ., 2011).

2.5.4.2. Matriks Metalloproteaz İnhibisyonu

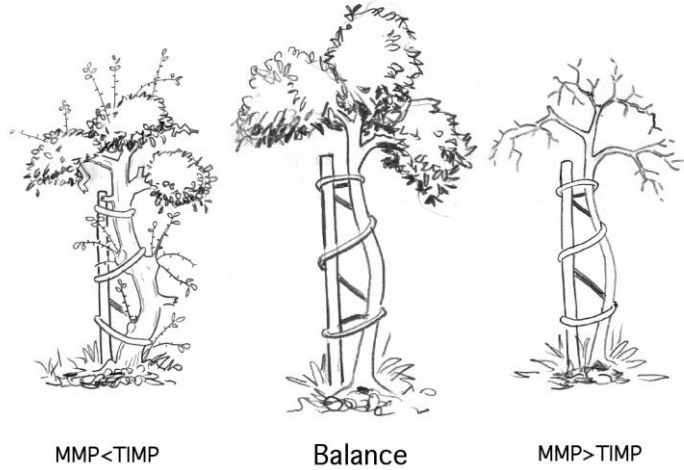
MMP'lar bir takım ilaçların hedefleri olup gelecek için umut vaat eden bu enzimler tetrasiklinler ve bifosfonatlar gibi klinik alanda sık rastlanan ajanlarla inhibisyona uğrayabilirler. Metalloproteazların inhibe edilmeleri yara iyileşmesinde ve cerrahi müdahale sonrasında büyük önem taşır. Metalloproteazların yara iyileşme sürecinde, vücuttaki dikişlerin kapanmasında büyük ölçüde etki etme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılır.

Ekstrasellüler matriksin oluşumu, sentez ve parçalanma arasındaki dinamik dengeden ibarettir. Parçalanmada, MMP enzimleri ve metalloproteaz inhibitörleri (TIMP'ler) antagonistik etkilidirler.

MMP'lar bulunuş sıralarına göre ya da parçalama aktivitelerine göre sınıflandırılmışlardır, bilinen substratları ise git gide çoğalmaktadır. Kollajenazlar (MMP-1,-8 ve -13) hemen hemen tüm kollajen yapısında dokuları parçalayabilir ve bunlardan en önemli olanı dokulara mekanik esneklik sağlayan fibriler yapıda

kollajendir. *Xenopus* kollajenaz olarak bilinen kollajenaz 4 (MMP-18) insan MMP'ları listesinden çıkarılmış olsa da, bu enzim için gerekli mRNA seviyesine insan vücudundaki bağlarda rastlanmıştır. Buna ek olarak klasik kollajenazlar olan MMP-2 ve MMP-14 önemli kollajenolitik aktiviteye sahiptir (Pasternak ve Aspenberg, 2009).

MMP'ların aktivitelerindeki azalma, kendi ekstra ve intrasellüler denge aktiviteleri için son derece önemlidir (Şekil 2.10). MMP'ları inhibe etmenin birçok farklı yolu vardır. Bunlardan ilki; MMP'ların gen ekspresyonunu hedef alarak, diğer ikincisi ise MMP'ların aktivitesini engelleme yolu ile olur. Sonuç olarak 2 tür fizyolojik MMP inhibisyonu vardır. Çevre dokularda, plazmada, α -2 makroglobülinlerin MMP'larla olan bağları, geri dönüşümsüz bir kompleks yapı meydana getirir. Doku içerisinde MMP aktivitesini düzenleyen ve bundan sorumlu spesifik TIMP'ler (tissue inhibitor of matriks metalloproteinase) bulunmuştur. TIMP'lerle 1:1 oranında non-kovalent bağlarla oluşmuş kompleks bileşik elde edilmesiyle inhibisyon meydana gelir.



Şekil 2.10: Metabolizmada MMP ve TIMP dengesi (Pasternak ve Aspenberg, 2009).

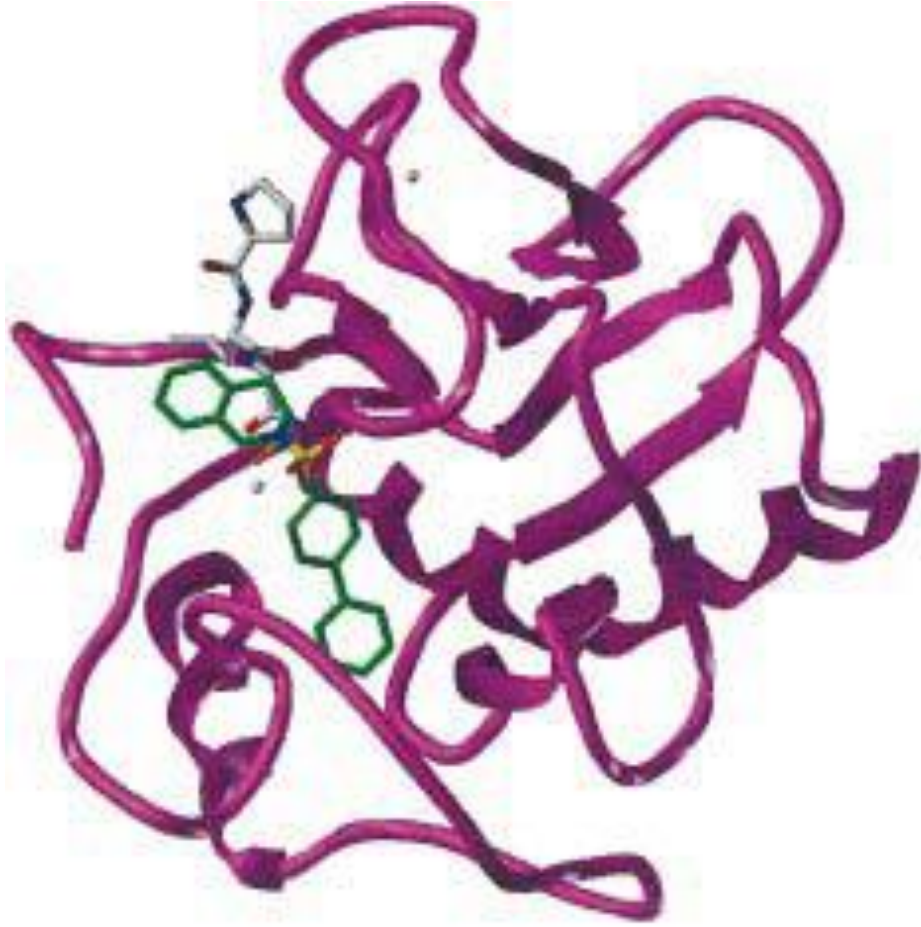
Ekstrasellüler matriksin yıkımı, TIMP'lerle denge halinde olan MMP'ler sayesinde olur. Bu denge durumunun sağlanamaması halinde, sağlıklı olmayan prosesler gözlemlenir.

MMP aktivitesi 3 aşamada düzenlenir; ilk olarak transkripsiyon ve sentez, zimojen (proenzim) aktivasyonu ve proteolitik aktivitenin belirli endojen doku MMP'ları ile inhibisyonu. Birçok MMP, aktivatör proteinler (AP-1) tarafından düzenlenir. Bunlardan MMP-1 (interstisyel kollajenaz ya da kollajenaz-I) tip I ve tip III fibriler kollajenazların yıkımını başlatırken, MMP-9 (jelatinaz B) kollajenazlarca parçalanmış kollajen parçalarının yıkımına devam eder ve MMP-3 (sitromelisin-1) ise membranın temel yapısındaki tip IV kollajeni yıkar ve proMMP-1'i aktive eder (Pasternak ve Aspenberg, 2009).

2.6. KOLLAJENAZ ENZİMİ

Kollajenazlar; 3'lü heliks yapıda, hayvan bağ dokusunun temel lifli bileşeni olan doğal kollajeni parçalayan endopeptidazlardır (Şekil 2.11). Bakteriyel kollajenazlar, omurgalı kollajenazlarından farklı olarak yüksek substrat seçiciliği gösterirler. (Birkedal-Hansen 1987). Bakteriyel kollajenazlar hayvanlardaki kollajenazların aksine, hem suda çözünmeyen doğal kollajeni hem de suda çözünen denatüre kollajeni parçalayabilir (Woolley ve diğ., 1975). Bu kollajenaz türü 3'lü sarmal yapıdaki tüm kollajen tiplerini üst üste birkaç kere parçalama gücüne sahiptir. Tiplerine göre değişmekle birlikte 50-60 kDa arasında değişen bir ağırlığa sahiptir. Kofaktörü çinko metalidir (Mookhtiar ve Van Wart, 1992).

EC numarası 3.4.24.3 olan kollajenaz enzimi, sahip olduğu bu numaradan da anlaşılacağı gibi "3" hidrolaz sınıfı ve bir alt sınıfı olarak da "4" proteaz sınıfına dâhil olan bir enzimdir. Proteazların da alt sınıfı olan matriks metalloproteaz sınıfı bir enzimdir.



Şekil 2.11: Kollajenaz enziminin yapısı (Pasternak ve Aspenberg, 2009).

Mor renkli kısım: enzim

Yeşil renkli kısım: aktif bölge

Gri renkli kısım: inhibitör

2.6.1. Kollajenaz Tipleri

3 tip kollajenaz türü bulunmaktadır. Bunlar kollajenaz I, II ve III dir.

Interstisyel kollajenaz; Kollajenaz I

MMPs ailesinin prototipik üyesidir, 1962 de ilk kez kurbağa yavrusunun kuyruk kısmının çözünmesini sağlayan bir proteaz olarak tanımlanmıştır. Tip I, Tip II, Tip III interstisyel kollajeni parçalayıcı enzimdir (Tablo 2.2.). Ayrıca Tip II, V ve X kollajenin yıkılmasında rol oynar.

Nötrofil kollajenaz; Kollajenaz II

Tip I, II, III interstisyel kollajeni yıkar. Interstisyel kollajenazda bulunmayan altı glikozilasyon sahası vardır ve bu nedenle nötrofil kollajenaz artmış glikozilasyondan sorumludur.

Kollajenaz III;

Tip I kollajeni yıkar (Pasternak ve Aspenberg, 2009).

Tablo 2.2: Kollajenaz türleri.

	MMP numarası	Substratları
Kollajenaz I	MMP-1	Kollajen I,II,III,VII,VIII,XI ve jelatinler
Kollajenaz II	MMP-8	Kollajen I,II,III,V,VII,VIII,X
Kollajenaz III	MMP-13	Kollajen I,II,III,IV,V, VII,IX X ve jelatinler

2.6.2. Bakteriyal Kollajenazın Keşfi

Bakteriolojinin var olduğu ilk zamanlardan beri *Clostridium* türü bakterilerden elde edilen proteolitik enzimler bilinmektedir. Bir süre sonra da bu organizmaların alışılmadık derecede aktif oldukları ve çürüme prosesinde önemli rol oynadıkları fark edilmiştir. I. Dünya Savaşı sırasında ve sonrasında yapılan kimyasal araştırmalar ile spesifik kollajenolitik aktivite oluşumu hakkında detaylı bilgiler edinilmeye başlanmıştır.

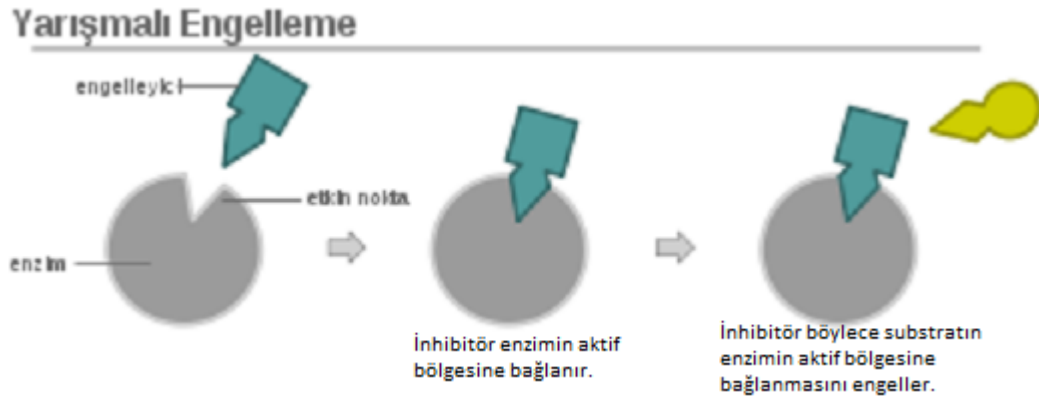
14'üncü Henry *Clostridium perfringens* bakteri türünden elde edilmiş taze kas dokusunu duyurduğunda, bunun kollajenaz enziminin geleceğini hazırladığından habersizdi. Daha sonra 1931 ve 1932'de Weinberg ve Randin anaerob *Clostridium perfringens* ve aerob *Bacillus anthracoides* bakteri kültürlerinden küçük parçacıklar halinde Aşil tendonları elde ettiler. 1937 yılında Maschmann, *Clostridium perfringens* türü bakterilerden jelatini parçalayabilecek enzimi izole etmiştir, ancak bu enzimin kollajen dışında diğer protein substratları üzerine etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bu parçalayıcı ajanın adının kollajenaz olmasını önermiş, fakat bazı tartışmalar nedeniyle bu gerçekleşmemiştir. Birkaç yıl sonra, MacFarlane ve MacLennan *Clostridium perfringens* bakterilerinin A tipi hücre kültürlerinden Aşil tendonu parçacıklarının varlığında kas dokudaki kollajen yapısının parçalandığını açıklamıştır. O zamana kadar bilinen enzimler bu aktiviteyi açıklamak için yeterli değildi, kısa süre sonra Oakley, Warrack, ve Van Heyningen tarafından geliştirilen immunolojik yöntem ile bu enzim işleyişi doğrulanmıştır. Bu yeni enzim kısa süre sonra Bidwell ve Van Heyningen tarafından “kollajenaz” olarak tanımlanmıştır. Benzer enzimlerin başka organizmalar tarafından üretildiği düşünülse de, diğer bakteriyal proteazların doğal kollajen üzerine etki edemediği belirlenmiştir (MacLennan ve diğ., 1953).

2.7. ENZİM İNHİBİSYONU

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını azaltan herhangi bir maddeye “inhibitör” denir. Geri dönüşümlü inhibitörler enzimlerle kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Enzim-inhibitör kompleksinin seyreltilmesine rağmen inhibe olan enzim, aktivitesini kazanamazsa, geri dönüşümsüz inhibisyon meydana gelir. Bazı geri dönüşümsüz inhibitörler enzimlerin spesifik gruplarıyla kovalent bağ oluşturarak etki ederler. En sık karşılaşılan üç inhibisyon tipi yarışmalı, yarışmasız ve yarıyarışmalı inhibisyonudur.

2.7.1. Yarışmalı İnhibisyon (Kompetitif);

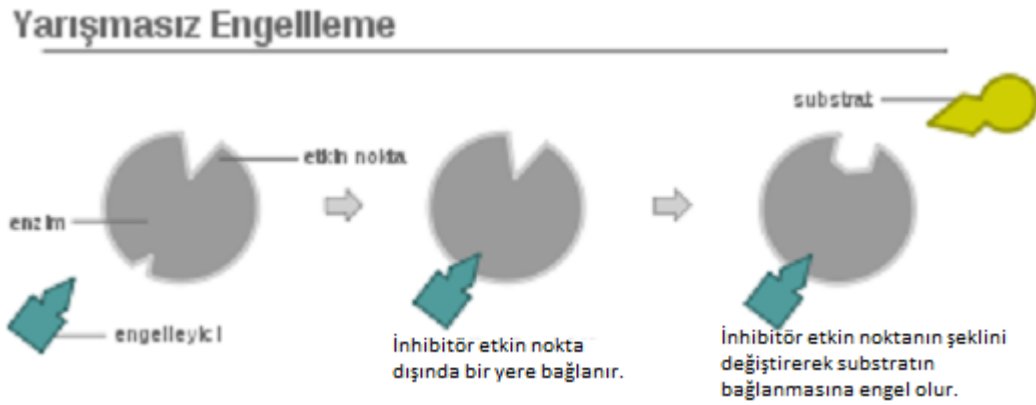
Bu inhibisyon tipinde inhibitör substratın normalde bağlanması gereken yere bağlanır ve böylece substratla o bölge için yarışır (Şekil 2.12). Bir inhibitör konsantrasyonunun artışı durumunda, enzimin substrata ilgisi azalır. Ama yine de yeterli miktarda substrat konsantrasyonunun artışı, bu katalitik aktivite azalışının üstesinden gelebilir.



Şekil 2.12: Yarışmalı inhibisyon (<http://tr.wikibooks.org/wiki/Biyokimya/Kataliz>).

2.7.2. Yarışmasız İnhibisyon (Non-kompetitif);

İnhibitör ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanınca yarışmasız inhibisyon meydana gelir. Yarışmasız inhibitör ya serbest enzime ya da enzim-substrat kompleksine bağlanarak reaksiyonun yürümesine engel olur (Şekil 2.13). Bu inhibisyon türünde enzimin katalizleme hızı etkilenir. Enzimin maksimum hızının değişimi, enzime bağlanan inhibitörden kaynaklanır ve gözlenen katalitik aktivitedeki düşüş, enzim miktarının yüzde kaçının inhibitör ile bağ oluşturduğunu gösterir.

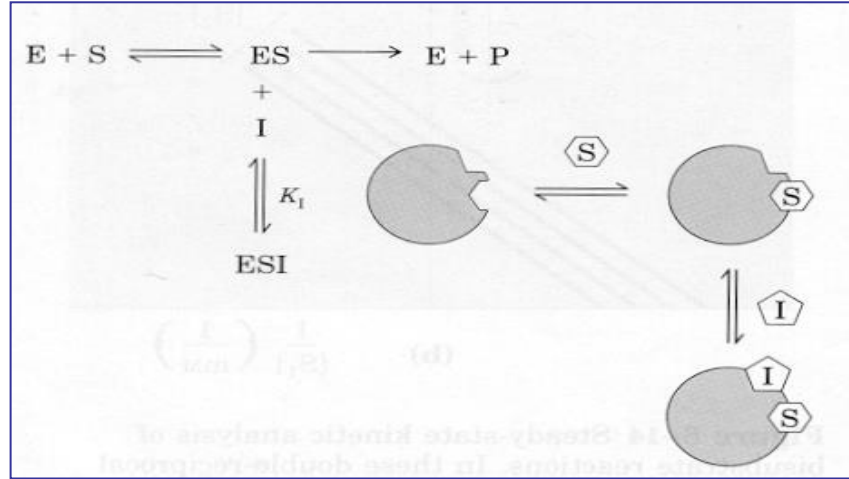


Şekil 2.13: Yarışmasız inhibisyon (<http://tr.wikibooks.org/wiki/Biyokimya/Kataliz>).

Yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon denklemleri, Michaelis-Menten denkleminde olduğu gibi kütlenin korunumu yasasından yola çıkılarak Lineweaver-Burk tarafından ortaya konulmuştur (Walsh, 2012).

2.7.3. Yarıyarışmalı (Ankompetitif) Enzim İnhibisyonu;

Bu enzim inhibisyonunda inhibitör, nonkompetitif inhibitörde olduğu gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime bağlanabildiği halde ankompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşturduktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversible bağlanarak enzimi inaktive eder (Altınışık, 2009). Şekil 2.14’de yarıyarışmalı enzim inhibisyonunun reaksiyon şeması gösterilmektedir.



Şekil 2.14: Yarı yarışmalı inhibisyonun inhibisyon reaksiyon şeması.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER

Buzdolabı	:Arçelik
Destile Su Cihazı	:Brand MonoDest3000
Derin Dondurucu	:Beko
Etüv	:Nüve FN500
Evaporatör	:Bibby Rotari Vakum Evaporatör
pH metre	:Hearus
Sonikatör	:Bandelin Sonarex
Su Banyosu	:Çalkalamalı, Memmert WB 14
Terazi	:Radwag XA 60/220/X hassas terazi
Terazi	:Radwag AS 220/C/2 hassas terazi
Vorteks Cihazı	:FisonWhirlmixer
UV-VIS Spektrofotometre	:Shimadzu UV-mini-1240

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Bitki ekstralarının hazırlanması aşamasında organik çözücü olarak etil alkol (Merck 100971) kullanıldı. Trisin tamponu hazırlanırken, Trisin (Sigma 93356), kalsiyum klorür anhidrit (Fluka 21085) ve sodyum klorür (Merck 106400) kullanıldı. Deneyler esnasında kollajenaz substratı olarak N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma F5135) ve inhibisyonu tayin edilecek enzim olan kollajenaz (Sigma C0130 Kollajenaz *Clostridium histolyticum* 2U/mL) kullanıldı.

Enzim üzerine inhibitör etkileri tayin edilmek üzere kimyasal maddelerden; azeleik asid, piridoksal-5'-fosfat (B₆ vitamini) (Biochemika, 82870), L(+)-askorbik asid (C vitamini) (Merck, 70214543), doksisiklin hilkat (Sigma D 9891), epikateşin (Fluka, 45300), β -karoten (provitamin A) (Fluka, 45300), DL- α -tokoferol (E vitamini) (Merck, 8283), 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (Edaravon) (Fluka, 68740), etilendiamin tetraasetikmasid (EDTA) (Merck, 2604134), gallik asid (Fluka, 48630), glisil glisin (Merck, 104233), glikolik asid (Fluka, 50590), indirgenmiş glutatyon (GSH) (Fluka, 49750), kafeik asid (Fluka, 60018), kateşin (Sigma, 124K1484), kojik asid (Fluka, 60890), kumarik asid (Fluka, 28200), kuarsetin dihidrat (Fluka, 83370), laktik asid (Sigma, L-1250), malik asid (Merck, 382), L-prolin (Merck, 107434), piragallol (Schering, 03366), rezorsinol (Merck, 107593), rutin hidrat (Sigma, R5143), L(+)-sistein (Merck, 2838), sitrik asid (Merck, 242), tartarik asid (Merck, 802), 2-hidroksi-dodekanoik asid (Fluka, 55240), DL-metionin metilsülfonyum klorür (U vitamini) (Fluka, 64382) ve vanilik asid (Aldrich S, 41232-497) kullanıldı.

3.3. ENZİM İNHİBİSYONU TAYİNİNDE KULLANILAN BİTKİ MATERYALLERİ

Kollajenaz inhibitörleri üzerine yaptığımız çalışmada çeşitli bitki materyallerinden faydalanıldı. Aktar ve pazarlardan alınan çeşitli bitkiler yıkandı ve destile sudan

geçirildikten sonra kurutuldu. Kurutulan bitki materyallerinin etil alkollü ekstreleri hazırlandı.

Çalışmamızda kullanılan bitki materyalleri ve bilinen Latince adları Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Enzim inhibisyonu tayininde kullanılan bitki materyalleri.

Bitki Materyalinin Türkçe Adı	Latince Adı
Acur	<i>Cucumis melo var. flexuosus</i>
Adaçayı	<i>Salvia officinalis folium</i>
Akasya Çiçeği	<i>Acacia vera</i>
Alıç	<i>Crataegi fructus</i>
Ananas	<i>Ananas comasus</i>
Anason	<i>Pimpinella anisum L.</i>
Asma Yaprığı ve Dalı	<i>Vitis vinifera L.</i>
At Kuyruğu	<i>Equisetum arvense L.</i>
Ayva	<i>Cydonia oblonga</i>
Bakla	<i>Vicia faba</i>
Bal Kabağı	<i>Cucurbitamoschata</i>
Beyaz Çay	<i>Camellia sinensis</i>
Beyaz Turp	<i>Raphanus sativus</i>
Beyaz Üzüm	<i>Fructus vitis minutae</i>

Biber	<i>Capsicum annuum</i> L. var. <i>minimum</i>
Biberiye	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Brüksel Lahanası	<i>Brassica oleracea gemmifera</i>
Böğürtlen	<i>Rubus caesius</i>
Ceviz yaprağı ve dalı	<i>Juglans regia</i> L.
Çilek	<i>Fragaria vesca</i>
Dut Yaprığı	<i>Morus alba</i>
Elma	<i>Malus domestica</i>
Gelincik çiçeğı	<i>Papaver rhoeas</i> L.
Gül	<i>Rosa domescana</i>
Havuç	<i>Daucus carota</i>
Hindistan Cevizi	<i>Cocos nucifera</i>
Hurma	<i>Phoenix dactylifera</i>
Isırgan	<i>Urtica dioica</i> L.
İncir Yaprığı ve Dalı	<i>Fructus caricae</i>
Kabak	<i>Cucurbita pepo</i>
Kapari	<i>Capparis spinosa</i>
Karadut	<i>Morus nigra</i>

Karalahana	<i>Brassica oleracea Acephala</i>
Kayısı	<i>Prunus armeniaca</i>
Keçiboynuzu	<i>Ceratonia siliqua</i>
Kereviz	<i>Apium graveolens dulce</i>
Kırmızı erik	<i>Prunus domestica</i>
Kızılcık	<i>Cornus mas</i>
Kiraz	<i>Prunus avium</i>
Kivi	<i>Actinidia chinensis</i>
Kudret Narı	<i>Momordica charantia</i> L.
Lavanta	<i>Lavandulae flos</i>
Limon	<i>Citrus x limon</i>
Mandalina	<i>Citrus reticulata</i>
Maydanoz	<i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A.W. Hill
Melek Otu	<i>Radix angelicae sylvestri</i>
Melisa	<i>Melissa officinalis</i> L.
Menekşe Çiçeği	<i>Viola arvensis</i> Murray, <i>V. tricolor</i> L.
Meyan Kökü	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
Mine Çiçeği	<i>Verbena officinalis</i> L.

Mor Lahana	<i>Brassica oleracea cabbaga</i>
Muz	<i>Musa cavendish</i>
Nane	<i>Mentha piperita</i> L.
Nar	<i>Punica granatum</i>
Nar Çiçeği	<i>Flos punica</i>
Papatya	<i>Matricariae flos</i>
Patates	<i>Solanum tuberosum</i>
Pazı	<i>Beta vulgaris</i> L. var cicla
Pelin Otu	<i>Artemisia absinthium</i> L.
Pırasa	<i>Allium ampeloprasum</i> var. porrum
Rezene	<i>Foeniculum vulgare</i>
Salatalık	<i>Cucumis sativus</i>
Siyah üzüm	<i>Ribes nigrum</i>
Soğan	<i>Allium cepa</i> L.
Tetra	<i>Cotinus coggyrgria</i> Scop
Trabzon Hurması	<i>Diospyros kaki</i>
Vişne	<i>Prunus cerasus</i>
Yaban Mersini	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.

Yasemin	<i>Jasminum officinale</i>
Yeşil Çay	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
Zakkum	<i>Nerium oleander</i>
Zeytin	<i>Olium olivarum</i>

3.3.1. Etil Alkollü Ekstrelerin Hazırlanması

Ekstresi elde edilmek istenen meyva veya bitkiden 25g alınarak hazırlanan Sokslet cihazı kartuşuna yerleştirildi. Cihazın balonuna 150 mL % 96'lık etil alkol ilave edildikten sonra geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım oda sıcaklığına gelene dek bir süre bekletildi ve süzüldü. Süzüntü darası belirlenmiş olan bir balon içerisine alınarak evaporatöre yerleştirildi ve düşük basınç altında etil alkol karışımından uzaklaştırıldı. Balon tekrar tartılarak elde edilen ekstre miktarı tekrar hesaplandı.

3.4. KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİSYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Kollajenaz enzimi üzerine inhibitör etkisi modifiye edilmiş Thring ve diğ. (2009) yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Çalışmamızda seçilen bitki ve meyvalardan hazırlanan ekstraler için dimetil sülfoksitli (DMSO'lu) çözeltiler hazırlandı.

0.8 U/mL kollajenaz içeren çözeltiden 50 µL alındı, üzerine hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraleleri ve kimyasal madde çözeltilerinden 50 µL eklendi. Daha sonra pH: 7.5 olan Trisin tampon çözeltisinden 0.9 mL ilave edildi. Kontrol çözeltisine bitki ekstresi ve kimyasal madde çözeltisinden konulmadı. Kör için ise enzim yerine enzim miktarı kadar DMSO çözeltisinden kullanıldı. Kör, kontrol ve örnek çözeltileri 30 dakika 25°C'de ilk inkübasyona bırakıldı. Bu ilk inkübasyonun ardından tüm çözeltilere 1 mM 0.05 mL N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (kollajenaz enzimi substratı) çözeltisinden ilave edilerek 25°C'de 15 dakikalık ikinci bir inkübasyona bırakıldı. Örnek çözeltileri ve kontrol çözeltisinin UV spektrofotometresinde 340 nm'de, köre karşı absorbans değerleri okundu. Deneyler 2 kez tekrarlandı.

Yapılan çalışmada hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki örnek çözeltilerin kollajenaz enzimi üzerine inhibitör etkisi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\Delta A_{340} \text{ kontrol} - \Delta A_{340} \text{ örnek}) / \Delta A_{340} \text{ kontrol}] \times 100$$

$\Delta A_{340} \text{ kontrol}$: Kontrol çözeltisinin absorbans değeri

$\Delta A_{340} \text{ örnek}$: Örnek çözeltisinin absorbans değeri

Kollajenaz enziminin % 50 inhibisyon etkisi göstermesi için gerekli madde miktarı olan IC_{50} değeri, grafikte absise konsantrasyon, ordinata % enzim inhibisyonu verileri uygulanarak çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denklemi ile hesaplandı.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmada çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bitki ve kimyasal maddelerin kollajenaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri incelendi.

4.1.BİTKİ EKSTRELERİNİN KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİ

Acur, adaçayı, akasya çiçeği, alıç, ananas, anason, asma yaprağı ve dalı, at kuyruğu ayva, bakla, balkabağı, beyaz çay, beyaz turp, beyaz üzüm, biber, biberiye, böğürtlen, Brüksel lahanası, ceviz yaprağı ve dalı, çilek, domates, dut yaprağı, elma, gelincik gül havuç, Hindistan cevizi, hurma, ısırgan, incir yaprağı ve dalı, kabak, kayısı, karalahana kapari, karadut, keçiboynuzu, kereviz, kırmızı erik, kızılıçık, kiraz, kivi, kudret narı, lavanta, limon, mandalina, maydanoz, melek otu, melisa, menekşe çiçeği, meyan kökü, mine çiçeği, mor lahana, muz, nane, nar, nar çiçeği, patates, papatya, pazı, pelin otu, pırasa, rezene, salatalık, siyah üzüm, soğan, tetra, Trabzon hurması, vişne, yaban mersini yasemin yeşilçay, zakkum ve zeytin ekstralarının iki, üç ve dört farklı konsantrasyonunda hazırlanan etil alkollü ekstraları için hesaplanan inhibisyon değerleri kullanılarak çizilen konsantrasyon- yüzde inhibisyon grafiklerinden elde edilen ortalama inhibisyon ve IC₅₀ değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Çeşitli bitkilerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC₅₀ değerleri.

Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Acur	0.01 0.1 1	34.44 ± 5.99 52.31 ± 4.66 57.37 ± 11.46	0.096 ± 0.0086
Adaçayı	0.01 0.1 1	35.40 ± 0.53 42.34 ± 3.73 43.85 ± 3.73	2.25 ± 1.12
Akasya çiçeği	0.001 0.01 0.05	41.92 ± 0.88 43.04 ± 1.76 45.79 ± 1.19	0.0546 ± 0.00141
Alıç	1 10	40.08 ± 3.25 42.02 ± 1.80	49.8 ± 1.29
Ananas	0.0001 0.001 0.005	43.83 ± 1.52 45.89 ± 1.70 47.29 ± 0.69	0.00930 ± 0.000177
Anason	0.001 0.01 0.1	44.42 ± 1.29 46.24 ± 0.33 47.93 ± 5.02	0.0108 ± 0.000141
Asma yaprağı ve dalı	0.000000001 0.0000001 0.00001	38.62 ± 8.90 48.69 ± 3.52 49.04 ± 0.64	0.0000123 ± 0.00000127
At kuyruğu	1 10	39.94 ± 1.15 41.84 ± 1.10	49.9 ± 0.26
Ayva	0.01 0.1	39.51 ± 0.62 40.53 ± 1.94	48.8 ± 1.58

Bakla	1 10	37.39 ± 1.14 41.33 ± 0.00	47.5 ± 1.46
Balkabağı	1 10	43.74 ± 0.94 45.38 ± 2.57	49.4 ± 2.45
Beyaz çay	0.00001 0.0001 0.001	41.59 ± 0.26 42.67 ± 1.09 44.82 ± 2.96	0.119 ± 0.06
Beyaz turp	1 10	41.10 ± 1.09 43.24 ± 1.07	49.3 ± 0.255
Beyaz üzüm	0.00001 0.0001 0.001	43.35 ± 3.57 44.68 ± 4.09 45.41 ± 3.75	0.00387 ± 0.00234
Biber	0.001 0.01	39.67 ± 1.28 43.70 ± 4.88	45.60 ± 3.64
Biberiye	0.0001 0.001 0.01	41.11 ± 2.47 45.80 ± 1.05 47.94 ± 1.29	0.0135 ± 0.00195
Böğürtlen	0.00000001 0.000001 0.0001	40.76 ± 1.54 43.88 ± 1.36 46.11 ± 0.51	0.000203 ± 0.000012
Brüksel lahanası	0.1 10	43.11 ± 1.14 44.44 ± 0.62	50.10 ± 0.43
Ceviz yaprağı ve dalı	0.0000001 0.000001	45.75 ± 0.50 51.35 ± 6.42	44.86 ± 5.12

Çilek	0.01 0.1 1	44.35 ± 1.51 45.05 ± 5.04 47.79 ± 4.48	2.11 ± 1.92
Domates	0.0000001 0.000001 0.00001 0.0001	39.80 ± 0.00 41.67 ± 1.93 42.17 ± 0.18 45.90 ± 2.64	0.0002 ± 0.0000904
Dut yaprağı	0.01 0.1 10	35.81 ± 1.72 40.29 ± 1.50 41.94 ± 0.32	33.47 ± 12.36
Elma	0.001 0.01 0.1	46.85 ± 7.82 49.21 ± 5.90 54.27 ± 1.24	0.0922 ± 0.00212
Gelincik	0.01 0.1 1	29.47 ± 8.94 42.09 ± 2.76 58.55 ± 9.16	0.695 ± 0.178
Gül	0.1 0.25 0.5	29.81 ± 5.13 41.29 ± 9.21 49.89 ± 2.28	0.486 ± 0,06
Havuç	0.05 0.1 1	39.71 ± 0.16 42.22 ± 0.15 45.91 ± 2.83	2.06 ± 1.12
Hindistan cevizi	0.1 1	40.75 ± 0.58 44.71 ± 0.31	45.67 ± 0.98
Hurma	0.1 1	44.15 ± 6.44 45.44 ± 0.63	48.7 ± 7.80
Isırgan	0.1 1 10	42.11 ± 0.04 43.65 ± 1.80 45.09 ± 1.77	33.9 ± 18.1

İncir yaprağı ve dalı	0.001 0.01 0.1	41.62 ± 3,90 45.22 ± 2,97 46.43 ± 0.00	0.25 ± 0.15
Kabak	10 20	43.63 ± 1.72 48.15 ± 4.02	46.1 ± 3.32
Kapari	0.00001 0.0001 0.001	43.44 ± 0.81 50.01 ± 2.94 52.56 ± 4.27	0.000902 ± 0.00085
Karadut	0.0000000001 0.00000001 0.000001	45.55 ± 0.72 50.16 ± 2.20 51.35 ± 0.51	0.0000006 ± 0.0000003
Karalahana	0.1 1	41.87 ± 1.27 43.58 ± 3.85	48.30 ± 2.90
Kayısı	1 5 15	35.94 ± 8.29 39.92 ± 11.15 41.06 ± 1.74	18.28 ± 0.78
Keçiboynuzu	0.05 1	41.03 ± 0.18 44.11 ± 4.17	46.8 ± 4.32
Kereviz	0.1 1	42.49 ± 1.43 44.99 ± 2.11	47.3 ± 0.672
Kırmızı erik	0.00000001 0.000001 0.0001	40.87 ± 2.45 44.08 ± 0.30 45.74 ± 0.65	0.00023 ± 0.00001
Kızılcık	0.00001 0.0001 0.001	41.69 ± 2.39 43.99 ± 0.58 47.34 ± 2.11	0.00155 ± 0.000471

Kiraz	0.000001 0.0001 0.1	42.87 ± 2.46 46.85 ± 2.51 47.91 ± 0.17	0.193 ± 0.065
Kivi	0.1 1	41.99 ± 0.35 46.11 ± 1.30	45.60 ± 1.62
Kudret narı	0.000001 0.00001 0.0001	37.12 ± 0.21 40.00 ± 0.38 41.12 ± 1.51	0.000122 ± 0.00000445
Lavanta	0.1 1 5	35.38 ± 0.34 40.30 ± 1.47 41.37 ± 3.85	19.10 ± 14.42
Limon	0.1 1	42.47 ± 2.58 46.01 ± 0.81	46.20 ± 1.98
Mandalina	0.0001 0.001 0.01	38.81 ± 0.98 46.83 ± 6.44 51.19 ± 12.77	0.0101 ± 0.00247
Maydanoz	0.01 0.1	39.09 ± 1.54 43.34 ± 0.48	45.1 ± 1.27
Melek otu	0.005 0.01	45.81 ± 1.04 49.60 ± 3.43	46.30 ± 2.15
Melissa	0.1 1 10	38.96 ± 3.17 41.58 ± 1.75 43.51 ± 0.31	32.30 ± 13.95
Menekşe çiçeği	0.0001 0.01 1	40.96 ± 6.10 42.33 ± 2.93 43.71 ± 4.24	1.15 ± 0.11

Meyan kökü	0.001 0.01 0.1	41.13 ± 1.52 42.37 ± 0.50 45.38 ± 1.29	0.218 ± 0.038
Mine çiçeği	0.0001 0.01	47.64 ± 2.44 50.73 ± 3.55	47.3 ± 0.459
Mor lahana	0,05 0.1	41.17 ± 0.36 43.06 ± 0.53	47.8 ± 0.17
Nane	0.1 1	36.90 ± 0.50 45.69 ± 6.10	40.8 ± 5.01
Nar	0.1 1	41.03 ± 0.29 42.58 ± 0.35	48.3 ± 0.06
Nar çiçeği	0.000001 0.0001 0.01	42.47 ± 1.94 45.09 ± 0.03 46.77 ± 0.14	0.0215 ± 0.0048
Patates	0.001 0.01 0.1	49.09 ± 3.95 50.33 ± 3.25 51.20 ± 0.47	0.039 ± 0.054
Papatya	0.01 0.1 1	38.15 ± 0.59 40.03 ± 2.98 41.55 ± 2.47	4.42 ± 2.07
Pazı	1 10	41.72 ± 1.97 44.24 ± 0.18	48.6 ± 2.05
Pelin otu	0.0001 0.001	40.75 ± 3.59 42.95 ± 2.36	48.10 ± 2.63

Pırasa	0.1 0.5 1	43.05 ± 2.17 44.45 ± 2.17 46.31 ± 0.45	2.14 ± 0.44
Rezene	0.0001 0.001 0.01	40.82 ± 1.44 43.76 ± 0.33 47.66 ± 1.61	0.0115 ± 0.00633
Salatalık	0.00000001 0.0000001 0.000001	42.00 ± 0.65 44.12 ± 0.91 45.11 ± 0.95	0.00000297 ± 0.000000854
Siyah üzüm	0.0001 0.001 0.01	41.56 ± 3.06 42.56 ± 2.33 47.11 ± 5.47	0.0193 ± 0.0150
Soğan	0.00001 0.0001 0.001	40.86 ± 0.30 41.13 ± 2.05 43.95 ± 1.11	0.00294 ± 0.000422
Tetra	0.00001 0.0001 0.00025	43.70 ± 0.00 44.01 ± 0.83 45.65 ± 0.57	0.000804 ± 0.00021
Trabzon hurması	0.000001 0.0001 0.01	41.92 ± 1.78 44.96 ± 3.42 46.28 ± 1.86	0.0225 ± 0.00332
Vişne	0.001 0.01 0.1	41.30 ± 0.00 42.47 ± 2.02 44.42 ± 0.74	0.301 ± 0.0202
Yaban mersini	0.000001 0.0001 0.01	39.59 ± 1.74 41.78 ± 0.58 44.72 ± 1.24	0.023 ± 0.00325
Yasemin	0.001 0.01 0.1	42.38 ± 2.75 44.62 ± 3.18 50.97 ± 1.82	0.0924 ± 0.0175

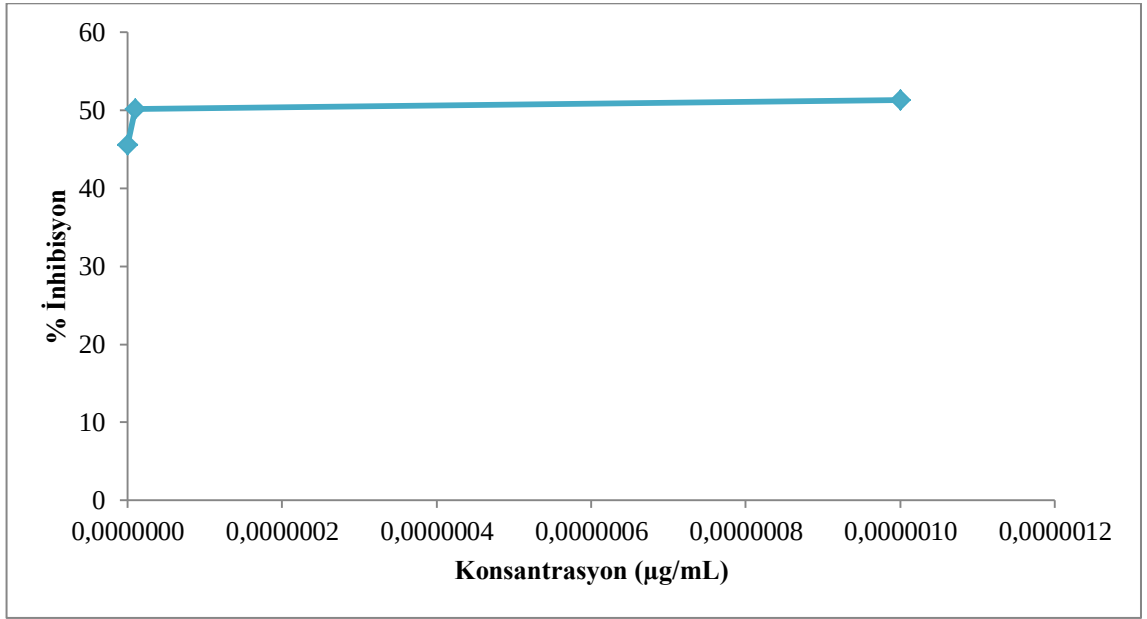
Yeşilçay	0.001 0.1	39.07 ± 3.39 44.05 ± 1.08	44.30 ± 2.76
Zakkum	0.001 0.01 0.1	42.38 ± 0.35 45.76 ± 1.37 47.94 ± 4.09	0.22 ± 0.19
Zeytin	0.1 1 10	42.22 ± 0.10 44.99 ± 0.08 45.47 ± 0.26	32.70 ± 10.94

Tablo 4.1'e göre;

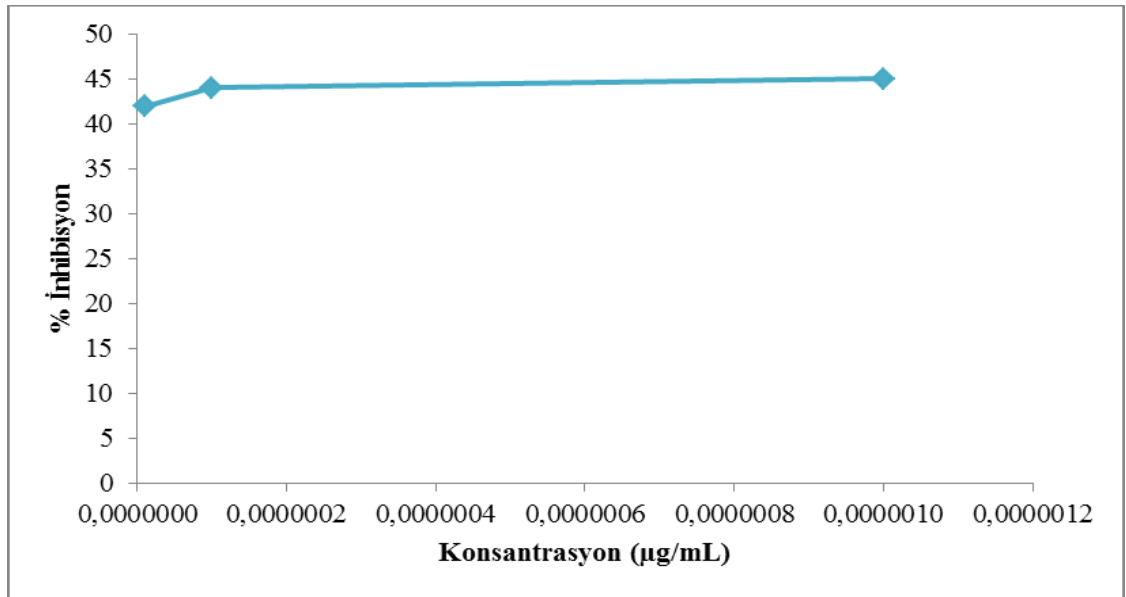
etil alkollü ekstrelerin kollajenaz enzimi üzerine % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon artışı ile arttığı görülmektedir. Bitki ekstreleri içinde IC₅₀ değerinin en düşük olması nedeniyle en yüksek kollajenaz inhibisyonunu karadutun gösterdiği (IC₅₀ = 0.0000006 ± 0.0000003) saptandı. Karadutu takiben salatalık (IC₅₀ = 0.00000297 ± 0.000000854), asma yaprağı ve dalı (IC₅₀ = 0.0000123 ± 0.00000127), tetra (IC₅₀ = 0.000804 ± 0.00021), kapari (IC₅₀ = 0.000902 ± 0.00085), soğan (IC₅₀ = 0.00294 ± 0.000422), beyaz üzüm (IC₅₀ = 0.00387 ± 0.00234), ananas (IC₅₀ = 0.00930 ± 0.000177) etil alkollü ekstrelerinin inhibitör etkileri gösterdikleri tespit edildi.

En düşük IC₅₀ değerlerine bakılarak, bitkiler arasındaki en güçlü kollajenaz inhibitörü olabilme sırası şu şekildedir: Karadut, salatalık, asma yaprağı ve dalı, tetra, kapari, soğan, beyaz üzüm, ananas, rezene, biberiye, siyah üzüm. Bu sıralamadaki bitkiler çalışmamızda en yüksek inhibitör değerlerini elde ettiğimiz bitkilerdir.

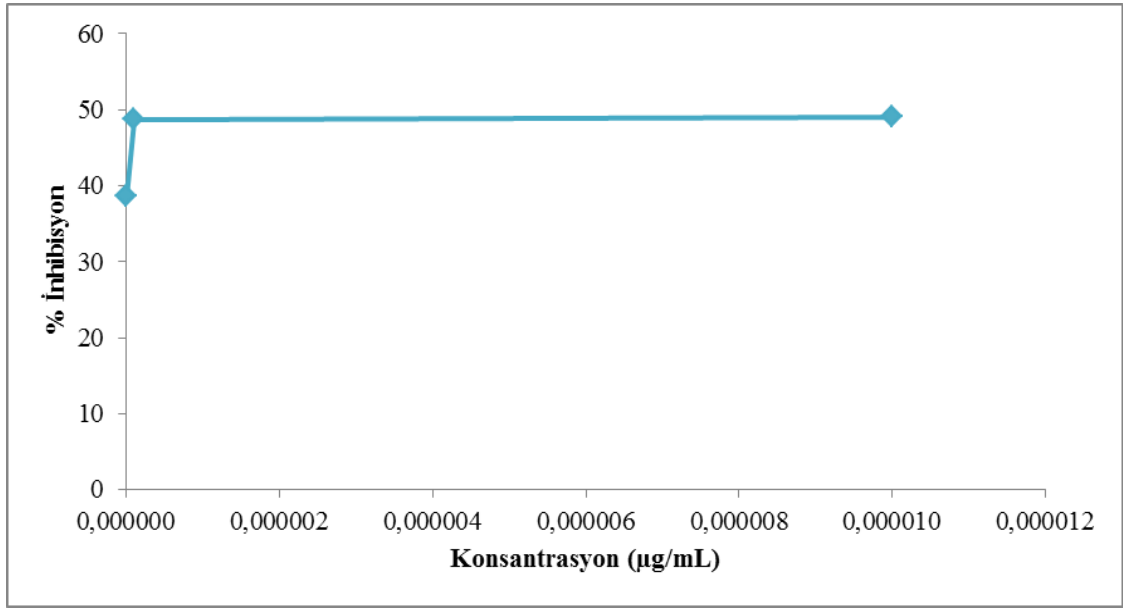
En düşük IC₅₀ değerlerine sahip olan bitkilerin % inhibisyon grafikleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7'de gösterildi.



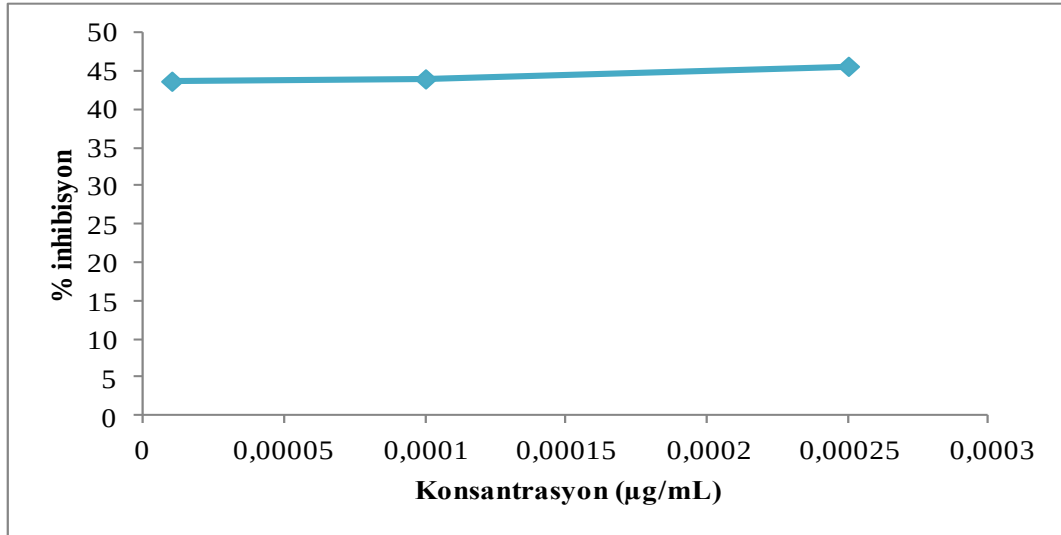
Şekil 4.1: Karadutun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.



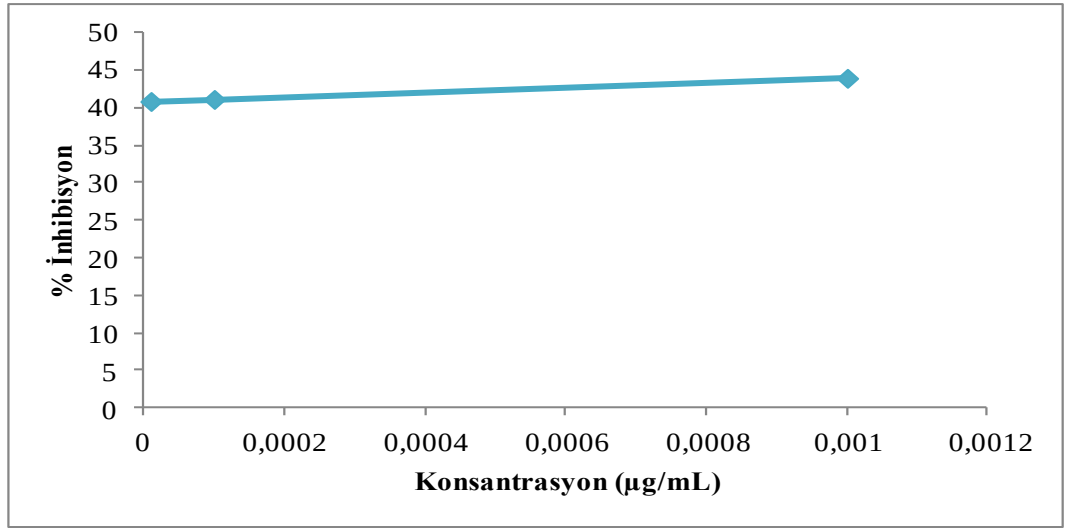
Şekil 4.2: Salatalık etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.



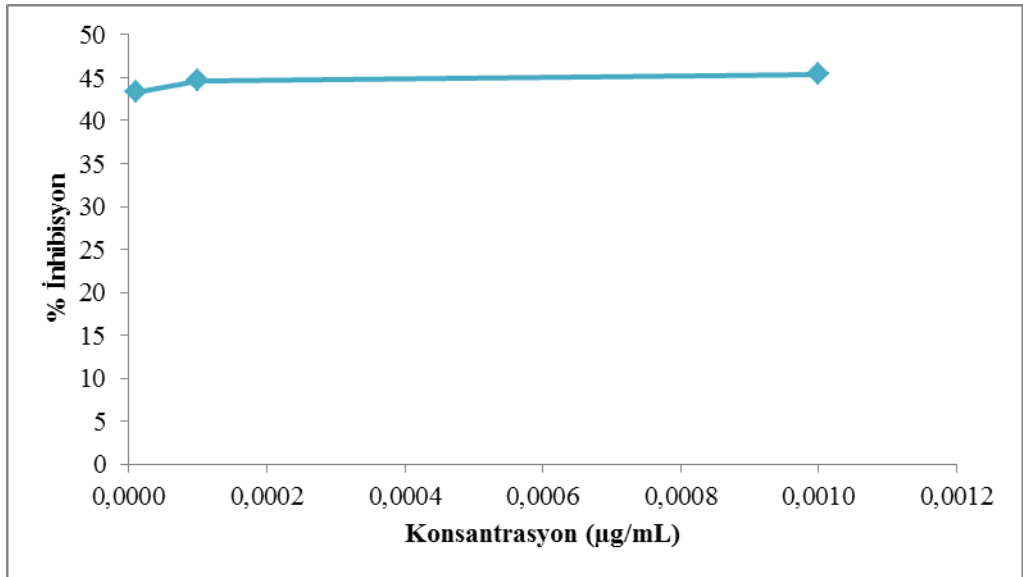
Şekil 4.3: Aasma yaprağı ve dalının etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiğı.



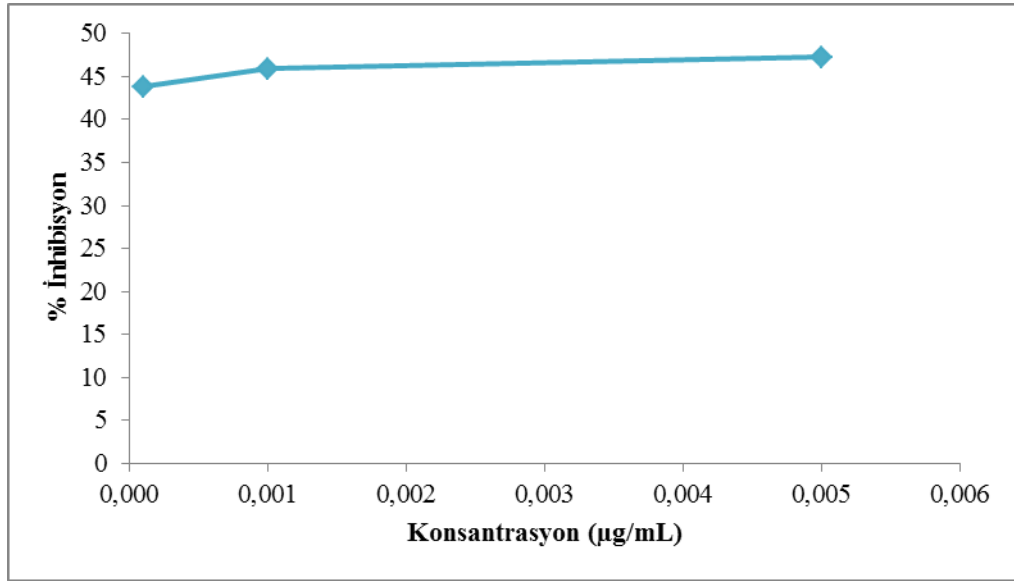
Şekil 4.4: Tetranın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiğı.



Şekil 4.5: Soğanın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.6: Beyaz üzümün etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.7: Ananasın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.

4.2. KİMYASAL MADDELERİN KOLLAJENAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİ

Çalışmamızda; azeleik asid, piridoksal-5`-fosfat (B₆ vitamini), L(+)-askorbik asid (C vitamini), doksisiklin hiklat, epikateşin, etilendiamin tetraasetik asid (EDTA), β-karoten (provitamin A), DL-α-tokoferol (E vitamini), 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on (Edaravon), gallik asid, glisil glisin, glikolik asid, indirgenmiş glutatyon (GSH), kafeik asid, kateşin, kojik asid, kumarik asid, kuarsetin dihidrat, laktik asid, malik asid, L-prolin, piragallol, rezorsinol, rutin hidrat, L(+)-sistein, sitrik asid, tartarik asid, 2-hidroksi-dodekanoik asid, DL-metionin metilsülfonyum klorür (U vitamini) ve vanilik asid gibi kimyasal maddelerin kollajenaz enzimi üzerine inhibitör etkileri incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.' te verilmiştir.

Tablo 4.2: Vitaminlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC₅₀ değerleri.

Madde Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC₅₀ Değeri (µg/mL)
L(+)-Askorbik Asid	0.0001	38.25 ± 4.00	0.0152 ± 0.00583
	0.001	44.62 ± 4.72	
	0.01	46.51 ± 3.70	
B ₆ Vitamini	0.0001	41.13 ± 0.00	0.0263 ± 0.00193
	0.001	42.41 ± 0.42	
	0.01	44.74 ± 0.34	
α-Tokoferol	0.0001	44.05 ± 0.67	0.0150 ± 0.00131
	0.001	46.97 ± 1.44	
	0.01	48.28 ± 0.59	
Rutin (P vitamini)	0.0000001	43.39 ± 4.09	0.0096 ± 0.00127
	0.0001	45.59 ± 1.84	
	0.01	52.61 ± 6.81	
U vitamini	0.0000001	42.60 ± 0.85	0.000112 ± 0.0000742
	0.00001	46.13 ± 2.80	
	0.0001	50.13 ± 4.28	

Tablo 4.3: Amino asid ve peptidlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC₅₀ değerleri.

Madde Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
GSH (glutasyon reduce)	0.00001	43.21 ± 1.49	0.00242 ± 0.000255
	0.0001	45.08 ± 2.15	
	0.001	46.27 ± 1.18	
Glisilglisin	0.0000001	44.65 ± 1.08	2.70 ± 0.876
	0.000001	45.66 ± 2.16	
	0.00001	46.59 ± 0.22	
	0.0001	47.12 ± 1.37	
Prolin	0.0001	42.91 ± 1.27	0.0294 ± 0.0105
	0.001	44.74 ± 0.49	
	0.01	45.66 ± 1.44	
Sistein	0.0001	41.75 ± 0.80	0.0111 ± 0.000636
	0.001	43.40 ± 0.18	
	0.01	45.29 ± 2.51	

Tablo 4.4: Çeşitli asidlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC₅₀ değerleri.

Madde Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Azeleik Asid	1	48.53 ± 2.63	11.60 ± 2.45
	5	49.60 ± 4.14	
	10	49.97 ± 0.90	
2- Hidroksidodekanoik Asid	0.0001	42.05 ± 0.71	0.011 ± 0.000566
	0.001	43.30 ± 0.30	
	0.01	45.12 ± 2.20	

Gallik Asid	0.00001	41.89 ± 0.89	0.00137 ± 0.0000261
	0.0001	43.24 ± 1.01	
	0.001	47.87 ± 0.16	
Glikolik Asid	0.0001	43.64 ± 1.87	0.0192 ± 0.00713
	0.001	46.33 ± 1.16	
	0.01	47.42 ± 1.79	
Kafeik Asid	0.0000001	43.79 ± 0.06	0.342 ± 0.19
	0.00001	45.20 ± 1.94	
	0.1	46.31 ± 1.72	
Kojik Asid	0.0000001	41.90 ± 1.09	0.0123 ± 0.00247
	0.001	44.43 ± 1.70	
	0.01	45.63 ± 2.70	
Kumarik Asid	0.01	44.64 ± 1.15	4.00 ± 0.76
	1	47.24 ± 0.87	
	10	56.94 ± 0.68	
Laktik Asid	0.0000001	41.21 ± 0.37	0.00111 ± 0.0000354
	0.000001	42.36 ± 3.17	
	0.0001	42.64 ± 0.81	
	0.001	45.28 ± 1.68	
Malik Asid	0.0000001	42.69 ± 0.18	0.000109 ± 0.0000163
	0.00001	46.93 ± 0.93	
	0.0001	47.46 ± 5.77	
Sitrik Asid	0.000001	43.42 ± 0.65	49.09 ± 0.92
	0.00001	44.23 ± 0.16	
Tartarik Asid	0.0000001	42.27 ± 2.28	0.0000232 ± 0.0000097
	0.000001	45.15 ± 0.49	
	0.00001	46.59 ± 0.41	
Vanilik Asid	0.0001	50.82 ± 10.08	48.55 ± 4.71
	0.01	52.04 ± 5.38	

Tablo 4.5: Çeşitli kimyasal maddelerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi ve IC₅₀ değerleri.

Madde Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Doksisiklin hiklat	0.01	36.26 ± 1.24	0.201 ± 0.136
	0.05	39.11 ± 3.44	
	0.1	44.82 ± 6.81	
Edaravon	0.0001	47.20 ± 9.25	1.46 ± 0.918
	0.01	50.04 ± 11.18	
	1	53.45 ± 11.31	
EDTA	0.0001	14.50 ± 2.97	11.84 ± 3.16
	0.001	16.52 ± 3.09	
	0.01	21.35 ± 4.45	
Epikateşin	0.01	43.22 ± 4.07	3.78 ± 1.21
	1	45.23 ± 3.44	
	2	47.40 ± 0.37	
Kateşin	0.0001	44.41 ± 2.03	0.000113 ± 0.00000495
	0.001	47.55 ± 6.04	
	0.01	48.18 ± 5.89	
Kuarsetin	0.0001	41.98 ± 1.79	0.11 ± 0.01
	0.01	45.03 ± 3.03	
	0.1	46.38 ± 4.60	
Pirogallol	0.00001	44.73 ± 2.55	48.95 ± 2.07
	0.001	45.67 ± 0.66	
Rezorsinol	0.000001	42.33 ± 0.51	0.000152 ± 0.0000064
	0.00001	43.72 ± 0.17	
	0.0001	47.48 ± 0.34	
β-Karoten	0.01	39.07 ± 0.66	5.13 ± 0.706
	1	41.38 ± 0.71	
	2	43.19 ± 1.00	

Tablo 4.2., Tablo 4.3. Tablo 4.4. ve Tablo 4.5.'e göre;

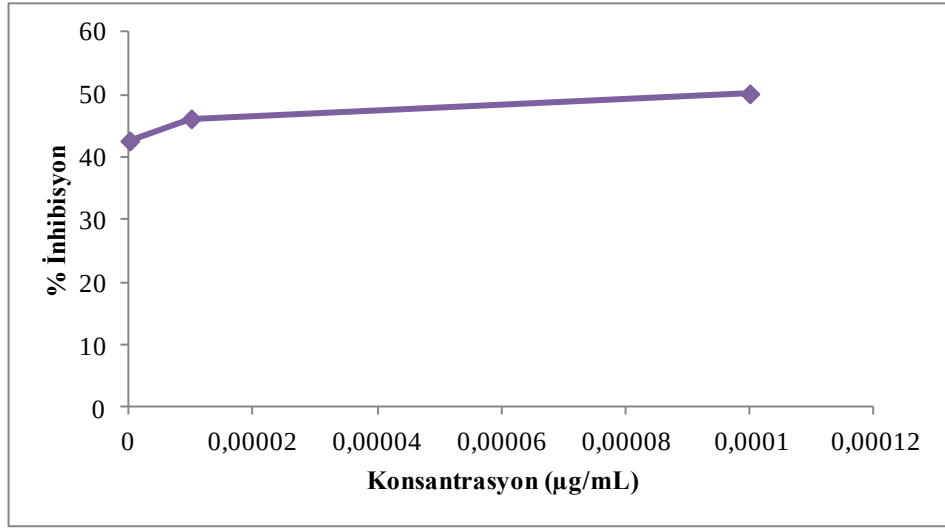
Çalışılan vitaminlerin içinde IC_{50} değeri en düşük olan U vitamini ($IC_{50} = 0.000112 \pm 0.0000742 \mu\text{g/mL}$) en yüksek kollajenaz inhibitör etkisi göstermiştir. Bunu rutin ($IC_{50} = 0.00859 \pm 0.00765 \mu\text{g/mL}$) inhibisyon değeriyle izlemektedir (Tablo 4.2).

Amino asid ve peptidlerin kollajenaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri sıra ile GSH, sistein, prolin ve glisilglisin şeklinde azalmaktadır. Amino asid ve peptidler içerisinde en yüksek inhibisyon değerini GSH göstermiştir ($IC_{50} = 0.00242 \pm 0.000255 \mu\text{g/mL}$) (Tablo 4.3).

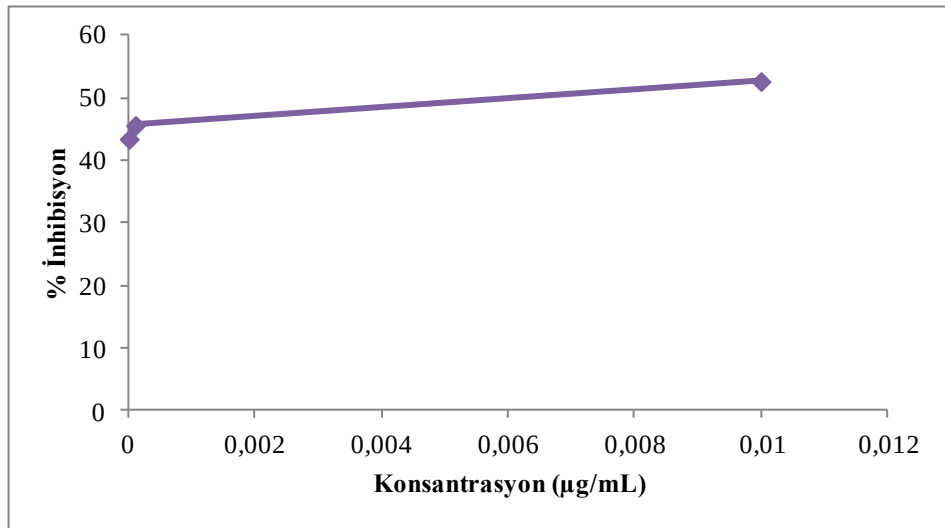
Çeşitli asidlerin kollajenaz üzerindeki % inhibisyon etkisi incelendiğinde elde edilen IC_{50} değerlerine bakılarak, en yüksek kollajenaz inhibitör etkisine sırasıyla tartarik asid ($IC_{50} = 0.0000232 \pm 0.0000097 \mu\text{g/mL}$) ve gallik asidin ($IC_{50} = 0.00137 \pm 0.0000261 \mu\text{g/mL}$) sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.4).

Çalışılan kimyasal maddeler içinde rezorsinol ($IC_{50} = 0.000152 \pm 0.0000064 \mu\text{g/mL}$) en düşük IC_{50} değerine ve en iyi kollajenaz inhibitor etkisine sahip kimyasal madde olarak bulunmuştur. Bunu sırasıyla kateşin ($IC_{50} = 0.000113 \pm 0.00000495 \mu\text{g/mL}$) ve doksisiklin hilkat ($IC_{50} = 0.201 \pm 0.136 \mu\text{g/mL}$) izlemektedir (Tablo 4.5).

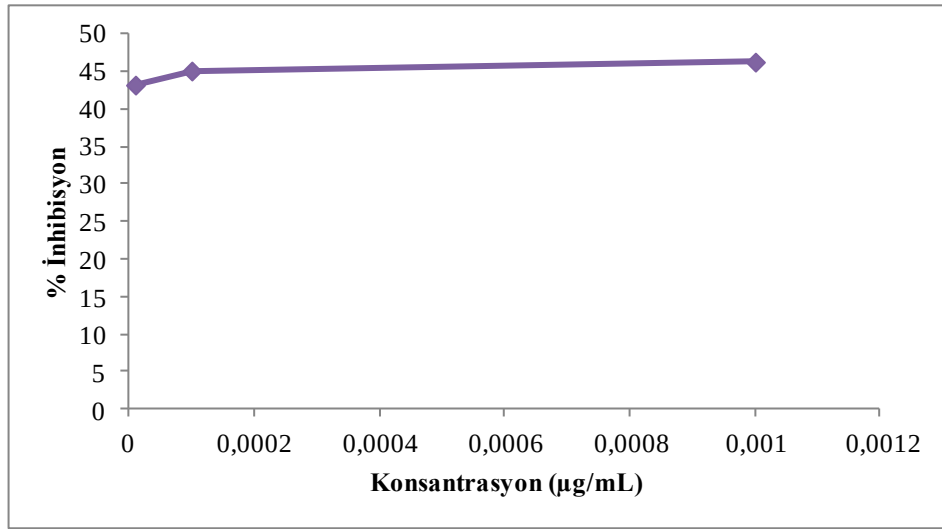
En düşük IC_{50} değerine sahip olan vitaminlerin, amino asid ve peptidlerin, asidlerin ve kimyasal maddelerin % inhibisyon grafikleri Şekil 4.8 - 4.16'da gösterilmiştir.



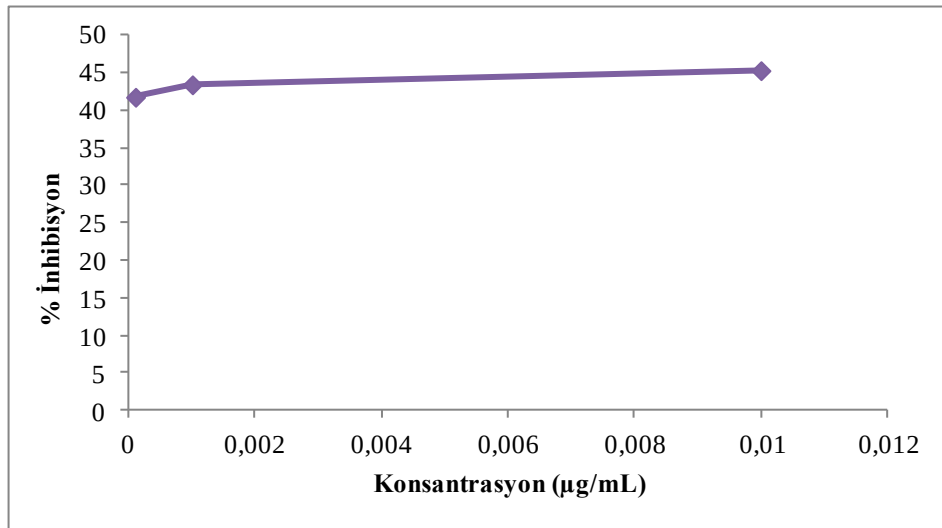
Şekil 4.8: U vitaminin % inhibisyon grafiği.



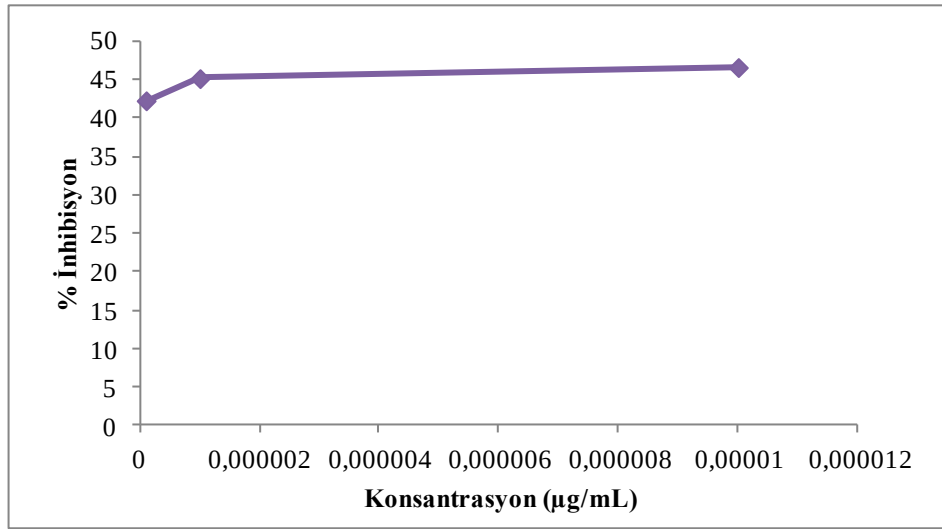
Şekil 4.9: Rutinin % inhibisyon grafiği.



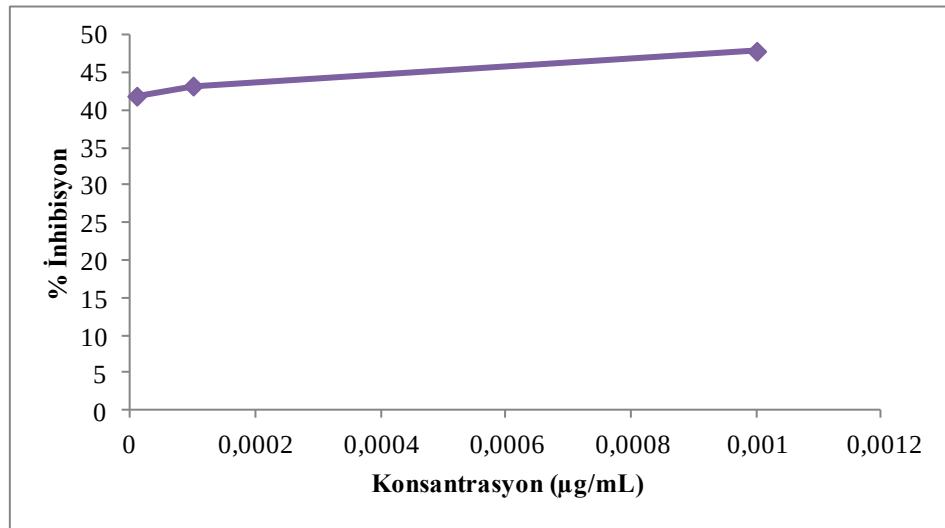
Şekil 4.10: GSH'n % inhibisyon grafiği.



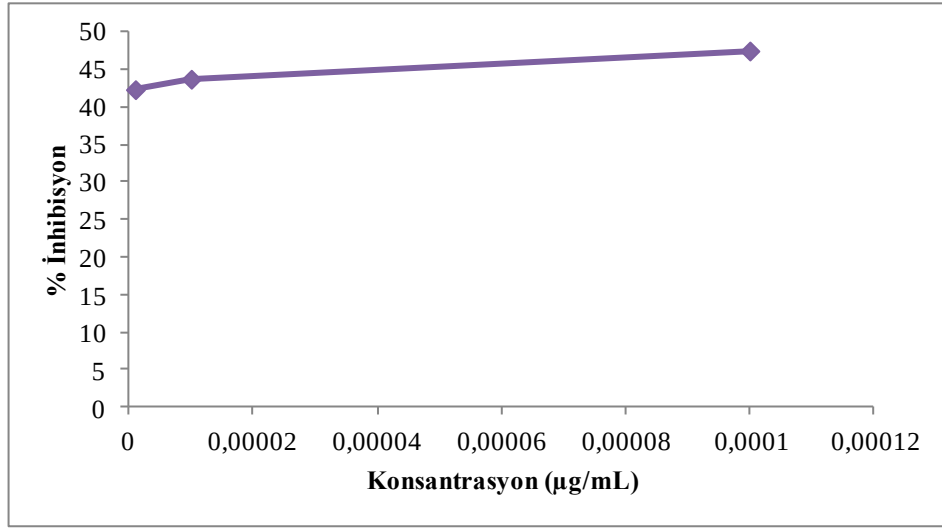
Şekil 4.11: Sisteinin % inhibisyon grafiği.



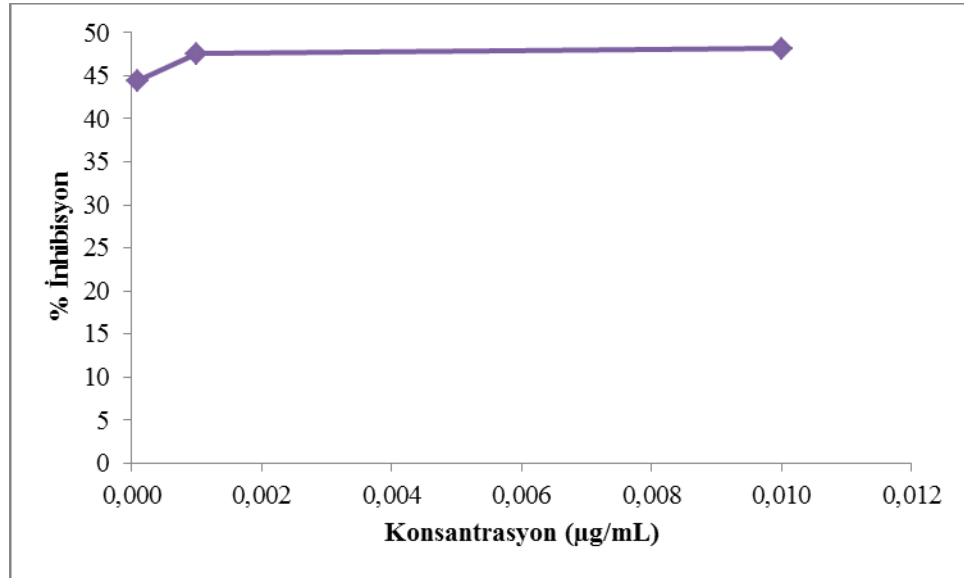
Şekil 4.12: Tartarik asidin % inhibisyon grafiği.



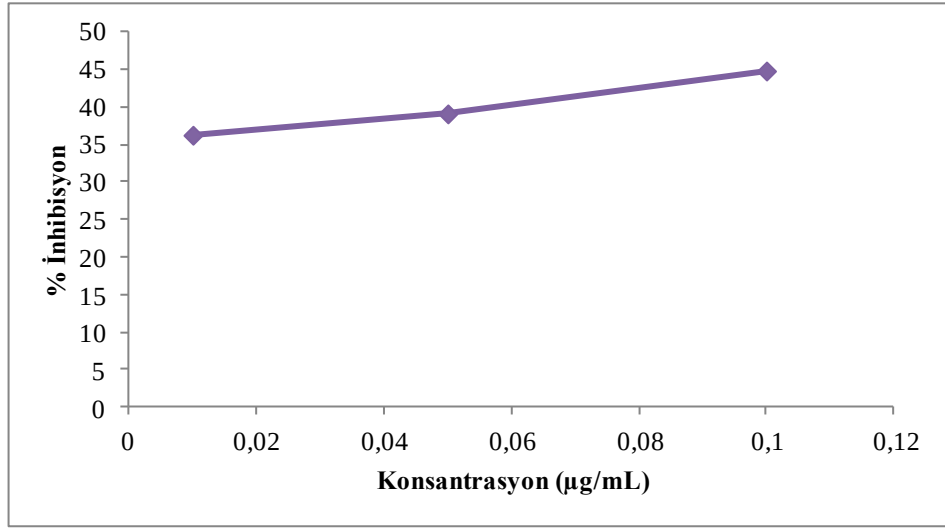
Şekil 4.13: Gallik asidin % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.14: Rezorsinolün % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.15: Kateşinin % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.16: Doksisiklin hilkatın % inhibisyon grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin hastalıkların tedavisi veya hastalıklardan korunma amacıyla kullanılması insanlık tarihi ile başlar. Yeryüzünde bulunan bitki türlerinin sayısının 250.000-500.000 arasında olduğu kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kayıtlarına göre dünya nüfusunun büyük bir bölümü (% 70-80) tedavi veya korunmak amacıyla geleneksel tıptan yararlanılmaktadır. Bu amaçla yararlanılan tıbbi bitki türünün 70.000 kadar olduğu tahmin edilmektedir (Ersöz, 2012). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüzde çeşitli deri hastalıklarının tedavisinde çeşitli bitkiler kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde dermatoloji polikliniklerine başvuran hastalarda fitoterapi (bitkisel tedavi) kullanma sıklığı % 86, Almanya'da % 52'dir (Ernst, 2000). Bu nedenle dermatologların bitkilerle tedavi konusunda bilgili olmaları önemlidir.

Yaşın ilerlemesiyle ve yaşlı insanların birçok ilacı fazla miktarda kullanması ile beden daha fazla serbest radikale maruz kalır ve daha fazla serbest radikal üretir. Bununla birlikte vücudun doğal antioksidan üretimi yaşın ilerlemesi ile azalır. Vücutta yaşla birlikte çeşitli hastalıklar ortaya çıkar. Deri yaşlanması yaşlanma ile birlikte görülen geri dönüşümsüz bir süreç olarak kendini göstermektedir. Ancak bazı ilaçlar, kozmetik ürünler ve güneş koruyucuları ile deri yaşlanması geciktirilebilir. Yapılan çalışmalarda vitaminlerin, minerallerin, bitkisel ürünlerin kozmetiklere katılarak yaşlı deride veya hasarlı deride potansiyel bir düzelme yapabileceği gösterilmiştir (Amer ve Maged, 2009).

Yara, yumuşak dokuların normal anatomik yapı ve fonksiyonun bozulmasıdır (Diegelmann ve Evans, 2004). Yara iyileşmesi, travma ile başlayan ve yeni doku oluşumu ile sonuçlanan hücresel ve biyokimyasal olaylar sürecidir (Engin, 2004). Kollajen oluşumu yara onarım sürecinin 4 ve 5'inci günlerde tropokollajen moleküllerinin ekstrasellüler matrikse bırakılmasıyla şekillenmeye başlar. Başlangıçta

şekillenen olgunlaşmamış kollajen fibrilleri, birbirleriyle çapraz bağlanarak olgun kollajeni oluştururlar (Heinze ve Clem, 1988). Yara iyileşmesini etkileyen faktörler beslenme, glikokortikoidler, enfeksiyon, hormonlar, kollajen yapım bozuklukları, ısı, şeker hastalığı ve hematolojik hastalıklardır. Yara iyileşmesinde beslenmenin önemi Hipokrat zamanından beri bilenen bir gerçektir. Beslenme bozukluğu bulunan hastalarda yara iyileşmesi tam olmaz, gecikir ve bu kimselerin enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmaları yeterli olmadığından yara enfeksiyonu gelişmesi riski yüksektir (Stashak, 1991).

Deney hayvanlarında normal beslenmenin % 60 oranında kısıtlandığı durumlarda bir hafta içinde kollajen çapraz bağlarında bozulma, 4 ay içinde de kollajen sentezinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Waldorf ve Fewkes, 1995).

Veteriner Hekimlikte uygulama alanı yeni olan kollajenaz enziminin lokal uygulamaları, Askeri Veteriner Okulu, Hayvan Hastanesine getirilen, 4 at ve 13 köpekte yer alan kronik yaralar üzerinde denenmiştir. Kollajenaz içeren pomat kullanılan yaralarda yangı belirtileri 7 gün içinde tüm hayvanlarda azalarak ortalama 10'uncu günde kaybolduğu gözlenmiştir. Özellikle sağaltımı takiben 4 ve 5'inci günlerde yara kenarlarında oluşan epitelizasyon sonucu 7inci günü takiben yaradaki küçülme ve bütün olgularda 10'uncu günün sonunda iyileşmeler gözlenmiştir. Kollajenaz pomadı, direkt olarak uygulanmış köpeklerde yapılan bütün uygulamalarda bu pomad ile kısa sürede başarılı sonuçlar alınmıştır (Ancan ve Öztürk, 1999).

MMP'lar normal sağlıklı dinlenme halindeki dokularda eksprese edilmezler ya da çok az eksprese edilirler. Tersine olarak MMP ekspresyon seviyesi herhangi bir doku onarımı ve yenilenmesi sırasında artar (Parks, 1999) MMP inflamasyonu, kanser, kemik, kırık ve ilişkili dokuların kollajen yapısının bozulması ile ilişkili birçok hastalıkta matriks yenilenmesi ile birlikte (Öner ve Öner, 2013). MMP'lar değişik dokuların yeniden yapılanmasında, kemiğin yeniden modellenmesinde, yara iyileşmesi, anjiyogenez, inflamasyon, apoptozis, immun cevap gelişimi ve ovulasyonda rol alırlar (Galis ve Khatri, 2002). Kanserde, serumdaki MMP aktivitelerinde artış olduğu gösterilmiştir (Hidalgo ve diğ., 2001, Pryczynicz ve diğ., 2013).

MMP inhibitörleri tedavi amacıyla ilk olarak romatoid artrit hastalığının tedavisi için kullanılmıştır (Brown, 1998). MMP inhibitörleri tedavi amacıyla kanser hastalığında da kullanılmaktadır (Oncel, 2012). MMP'lar askorbat, sitrat, tetrasiklin, sentetik peptidler, Na-EDTA, asetilsistein gibi pek çok ilaç tarafından inhibe edilmektedirler. MMP tarafından sert ve yumuşak dokulardaki kollajen liflerinin yıkımı ile periodontal cep oluşumu, dişlerde ataçman kaybı, kemik erimesi, diş eti çekilmesi, diş mobilitesi ve diş kaybı meydana gelir. Bu nedenle MMP'lardan olan kollajenaz enziminin inhibisyonu en önemli organlarımızdan olan dişlerin korunması için de gereklidir.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada E vitamini ve selenyumun kollajen yıkımını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Asman ve diğ., 1994). Antioksidan vitaminlerin diş sağlığını önlediği, kollajen yıkımını, kollajenaz enzimi aktivitesini azaltarak, inhibe ettiği Doğan ve diğ.(2010) tarafından bildirilmiştir.

Bağ dokusunun komponentleri olan kollajen ve elastinin harabiyeti ile dokularda inflamasyon ve çeşitli hastalıklar görülür. Kollajenaz aktivitesinin inhibe edilmesi ile kollajen yıkımı ile seyreden bazı medikal ve periodontal hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar ortaya çıkabilir. Kollajenaz enziminin aktivasyonunun korunması, bağ dokusunun temel yapı proteinlerinden olan kollajen yıkımının önlenmesi için önemlidir. Bu şekilde kollajenaz enziminin inhibe olması patolojik kollajenolizis, osteoartrit, korneal ülserler, şeker hastalığı ve periodontitiste önemli bir olaydır (Senturk ve diğ. 2002).

21 farklı bitki ile yapılan bir çalışmada en iyi kollajenaz inhibitörleri olarak beyaz çay % 87, yeşil çay % 47.17 ve gül % 40.96 oranlarında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunları takiben ise lavanta (% 31.06) ve bladderwrack diye adlandırılan bir tür su yosununun ise anti-kollajenaz etkisi (% 24.52) gösterdiği izlenmiştir (Thring ve diğ., 2009). Bizim yaptığımız çalışmada ise lavantanın inhibisyon etkisi % 41.37 olarak bulunmuştur. Yeşil çay için bulduğumuz değer ise bu çalışmayla yakınlık göstermiş olup, % 44.05 gibi bir oranda enzimi inhibe etmiştir. Beyaz çayda ise bu değer % 44.82 oranındadır.

Choi ve diğ. (2012) tarafından *Enteromorpha linza*, *Sargassum sagamianum*, ve *Ulva pertusa* bitkileriyle yapılan bir araştırmada bu bitkilerin 100 µg/mL konsantrasyondaki

ekstreleri kullanılmış ve % 14 - % 70 arasında değişen inhibisyon değerleri gözlenmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada deneyler kollajenaz tip I, II ve III üzerinde ayrı ayrı denenmiş, bu üç tür kollajenaz için ayrı ayrı inhibisyon değerleri bulunmuştur.

Triphala guggulu bitkisiyle yapılan diğer bir bilimsel çalışmada, bu bitkinin 2.5 mg/mL'lik çözeltisinin kollajenaz enzimini % 80 oranında inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Daha düşük konsantrasyonlu çözeltileri için ise bu inhibisyon oranı 1.25 mg/mL için % 39 ve 0.625 mg/mL için % 27 gibi azalan değerler göstermektedir. Yine aynı çalışmada kurkumin, kuarsetin ve aristolochid asidin kollajenaz inhibitör etkisinden bahsedilmiştir (Sumantran ve diğ., 2007). Bizim çalışmamızda da bunu destekleyici şekilde kuarsetinin $IC_{50} = 0.11 \pm 0.01$ µg/mL gibi düşük bir IC_{50} değeri gösterdiği bulunmuştur. Kuarsetinin yapılan çalışmalarda iyi bir kollajenaz inhibitörü olduğu saptanmıştır.

Makimura ve ekibinin çay kateşinleri üzerine yaptığı çalışmada; çaylarda bulunan kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşi ve epigallokateşingallatin (EGCG) 100 µg/mL'lik konsantrasyona sahip çözeltilerinin *Clostridium histolyticum* kollajenazın aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Kullanılan bu kateşin çeşitlerinden EGCG % 100'e yakın inhibitör etkisiyle en iyi kollajenaz inhibitör etkilerine sahip olduğu bulunmuştur (Makimura ve diğ., 1993). Bizim yaptığımız çalışmada da kullanılan epikateşin 3.78 ± 1.21 µg/mL gibi düşük bir IC_{50} değeri gösterdiği bulunmuştur, bu değer düşük olması iyi bir inhibitor olduğunu kanıtlamaktadır.

Aslam ve diğ. (2006) yaptığı bir çalışmada narın antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen özelliklerinden dolayı cilt onarımını sağladığı bulunmuştur. Bu çalışma ile paralel olarak bizim yaptığımız çalışmada da nar $IC_{50} 48.3 \pm 0.06$ µg/mL değeriyle kollajenaz enzimini inhibe etmiştir. Narın yapısında gallik asid, kojik asid, kuarsetin ve rutin gibi çeşitli bileşikler bulunmaktadır (Aviram ve diğ., 2000). Narın içinde bulunan bu bileşiklerin kollajenaz enzimini inhibe ettiği düşünülebilir.

Çeşitli dut türleriyle yapılan bir başka çalışmada; *Morus alba* yani beyaz dut türünün yaprakları kullanılmıştır. Bu bitkinin anti-inflamatuvar ve antitümör özellikleri Kumar ve Chauhan (2008) tarafından kanıtlanmıştır. Beyaz dutun bu özelliklere sahip olmasından yola çıkarak, bizim elde ettiğimiz kollajenaz inhibisyon IC_{50} değeri olan 33.47 ± 12.36 µg/mL da değerlendirildiğinde, bu dut türünün dalı ve yaprağının deride oluşan yara

veya hücre büyümelerine karşı iyileştirici etkisi olabileceği savunulabilir. Karadut (*Morus nigra*) da anti-kanserojen özellik gösterdiğinden deride tümör oluşumunu engellemek amacıyla kullanılabilir. Ayrıca karadut kozmetikte cilt beyazlaştırıcı ve leke giderici olarak da kullanılmaktadır (Zheng ve diğ., 2010). Çalışmamızda bunu destekleyici nitelikte karadutun 0.000001 µg/mL konsantrasyondaki ekstresi için % 51.35 inhibisyon değeri bulunmuştur. Ayrıca Tetsuhiro ve diğ. (2007) tarafından dut yaprağı ile yapılan çalışmada, dut yaprağının cilt hastalıklarının yanı sıra, gastrointestinal hastalıklarda, hipertansiyonda ve idrar salınımını kolaylaştırmada kullanıldığı açıklanmıştır. Bu etkinin dutun içerdiği flavonoidlerden kaynakladığı öne sürülebilir.

Ananas üzerine Debnath ve diğ. (2012) yaptığı çalışmada, ananasın deri döküntüleri üzerine olan onarıcı etkisi ve maskelerde kullanıldığında kırışıklık giderici etkisi kanıtlanmıştır. Kırışıklık önleyici kremlere eklenen α -hidroksi asidler ananasta doğal olarak bulunmaktadır. İçerdiği meyve asitleri sayesinde pürüzlü ciltler içinde faydalı olduğu, cildi ölü deriden arındırarak cildin yenilenmesine yardımcı olduğu savunulmuştur (Debnath ve diğ., 2012). Bizim yaptığımız çalışmada da ananasın $IC_{50} = 0.0093 \pm 0.000177$ µg/mL ile anti-kollajenaz etkisinin olduğu görülmüştür.

Kapari bitkisi ülkemizde Akdeniz bölgesinde yetiştirilen bir bitkidir. Diüretik, tansiyon düşürücü ve tonik özelliği olduğu belirtilmektedir (Tlili ve diğ., 2011). Ali-Shtayeh ve diğ. (2000) tarafından 165 bitki kullanılarak yapılan çalışmada, 21 bitkinin cilt hastalıkları üzerinde iyileştirici etkisi olduğu ve bunlardan birinin kapari bitkisi olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da kapari bitkisinin düşük bir IC_{50} değeri gösterdiği saptanmıştır ($IC_{50} = 0.000902 \pm 0.00085$ µg/mL). Kapari bitkisinin yapısında alkaloid, lipid, polifenolik bileşikler, flavanoidler, glukosinolatlar, rutin, kuarsetin, E vitamini gibi bileşiklerin bulunduğu bildirilmiştir (Tlili ve diğ., 2010; Conforti ve diğ., 2011; Siracusa ve diğ., 2011). Kaparinin iyi bir antikollajenaz etki göstermesi, içerdiği bu bileşikler nedeni ile olabilir.

Rezene ve biberiyenin de yer aldığı birçok bitki ile yapılan bir araştırmada bu iki bitkinin antioksidan özellikleri kanıtlanmıştır (Mantle ve diğ., 2000). Yaptığımız çalışmada ise rezenenin ($IC_{50} = 0.0115 \pm 0.00633$ µg/mL), biberiyenin ($IC_{50} = 0.0135 \pm 0.00195$ µg/mL) anti-kollajenaz özellikleri kanıtlanmıştır. Rezenenin yanı sıra

çalışmamızda antioksidan özellik gösterdiği bilinen soğan ($IC_{50} = 0.00294 \pm 0.000422 \mu\text{g/mL}$), siyah üzüm ($IC_{50} = 0.0193 \pm 0.0150 \mu\text{g/mL}$), karadut ($IC_{50} = 0.0000006 \pm 0.0000003 \mu\text{g/mL}$), nar ($IC_{50} = 48.3 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$), kiraz ($IC_{50} = 0.193 \pm 0.065 \mu\text{g/mL}$), vişne ($IC_{50} = 0.301 \pm 0.0202 \mu\text{g/mL}$), yaban mersini ($IC_{50} = 0.023 \pm 0.00325 \mu\text{g/mL}$) gibi bitkilerin aynı zamanda kollajenaz inhibitör özellikleri olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkılarak, antioksidan özellik ve anti-kollajenaz özelliklerin birbiri ile paralellik gösterebileceği ileri sürülebilir.

Halk arasında salatalığın kan temizleyici, sinirleri yatıştırıcı, yorgunluk giderici, uykusuzluk giderici, kolesterol düşürücü özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Salatalık terbezlerinin sağlıklı çalışmasına yardımcı olur. Salatalığın cildi yumuşatıcı, besleyici, kırışıklık giderici ve sivilceleri giderici özellikleri de bulunmaktadır. Salatalığın antioksidan (İbrahim ve diğ., 2010; Nema ve diğ., 2011) ve antimikrobiyal özelliğe de sahip olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir. Salatalığın antielastaz ve antihyaluronidaz aktivitelerine sahip olduğu Nema ve diğ., (2011) tarafından açıklanmıştır. Çalışmamızda salatalık kollajenaz enzimini de yüksek bir oranda inhibe etmiştir ($IC_{50} = 0.00000297 \pm 0.000000854 \mu\text{g/mL}$). Salatalığın antielastaz, antihyaluronidaz ve antikollajenaz aktiviteye sahip olması nedeni ile deri ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği öne sürülebilir.

Tetra bitkisi halk arasında duman ağacı olarak bilinmekte olup batı Trakya bölgesinde çok yetişen bir ağaçtır. Halk arasında yara iyileştirici etkisi olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca yine halk arasında sivilce ve akne tedavisinde, mide yaralarını iyileştirici olarak kullanıldığı öne sürülmektedir. Tetranın antihemorajik, yara iyileştirici, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu (Demirci ve diğ., 2003) bildirilmiştir. Ayrıca bu bitkinin mide ve bağırsak ülserlerinde de sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir (Ivanova ve diğ., 2005). Tetra bitkisinin metanollü ekstresi ile oluşturulan DNA hasarı ve karaciğer hasarı üzerine koruyucu özelliği Matic ve diğ. (2013) tarafından ortaya konulmuştur. Çalışmamızda tetranın kollajenaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur ($IC_{50} = 0.000804 \pm 0.00021 \mu\text{g/mL}$). Tetranın enzimi yüksek oranda inhibe etmesi ile bu bitkinin deri ile ilgili hastalıklarda ve deride oluşan yaraları iyileştirici olarak kullanılabileceği öne sürülebilir.

Domateste bulunan likopen antioksidan özelliğe sahiptir (Wang ve diğ., 2013) ve domates kanser önleyici (Romagnolo ve diğ., 2012), kolesterol düşürücü olarak kullanılmaktadır (Khayat Nouri ve Namvaran, 2013). Domateste bulunan tomatidinin MMP ekspresyonunu inhibe ederek akciğer kanserini azalttığı Yan ve diğ. (2013) tarafından bildirilmiştir. Domatesin ve likopenin prostat kanserini önlediği Silberstein ve diğ. (2013) tarafından bildirilmiştir. Domatesin yüksek yağ diyeti verilerek oluşturulan hepatik lezyonlara karşı koruyucu etkisi olduğu Melendez-Martinez ve diğ (2013) tarafından saptanmıştır. Flavonoidlerin kollajenaz enzimini inhibe ettiği Sin ve Kim (2005) tarafından bildirilmiştir. Çalışmamızda domatesin yüksek oranda kollajenaz enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. Bu etkisini, yapısında bulunan likopen ve flavonoid gibi maddelerden dolayı olabileceği öne sürülebilir.

Kudret narının antidiabetik (Hsiao ve diğ., 2013), antiprolatif melanojenesis (Kikuchi ve diğ., 2012) ve kanseri önlediği (Meng ve diğ., 2012) kolesterol ve lipidi düşürdüğü (Senanayake ve diğ., 2012) bildirilmiştir. Ayrıca kudret narının yapısında bulunan triterpenoidlerin sitotoksik özelliğe sahip olduğunu ve deri kanserini önlediği Zhang ve diğ. (2012) tarafından öne sürülmüştür. Çalışmamızda kudret narı kollajenaz enzimini yüksek oranda inhibe etmiştir. Kollajenaz enzimini inhibe etmesinin nedeni ise bu bitkinin deri hastalıklarını veya deride ve dişte meydana gelen bozuklukları önleyebileceği öne sürülebilir.

Böğürtlenin halk arasında yara iyileştirici, cildi güzelleştirici, kan şekerini düşürücü (Baytop, 1994), kanı temizleyici özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Kozmetikte böğürtlen çok kullanılır. İnsanlarda kansere karşı koruduğu da bilinen özelliklerindendir. Böğürtlenin çeşitli araştırmalarda antioksidan aktiviteye sahip olduğu Serteser ve diğ. (2008) tarafından bildirilmiştir. *Rubus sanctusun* karbon tetra klorür ile oluşturulan karaciğer hasarını önlediği (Badr ve diğ., 2009), yara iyileştirici özelliğe (Suntar ve diğ., 2011), antiinflamatuvar aktiviteye (Erdemoglu ve diğ., 2003), antihelmitik, sitotoksik etkiye sahip olduğu (Ali ve diğ., 2013) bildirilmiştir. Çalışmamızda böğürtlen, kollajenaz enzimini yüksek bir değerde inhibe etmiştir. Böğürtlenin yapısında bulunan renkli bileşikler olan antosiyaninler, karotenler nedeni ile bu etkiyi gösterdiği öne sürülebilir.

Asma yaprağı halk arasında ishal kesici, sarılık ve mide iltihabı giderici, böbrek taşlarını dökücü, bağırsak, yaralarını iyileştirici özelliğe sahiptir. Asma yaprağının peptik ülseri önlediği (Farzaei ve diğ., 2013), antioksidan aktiviteye (De la Cruz ve diğ., 2013), antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu (Kuete ve diğ., 2012), alkol ile oluşturulan toksisiteyi önlediği (Shivashankara ve diğ., 2012) bildirilmiştir. Ayrıca asma yaprağı ile birlikte üzümün de çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu saptanmıştır. Üzümün antiinflamatuvar, antioksidan ve yara iyileştirici özellikleri olduğu (Hemmati ve diğ., 2011) tarafından bulunmuştur. Üzümün tirozinaz enzimi inhibitörü olduğu ve bu etkiyi üzümde bulunan resveratrolun oluşturduğu Park ve Boo (2013) tarafından açıklanmıştır. Çalışmamızda hem üzüm hem de üzüm yaprağı yüksek orandan kollajenazı inhibe etmiştir. Her ikisinde de kollajenazı inhibe etmesinin nedeni ile ikisinin de kollajen ile ilgili hastalıklarda, koruyucu özellikte olabileceği söylenebilir.

Bailly ve diğ. (1990) yaptıkları çalışmada retinoik asidin kollajenaz sentezi üzerindeki inhibisyon etkisini kanıtlamışlardır. Trans retinoik asid, retinol ve β -karotenin kollajenaz enzimini inhibe ettiği Lo ve diğ. tarafından bildirilmiştir (2013). Bizim havuç ekstresi ile yaptığımız denemeler de zengin provitamin A kaynağı olan havucun ($IC_{50} = 2.06 \pm 1.12 \mu g/mL$) kollajenaz inhibitör etkisine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca kayısı ($IC_{50} = 18.28 \pm 0.778 \mu g/mL$), ananas ($IC_{50} = 0.0093 \pm 0.000177 \mu g/mL$), ayva ($IC_{50} = 48.8 \pm 1.58 \mu g/mL$), balkabağı ($IC_{50} = 49.4 \pm 2.45 \mu g/mL$), Trabzon hurması ($IC_{50} = 0.0225 \pm 0.00332 \mu g/mL$) kollajenaz inhibisyon etkisi olan meyvelerdir. Çalışmamızda sarı ve turuncu renkli bitkilerin enzimi iyi bir şekilde inhibe etmesinin nedeninin bu bitkilerin provitamin A içeriğine sahip olmaları olduğu söylenebilir.

Vitamin, eser elementler ve mineral eksiklikleri de yara iyileşmesinin spesifik boyutlarını bozabilir. Keratinizasyon ve fibroblast maturasyonuna olan etkilerinden dolayı, A vitamini epitelizasyonu, kollajen sentezini ve stabilitesini uyarır. C vitamini (askorbik asid) demir ve oksijenle beraber kollajen sentezi sırasında, lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gereklidir. C vitamini eksikliğinde kollajen demetler kararsız ve kolaylıkla bozulabilir olduklarından derinin gerginliği ve kapiller frajilite azalır. A vitamini gibi, C vitamini de inflamatuvar cevabı uyarır ve eksikliğinde metabolizmanın enfeksiyonlara direnci düşer. Örneğin özellikle ağır yanık yaralarında günde 1 - 2 gr C vitamini verilmesi yaygın bir pratik uygulamadır (Reiser, 1993). Yara iyileşmesinin

gecikmesinde beslenme sorunları da akla gelmelidir. Tam iyileşme için uygun bir beslenme zorunludur (Waldorf ve Fewkes, 1995). Çalışmamızda C vitamininin kollajenaz enzimini % 46.51 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

S-metil-metionin sülfonyum klorür, mısırdada, lahanada, ıspanakta, sarımsakta ve soya ununda bulunur (Baker, 1986; Baker, 2006). U vitamini olarak da bilinen bu kimyasal maddenin (Kopinski ve diğ., 2007), antiülser, antiinflamatuvar, lipid düşürücü ve antidepresan rol oynadığı literatürlerde belirtilmektedir (Baker, 2006; Kim ve diğ., 2010).

Kim ve diğ., 2010, tarafından U vitamininin dermatolojik bozukluklarda etkili olduğu, deriyi hasarlara karşı koruduğu ve iyileştirdiği öne sürülmüştür. U vitamininin valproik asid verilen sıçanlarda oluşan toksiteyi önlediği Sokmen ve diğ., (2012a) tarafından bildirilmiştir.

Çalışmamızda U vitamini 0.0001 µg/mL’de kollajenaz enzimini % 50.13 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Çalışmamızda inhibitör olarak kullandığımız vitaminler içinde, U vitamininin kollajenaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır.

Anabilim Dalımızda yapılan diğer tez çalışmalarında da U vitaminin elastaz (Göktaş, 2012) ve anjiyotensin konverting enzimini (Çepel, 2011) düşük oranda inhibe ettiği bulunmuştur. U vitamininin tansiyon düşürücü özelliğinin yanında deri ile ilgili hastalıklarda kullanılabileceği öne sürülebilir. U vitamininin koruyucu ve inhibitör etkisinin yapısındaki SH grupları ile ilgili olabileceği öne sürülebilir.

Rutin deneyisel olarak oluşturulan hipertansiyonu azaltarak vasküler lezyonları önlediği Orbison ve Peters (1953) tarafından ileri sürülmüştür. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada, UV ışınlarıyla oluşturulan deri hasarında *Calendula officinalis* bitkisinde bulunan rutin koruyucu özelliğinden bahsedilmiştir (Fonseca ve diğ., 2010). Rutin (P vitamini) suda çözünen bir vitamin olup, hiperkolesterolemik sıçanlarda rutin oluşan toksiteyi önlediği (Al-rejaie ve diğ., 2013), Alzheimer hastalığında oksidatif stresi azalttığı (Javed ve diğ., 2012), Parkinson hastalığında oksidatif strese karşı nöronları koruduğu (Khan ve diğ., 2012), diyabetik sıçan dokularında oluşan hasarı önlediği (Kamalakkannan ve Stanley, 2006) bildirilmiştir.

Çalışmamızda rutin 0.01 µg/mL konsantrasyonda % 52.61 oranında kollajenaz enzimini inhibe etmiştir. IC₅₀ değerinin diğer vitaminlere göre U vitamini hariç düşük olması rutinin iyi bir kollajenaz enzim inhibitörü olduğunu bize göstermektedir.

B₆ vitamininin antimutajenik aktiviteye sahip olduğu Arriaga-Alba ve diğ. (2013) tarafından bulunmuştur. B₆ vitamini eksikliğinde organizmada cilt bozuklukları ve sinirsel bozukluklar görülür. Sıçanlarda B₆ vitamini eksikliğinde kollajen miktarında azalma olduğu Tane ve diğ. (1976) tarafından bulunmuştur.

Valproik asid ile oluşturulan toksisitede B₆ vitamininin koruyucu etki gösterdiği Tunali, 2013 tarafından bulunmuştur. Çalışmamızda B₆ vitamininin kollajenaz enzimini (IC₅₀ = 0.0263 µg/mL) inhibe ettiği saptanmıştır. B₆ vitamininin koruyucu etkisi ile birlikte deride meydana gelen yaşlanmaya bağlı problemleri önleyebileceği söylenebilir.

Çalışmamızda asidler içinde enzimi en düşük konsantrasyonda en düşük oranda laktik asid inhibe etmiştir. Bu da uzun yıllardan beri deri soyma işlemlerinde kullanılan laktik asid ve hidroksi asidlerin antielastaz enzim aktivitesi göstermesi ile ilişkili olabilir.

Hidroksi asidler günümüzde kozmetik ürünlerinde çokça yer almaktadır. Ciltte bulunan ince çizgi ve kırışıklıkların giderilmesinde, cilt gerginliğinin sağlanmasında, porların açılması ve tıkanmaların engellenmesinde, yağlı ve akneli ciltlerde cilt koşullarının iyileştirilmesinde, cilt yüzeyindeki ölü dokuların uzaklaştırılmasında çeşitli hidroksi asidler kullanılmaktadır (Green ve diğ., 2009). Kozmetikte kimyasal olarak deri yenilenmesi işlemi yüzeysel olarak hidroksi asidler ile, orta derinlikte triklorasetik asid ile derinlemesine ise fenol türevi bileşikleri ile yapılmaktadır. Glikolik asid çözeltileri hem derinin üst tabakasını soymakta hem de bir miktar emilerek yeni hücre üretilmesi için ek faydalar sağlamaktadır. Çalışmamızda 0.01 µg/ mL konsantrasyonda glikolik asid kollajenaz enzimini % 47.42 oranında inhibe etmiştir. Kozmetikte de glikolik asidin deri soyma işlemlerinde kullanılmasının nedeninin antikollajenaz etki göstermesi ile ilişkilendirilebilir.

Yaptığımız diğer bir çalışmada glikolik asidin elastaz enzimini de yüksek bir oranda inhibe ettiği bulunmuştur (Göktaş, 2012).

Hidroksi asidlerin antikollajenaz enzim aktivitesi göstermesi nedeni ile uzun zincirli bir yağ asidi olan 2-hidroksi dodekanoik asid bileşiğinin de kollajenaz enzimi üzerinde inhibisyon etkilerini de incelendi. 2-hidroksi dodekanoik asid kollajenaz enzimini 0.01 µg/ mL konsantrasyonda % 45.12 oranında inhibe ettiği bulundu.

3-13-monohidroksi eikozanoik asid ve mono hidroksi tetradekanoik yağ asidlerinin elastaz enzimini inhibe ettiği Sokmen ve diğ. (2012b, 2013) tarafından bulunmuştur. Ayrıca, 3-hidroksi tetradekanoik asidin R.S ve RS şekillerinin kollajenaz enzim inhibitörü olduğu Anabilim Dalımızda yapılan çalışmalarla ilk defa ortaya konulmuştur (Kucuk ve diğ., 2013).

Fenil tridenil karbinollerin R, S, RS enantiomerlerinin antikollajenaz aktivitesine sahip olduğu Yusufoglu ve diğ. (2013) tarafından bulunmuştur. Çalışmamızda da 2-hidroksi dodekanoik asidin kollajenaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

Sitrik asid ve malik asidin kalp iskemi, repüfüzyonunda meydana gelen hasar üzerine koruyucu etki gösterdiği Tang ve diğ., 2013 tarafından bildirilmiştir. Malik asid ve sitrik asidin antiplatelet ve antitrombotik aktiviteye sahip olduğu Zhang ve diğ., (2013a, 2013b) tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Çalışmamızda malik asid kollajenaz enzimini yüksek oranda inhibe etmiştir ($IC_{50} = 0.000109 \mu\text{g/mL}$). Malik asidin kollajenaz enzimini inhibe etmesinin nedeni yapısındaki hidroksi grupları olduğu ileri sürülebilir.

Tartarik asid analoglarının glikojen fosforilaz inhibitörü olduğu (Varga ve diğ., 2013) saptanmıştır. Çalışmamızda tartarik asidin ($IC_{50} = 0.0000232 \mu\text{g/mL}$), vanilik aside ($IC_{50} = 48.55 \mu\text{g/mL}$), sitrik aside ($IC_{50} = 49.09 \mu\text{g/mL}$), azeleik aside ($IC_{50} = 11.60 \mu\text{g/mL}$), kafeik aside ($IC_{50} = 0.342 \mu\text{g/mL}$) ve kumarik aside ($IC_{50} = 4.00 \mu\text{g/mL}$) göre kollajenaz enzimini yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur.

Amino asidler insan organizmasında sağlıklı ciltler ve iyi bir yaşam için gereklidir (Chiu ve Kimball, 2003). Çalışmamızda prolin, sistein amino asidleri ile glisilglisin ve GSH'nin kollajenaz enzimi üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir. Sistein amino asidi 0.01 µg/mL konsantrasyonda % 45.29 oranında enzimi inhibe etmiştir ($IC_{50} = 0.0111 \mu\text{g/mL}$). Glisilglisin dipeptidinin IC_{50} değeri 2.70 µg/mL bulunmuştur. GSH ise

enzimi 0.001 µg/mL konsantrasyonda % 46.27 oranında enzimi inhibe etmiştir ($IC_{50} = 0.00242$ µg/mL). Sistein ve GSH'nin enzimi yüksek oranda inhibe etmesinin sebebinin sistein ve GSH'da serbest SH gruplarının bulunması, bu grupların da enzimi inhibe etmeleridir.

Sistenin inhibisyon etkisi ise 2 şekilde gerçekleşir. İlki yine kalsiyum ile çelat oluşumudur. İkinci şekilde ise inhibisyon geri dönüşümsüz olarak gerçekleşir. Amino asid molekülünün kollajenaz molekülüne direkt saldırısı söz konusudur . Bu inhibisyon tipinde sistein molekülündeki sülfihidril grupları kollajenaz molekülünü sarar. Asetil sistein de, sisteine benzer şekilde çelat oluşturarak inhibitör etkisi gösterir, tek farkı sisteinden daha yüksek konsantrasyonlarda bu etkiyi göstermesidir (Giardina ve diğ., 2010). Bu çalışmada 10^{-4} M sistein çözeltisi kollajenazı % 12 oranında inhibe ederken, bizim yaptığımız çalışmada 10^{-4} µg/mL konsantrasyona sahip sistein çözeltisi kollajenaz enzimini % 41.75 ± 0.80 gibi bir oranla inhibe etmiştir. Yine aynı çalışmada EDTA'nın konsantrasyon değerleri için % 60 ile % 100 arasında değişen inhibisyon değerleri görülmüştür. Bizim yaptığımız çalışmada ise aynı konsantrasyon değerleri için bulunan % inhibisyon değerleri % 14 - 21 arasında değişmektedir.

Galardy ve Grobelny (1983) tarafından glisin, prolin, lösin, fenil ve alanin içeren fosforik ve fosfonik amidlerle yapılan kollajenaz enzimi inhibisyonu denemelerinde glisin, prolin ve alanin içeren fosforik amidlerin $IC_{50} = 14 \pm 6$ µM gibi bir inhibisyon değeriyle bu enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada ise prolin $IC_{50} = 0.0294 \pm 0.0105$ µg/mL, glisilglisin $IC_{50} = 2.70 \pm 0.876$ µg/mL gibi daha düşük IC_{50} değerleri göstermiştir. Ayrıca glutamik asid, sistein ve glisin amino asidlerinden oluşan bir tripeptid olan GSH'nin $IC_{50} = 0.00242 \pm 0.000255$ µg/mL gibi bir değer ile daha iyi bir kollajenaz inhibitörü olduğunu söylenebilir.

Mısır'da firavunların derilerini rejenere etmede ekşimiş süt banyolarını kullandığı belirtilmektedir. Sütte laktik asid bulunur. Laktik asidin süt banyolarında kullanılmasının nedeni ölmüş derilerin rejenere edilmesi içindir. Hidroksi asidlerinin kozmetikte ölü deriyi çıkarma işlemleri için kullanıldığı Yamamoto ve diğ. (2006) ve Green ve diğ., (2009) tarafından açıklanmıştır. Çalışmamızda laktik asid kollajenaz enzimini yüksek oranda ($IC_{50} = 0.00111$ µg/mL) inhibe etmiştir. Deri soyma işleminde

kullanılan laktik asid ve hidroksi asidlerin kullanılmaları antikollajenaz enzim aktivitesi göstermesi nedeni ile olabilir.

Kojik asit, kozmetik endüstrisinde (Puizina-Ivić ve diğ., 2010), cilt beyazlatma maddesi olarak (Chang, 2009) (Saghaie, 2013), gıda endüstrisinde koruyucu olarak (Tao ve diğ., 2013) kullanılacağı öne sürülmüştür. Kojik asidin tirozinaz enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir (Sarkhail ve diğ., 2013). Çalışmamızda kojik asid kollajenaz enzimini yüksek oranda inhibe etmiştir ($IC_{50} = 0.0123 \mu\text{g/mL}$). Bunun nedeni yine kojik asidin yapısında bulunan hidroksi gruplarından dolayı enzimin iyi bir inhibitörü olduğu ileri sürülebilir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda gallik asidin bir çok türevinin analjezik, antialerjik, antikanserojen, antibakteriyel, antihepatotektik ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Göktaş, 2012). Ayrıca gallik asid ve esterleri gıda sanayinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Çalışmamızda gallik asidin kollajenaz enzimini $0.001 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır Gallik asidin $IC_{50} = 0.00137 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Gallik asidin kollajenaz enzimini yüksek oranda inhibe etmesinin nedeni yapısında bulunan hidroksi grupları nedeni ile olabilir.

Ollivier ve diğ. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonlardaki sistein, N-asetil sistein, Na_2EDTA , ve CaNa_2EDTA 'nın korneal kollajenazı tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Na_2EDTA , kollajenaz enzimindeki kalsiyum ile çelat oluşturarak geri dönüşümlü inhibisyona sebep olur, ortama kalsiyum eklendiğinde veya serbest kalsiyum-EDTA kompleksi dializ edildiğinde inhibisyon etkisi ortadan kalkar. CaNa_2EDTA 'nın da inhibisyon mekanizması benzer şekildedir.

Çalışmamızda kateşinin yüksek oranda kollajen enzimini inhibe ettiği görülmüştür. Kateşin antioksidan bir madde olup yapısında hidroksi grubu bulundurmaktadır. Diğer hidroksi grubu içeren bileşiklerde olduğu gibi kateşindeki hidroksi grubunun da kollajenaz enzimi üzerine etkisi olabileceği öne sürülebilir.

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddelerin de kollajenaz enzimi üzerinde inhibitör etkileri bulunmaktadır. Çalışmamızda enzimi yüksek oranda inhibe eden maddelerin kateşin ve rezorsinol olduğu bulunmuştur. Kateşinin kozmetikte de kullanılabileceği Anunciato ve Da Rocha Filho (2012) tarafından bildirilmiştir. Kateşin

bir flavonoid maddesi olup, bu maddenin vücutta oluşan birçok zararı önlediği bildirilmektedir (Kim ve diğ., 2013).

Çalışmamızda kullandığımız bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin tümünün kollajenaz enzimini inhibe ettiği görülmüştür. Yüksek oranda kollajenaz inhibitör etkisi gösteren bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin kollajenaz inhibitörü olarak deri ve diş hastalıklarında ilaç tedavisine ilave olarak kullanımının uygun olabileceği öne sürülebilir. Ancak bu bitki ekstreleri ve kimyasal maddelerin kollajenaz enzim inhibisyonlarının *in vivo* deneylerle de kanıtlanması için ileri düzeyde çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Al-Rejaie, S.S., Aleisa, A.M., Sayed-Ahmed, M.M., Al-Shabanah, O.A., Abuhashish, H.M., Ahmed, M.M., Al-Hosaini, K.A., Hafez, M.M., 2013, Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 136.
- Ali, N., Aleem, U., Ali, Shah, S.W., Shah, I., Junaid, M., Ahmed, G., Ali, W., Ghias, M., 2013, Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity, anthelmintic and relaxant potentials of fruits of *Rubus fruticosus* Agg, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 138.
- Ali-Shtayeh, M.S., Yaniv, Z., Mahajna, J., 2000, Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 221–232.
- Altınışık, M., 2009, Enzimler [online], Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, www.mustafaaltinisik.org.uk
- Amer, M., Maged, M., 2009, Cosmeceuticals versus pharmaceuticals, *Clinics in Dermatology*, 27, 428-430.
- Anunciato, T.P., Da Rocha Filho, P.A., 2012, Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11, 51-54.
- Ancan, M., Öztürk, A., 1999, Enfekte ve açık yaraların sağaltımında kollajenaz enziminin kullanılması üzerine klinik çalışmalar, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15, 155-160.
- Arriaga-Alba, M., Ruiz-Pérez, N.J., Sánchez-Navarrete, J., de Angel, B.L., Flores-Lozada, J., Blasco, J.L., 2013, Antimutagenic evaluation of vitamins B1, B6 and B12 in vitro and in vivo, with the Ames test, *Food and Chemical Toxicology*, 53, 228-234.
- Aslam, M.N., Lansky, E.P., Varani, J., 2006, Pomegranate as a cosmeceutical source: Pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metalloproteinase-1 production in human skin cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 311–318.
- Asman, B., Wijkander, P., Hjerpe, A., 1994, Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium, *Journal of Clinical Periodontology*, 21, 45-47.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B., 2000, Pomegranate juice consumption

- reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062-1076.
- Badr, A.M., El-Demerdash, E., Khalifa, A.E., Ghoneim, A.I., Ayoub, N.A., Abdel-Naim, A.B., 2009, *Rubus sanctus* protects against carbon tetrachloride-induced toxicity in rat isolated hepatocytes: isolation and characterization of its galloylated flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1511-1520.
- Bailly, C., Drèze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapière, C.M., Darmon, M., 1990, Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes, *Journal of Investigative Dermatology*, 94, 47-51.
- Baker, D.H., 1986, Utilization of isomers and analogs of amino acids and other sulfur containing compounds, *Progress in Food and Nutrition Science*, 10, 133-178.
- Baker, D.H., 2006, Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids, *Journal of Nutrition*, 136, 1670-1675.
- Baytop, T., 1994, *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Türk Dil Kurumu S.53.
- Birkedal-Hansen, H., 1987, Catabolism and turnover of collagens: collagenases, *Methods of Enzymology*, 144, 140-171.
- Bornstein, P., Piez, K.A., 1964, A Biochemical study of human skin collagen and the relation between intra and intermolecular cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, 43, 1813-1823.
- Brown, P.D., 1998, Matrix metalloproteinase inhibitors, *Angiogenesis*, 1, 142-154.
- Calvin, M., 1998, Cutaneous wound healing, *Wounds*, 10, 12-32.
- Can, A., Akev, N., 2008, *Eczacılık Fakültesi Öğrencileri için Biokimya Dersleri*, İstanbul Üniversitesi Yayınları Yayın No: 4776, ISBN 978-975-404-820-9.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 2005, Globular and fibrous proteins. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, 2nd Ed., pp: 25-44, Lippincott-Raven.
- Chang, T.S., 2009, An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440-2475.
- Chiu, A., Kimball, A.B., 2003, Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage, *British Journal of Dermatology*, 149, 681-691.
- Choi, J.S., Ha, Y.M., Joo, C.U., Cho, K.K., Kim, S.J., Choi, I.S., 2012, Inhibition of oral pathogens and collagenase activity by seaweed extracts, *Journal of Environmental Biology*, 33, 115-121.
- Conforti, F., Marcotullio, M.C., Menichini, F., Statti, G.A., Vannutelli, L., Burini, G., Menichini, F., Curini, M., 2011, The influence of collection zone on

- glucosinolates, polyphenols and flavonoids contents and biological profiles of *Capparis sicula* ssp. *Sicula*, *Food Science and Technology International*, 17, 87-97.
- Çepel, S., 2011, *Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Çomoğlu, T., 2012, Kozmetikler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 1-8.
- Debnath, P., Dey, P., Chanda, A., Bhakta, T., 2012, A Survey on pineapple and its medicinal value, *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 1, 24-29.
- Demirci, B., Demirci, F., Baser, K.H.C., 2003, Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* (Scop.) from Turkey, *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 43-44.
- De la Cruz, A.A., Hilbert, G., Mengin, V., Rivière, C., Ollat, N., Vitrac, C., Bordenave, L., Decroocq, S., Delaunay, J.C., Mérillon, J.M., Monti, J.P., Gomès, E., Richard, T., 2013, Anthocyanin phytochemical profiles and anti-oxidant activities of *Vitis candicans* and *Vitis doaniana*, *Phytochemical Analysis*, 24, 446-452.
- Diegelmann, R.F., 2001, Collagen metabolism, *Wounds*, 13, 177-182.
- Diegelmann, R.F., Evans, M.C., 2004, Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Frontiers in Bioscience*, 9, 283-289.
- Doğan, B., Yilmaz, G., Fentoglu, O., Kirzioglu, F.Y., 2010, Antioksidan vitaminlerin peridontal sağlıktaki rolü, *S.D.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* Cilt 1, Sayı 2, 133-141.
- Donahue, T.R., Hiatt, J.R., Busuttil, R.W., 2006, Collagenase and surgical disease, *Hernia*, 10, 478-485.
- Engin, A., 2004, Yara iyileşmesi, *Temel Cerrahi*. Edited by Sayek, İ., 3. Baskı, 266-277, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yeşilada, E., 2003, Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 123-129.
- Erez, E., Fass, D., Bibi, E., 2009, How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane, *Nature*, 459, 371-378.
- Ernst, E., 2000, The usage of complementary therapies by dermatology patients: a systematic review, *British Journal of Dermatology*, 142, 857-861.
- Ersöz, T., 2012, Bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri ile ilgili genel yaklaşım ve sorunlar, *Mised*, 27-28, 11-21.

- Farzaei, M.H., Shams-Ardekani, M.R., Abbasabadi, Z., Rahimi, R., 2013, Scientific evaluation of edible fruits and spices used for the treatment of peptic ulcer in traditional Iranian medicine, *ISRN Gastroenterolgy*, 2013, 136932.
- Florczak-Rzepka, M., Grond-Ginsbach, C., Montaner, J., Steiner, T., 2012, Matriks metalloproteinase in human spontaneous intracerebral hemorrhage: An Update, *Cerebrovascular Disease*, 34, 249-262.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J., 2010, Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evalution of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion, *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 596-601.
- Friedman, M., 1996, Food browning and its prevention: an overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Galaray, R.E., Grobelny, D., 1983, Inhibition of collagenase from *Clostridium histolyticum* by phosphoric and phosphonic amides, *Biochemistry*, 22, 4556-4561.
- Galis, Z.S., Khatri, J.J., 2002, Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly, *Circulation Research*, 90, 251-262.
- Giardina, S., Michelotti, A., Zavattini, G., Finzi, S., Ghisalberti, C., Marzatico, F., 2010, Efficacy study in vitro: assessment of the properties of resveratrol and resveratrol + N-acetyl-cysteine on proliferation and inhibition of collagen activity, *Minevra Ginecologica*, 62, 195-201.
- Green, B., Yu, R.J., Van Scott, E.J., 2009, Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids, *Clinics in Dermatology*, 27, 495-501.
- Göktas, H., 2012, *Elastaz Enzim İnhibitörleri*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Ensititüsü.
- Golub, L.M., Lee, H.M., Ryan, M.E., Giannobile, W.V., Payne, J., Sorsa, T., 1998, Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple bob-antimicrobial mechanisms, *Advances in Dental Research*, 12, 12-26.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P., 2002, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 1, 15-32.
- Gürdol, F., Ademoglu, E., 2006, *Biyokimya*; ISBN: 957-420-462-4, Nobel Tıp Kitapevleri Istanbul.
- Heinze, C.D., Clem, M.F. 1988, Wound healing and tissue repair. In: *Textbook of Large Animal Surgery*. 2nd Ed., Edited by Oehme, F.W., 141-153 Williams & Wilkins USA.

- Hemmati, A.A., Aghel, N., Rashidi, I., Gholampur-Aghdami, A., 2011, Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit, *International Wound of Journal*, 8, 514-520.
- Hidalgo, M., Pierson, A.S., Holden, S.N., Bergen, M., Eckhardt, S.G., 2001, Therapeutic angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer, *Advances in Internal Medicine*, 47, 159-190.
- Hsiao, P.C., Liaw, C.C., Hwang, S.Y., Cheng, H.L., Zhang, L.J., Shen, C.C., Hsu, F.L., Kuo, Y.H., 2013, Antiproliferative and hypoglycemic cucurbitane-type glycosides from the fruits of *Momordica charantia*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2979-2986.
- Ibrahim, T.A., El-Hefnawy, H.M., El-Hela, A.A., 2010, Antioxidant potential and phenolic acid content of certain cucurbitaceous plants cultivated in Egypt, *Natural Products Research*, 16, 1537-1545.
- İlçim, A., Dıgırak, M., 1998, Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması, *Turkish Journal of Biology*, 22, 119-125.
- Ivanova, D., Gerova, T., Chervenkov, T., Yankova, T., 2005, Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 145-150.
- Javed, H., Khan, M.M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M.E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2012, Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type, *Neuroscience*, 210, 340-352.
- Jenkins, G., 2002, Molecular mechanism of skin ageing, *Mechanism of Ageing and Development*, 123, 801-810.
- Kamalakkannan, N., Stanely Mainzen Prince, P., 2006, Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 293, 211-219.
- Khan, M.M., Raza, S.S., Javed, H., Ahmad, A., Khan, A., Islam, F., Safhi, M.M., Islam, F., 2012, Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease, *Neurotoxicity Research*, 22, 1-15.
- Khayat Nouri, M.H., Namvaran Abbas Abad, A., 2013, Comparative study of tomato and tomato paste supplementation on the level of serum lipids and lipoproteins levels in rats fed with high cholesterol, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15, 287-291.
- Kapucu, E., Kahveci, H., Susam, Ö., Çanta, Y., 2010, İlaçların ve kozmetik ürünlerin geliştirilme süreçleri ve doğa üzerine etkileri, 1-33.

- Kikuchi, T., Zhang, J., Huang, Y., Watanabe, K., Ishii, K., Yamamoto, A., Fukatsu, M., Tanaka, R., Akihisa, T., 2012, Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Momordica charantia*, *Chemistry & Biodiversity*, 9, 1221-1230.
- Kim, W.S., Yang, Y.J., Song, M.G., Lee, J.S., Park, K.Y., Kim, J.J., Sung, J.H., Choi, J.S., Cha, H.J., 2010, Accelerated wound healing by S-methylmethionine sulfonium: Evidence of dermal fibroblast activation via the ERK $\frac{1}{2}$ pathway, *Pharmacology*, 85, 68-76.
- Kim, S.J., Li, M., Jeong, C.W., Bae, H.B., Kwak, S.H., Lee, S.H., Lee, H.J., Heo, B.H., Yook, K.B., Yoo, K.Y., 2013, Epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, protects the heart against regional ischemia-reperfusion injuries through activation of RISK survival pathways in rats, *Archives of Pharmacal Research* (in press).
- Kopinski, J.S., Fogarty, R., Mcveigh, J., 2007, Effect of S-methylmethionine sulphonium chloride on oesophagogastric ulcers in pigs, *Australian Veterinary Journal*, 85, 362-367.
- Kucuk, H.B., Sacan, O., Yusufoglu, A., Yanardag, R., 2013, Effect of chirality of 3-hydroxy tetradecanoic acid enantiomers on skin diseases related enzymes, *FEBS Journal* 280, 329-329.
- Kuete, V., Wiench, B., Hegazy, M.E., Mohamed, T.A., Fankam, A.G., Shahat, A.A., Efferth, T., 2012, Antibacterial activity and cytotoxicity of selected Egyptian medicinal plants, *Planta Medica*, 78, 193-199.
- Kumar, R. V., Chauhan, S., 2008, Mulberry: Life enhancer, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2, 271-278.
- Lee, M.E., Kim, S.R., Lee, S., Jung, Y.J., Choi, S.S., Kim, W.J., Han, J.A., 2012, Cyclooxygenase-2 inhibitors modulate skin aging in a catalytic activity-independent manner, *Experimental and Molecular Medicine*, 44, 536-544.
- Lo, H.M., Wang, S.W., Chen, C.L., Wu, P.H., Wu, W.B., 2013, Effects of all-trans retinoic acid, retinol, and β -carotene on murine macrophage activity, *Food & Function*, 5, 140-148.
- MacLennan, J. D., Mandl, I., Howes, E. L., 1953, Bacterial digestion of collagen, *Journal of Clinical Investigation*, 32, 1317-1322.
- Madison, K.C., 2003, Barrier function of the skin: "La Raison d'Être" of the epidermis, *Journal of Investigative Dermatology*, 121, 231-241.
- Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T., Otake, S., 1993, Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity, *Journal of Periodontology*, 64, 630-636.
- Mantle, D., Eddeb, F., Pickering, A.T., 2000, Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro, *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 47-51.

- Masuda, M., Murata, K., Naruto, S., Uwaya, A., Isami, F., Matsuda, H., 2012, Matrix metalloproteinase-1 inhibitory activities of *Morinda citrifolia* seed extract and its constituents in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35, 210-215.
- Mathisen, B., Loennechen, T., Gedde-Dahl, T., Winberg J.O., 2006, Fibroblast heterogeneity in collagenolytic response to colchicine, *Biochemical Pharmacology*, 71, 574-583.
- Matić S, Stanić S, Bogojević D, Vidaković M, Grdović N, Dinić S, Solujić S, Mladenović M, Stanković N, Mihailović M., 2013, Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury, *Mutation Research*, 755, 81-89.
- Melendez-Martinez, A.J., Nascimento, A.F., Wang, Y., Liu, C., Mao, Y., Wang, X.D., 2013, Effect of tomato extract supplementation against high-fat diet-induced hepatic lesions, *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 2, 198-208.
- Meng, Y., Liu, S., Li, J., Meng, Y., Zhao, X., 2012, Preparation of an antitumor and antiviral agent: chemical modification of α -MMC and MAP30 from *Momordica Charantia* L. with covalent conjugation of polyethylene glycol, *International Journal of Medicine*, 7, 3133-3142.
- Mevlitoğlu, İ, Engin, B., Kaplan, M., 2009, Yaşlanmayı geciktiren ürünler ne kadar etkili ?, *Türkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi*, 43, 2-6.
- Moon, H.I., Kim, T.I., Cho, H.S., Kim, E.K., 2010, Identification of potential and selective collagenase, gelatinase inhibitors from *Crataegus pinnatifida*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 991-993.
- Mookhtiar, K.A., Van Wart, H.E., 1992, Clostridium histolyticum collagenases: a new look at some old enzymes, *Matrix Supplement*, 1, 116-126.
- Nema, N.K., Maity, N., Sarkar, B., Mukherjee, P.K., 2011, Cucumis sativus fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase and anti-elastase agent, *Archives of Dermatological Research*, 303, 247-252.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, The three dimensional structure of protein. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Ed., pp: 116-156, WH Freeman and Company, New York.
- Ohtsuki, T., Yokosawa. E., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Toida, T., Ishibashi, M., 2008, Quinic acid esters from *Pluchea indica* with collagenase, MMP-2 and MMP-9 inhibitory activities. *Phytotherapy Research*, 22, 264-266.
- Ollivier, F.J., Brooks, D.E., Kallberg, M.E., Komaromy, A.M., Lassaline, M.E., Andrew, S.E., Gelatt, K.N., Stevens, G.R., Blalock, T.D., van Setten, G.B., Schultz, G.S., 2003, Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix

- metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis, *American Journal of Veterinary Research*, 64, 1081-1087.
- Oncel, M., 2012, Matriks metalloproteazlar ve kanser, *European Journal of Basic Medicinal Sciences*, 2, 91-100.
- Orbison, J.L., Peters, E., 1953, Failure of rutin and catechin to affect vascular lesions of experimental hypertension or hypersensitivity, *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 83, 173-175.
- Öner, J., Öner, H., 2013, Gebelikte matriks metalloproteinazlar (MMP) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP), *Selçuk Tıp Dergisi*, 29, 95-99.
- Park, J., Boo, Y.C., 2013, Isolation of resveratrol from *Vitis viniferae* caulis and its potent inhibition of human tyrosinase, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2013, 645257.
- Parks, W.C., 1999, Matrix metalloproteinases in repair, *Wound Repair and Regeneration*, 7, 423-432.
- Pasternak, B., Aspenberg, P., 2009, Metalloproteinases and their inhibitors-diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics, *Acta Orthopaedica*, 80, 693-703.
- Pekin, B., 1979, *Biyokimya Mühendisliği Temel İlkeler*, Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayın No:3
- Porter, C.T., Bartlett, G.J., Thornton, J.M., 2004, The catalytic site atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data, *Nucleic Acids Research*, 32, 129-133.
- Puizina-Ivić, N., Miric, L., Carija, A., Karlica, D., Marasovic, D., 2010, Modern approach to topical treatment of aging skin. *Collegium Antropologicum*, 34, 1145-1153.
- Pryczynicz, A., Gryko, M., Niewiarowska, K., Dymicka-Piekarska, V., Ustymowicz, M., Hawryluk, M., Cepowicz, D., Borsuk, A., Kemon, A., Famulski, W., Guzinska-Ustymowicz, K., 2013, Immunohistochemical expression of MMP-7 protein and its serum level in colorectal cancer, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 51, 206-212.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 3, 597-635.
- Reiser, K.M., 1993, Nonenzymatic glycation and enzymatic crosslinking in a model of wound healing: The effects of aging, diet and modulating agents, *Journal of Geriatric Dermatology*, 1, 90-99.
- Rigler, D.J., 1997, Inflammation and repair. *Veterinary Pathology*, 6nd Ed., Edited by Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W., pp: 150-157.

- Rittie, L., Fischer, G.J. 2002, UV light induced signal cascades and skin ageing, *Ageing Research Reviews*, 1, 705-720.
- Robertson, W.V., 1964, Metabolism of collagen in mammalian tissues, *Biophysical Journal*, 4, 93-106.
- Romagnolo, D.F., Davis, C.D., Milner, J.A., 2012, Phytoalexins in cancer prevention, *Frontiers in Biosciences*, 17, 2035-2058.
- Saghaie, L., Pourfarzam, M., Fassihi, A., Sartippour, B., 2013, Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8, 233-242.
- Sarkhail, P., Sarkheil, P., Khalighi-Sigaroodi, F., Shafiee, A., Ostad, N., 2013, Tyrosinase inhibitor and radical scavenger fractions and isolated compound from aerial parts of *Peucedanum knappii* Bornm, *Natural Product Research*, 27, 896-9.
- Senanayake, G.V., Fukuda, N., Nshizono, S., Wang, Y.M., Nagao, K., Yanagita, T., Iwamoto, M., Ohta, H., 2012, Mechanisms underlying decreased hepatic triacylglycerol and cholesterol by dietary bitter melon extract in the rat, *Lipids*, 47, 495-503.
- Senturk, N., Keles Cayır, G., Kaymaz., F., Yildiz, L., Acıkgöz, G., Turanlı, A.Y., 2002, Deneysel latirizm modelinde doksisisiklinin kollajen yapısı üzerine olan etkilerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi, *Dermatoloji ve Zührevi Hastalıkları Derneği Dergi*, 36, 248-252.
- Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Özcan, M.M., Arslan, D., 2008, Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 643-651.
- Shivashankara, A.R., Azmidah, A., Haniadka, R., Rai, M.P., Arora, R., Baliga, M.S., 2012, Dietary agents in the prevention of alcohol-induced hepatotoxicity: preclinical observations, *Food & Function*, 3, 101-109.
- Silberstein, T., Silberstein, E., Saphier, O., 2013, Lycopene and tomatoes--their effect on prevention of prostatic cancer, *Harefuah*, 152, 461-3, 499.
- Sin, B.Y., Kim, H.P., 2005, Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids, *Archives of Pharmacol Research*, 28, 1152-1155.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., Ruberto, G., 2011, Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12453-12459.
- Sokmen, B.B., Tunali, S., Yanardag, R., 2012a, Effects of vitamin U (S-methyl methionine sulphonium chloride) on valproic acid induced liver injury in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3562-3566.

- Sokmen, B.B., Celik Onar, H., Yusufoglu, A., Yanardag, R., 2012b, Anti-elastase, anti-urease and antioxidant activities of (3-13)-monohydroxyeicosanoic acid isomers, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77, 1353-1361.
- Sokmen, B.B., Hasdemir, B., Yusufoglu, A., Yanardag, R., 2013, Some monohydroxy tetradecanoic acid isomers as novel urease and elastase inhibitors and as new antioxidants, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, doi 10.1007/s12010-013-0595-2.
- Stashak, T.S., 1991, Principles of wound healing. *Equine Wound Management*, pp: 1-15, Lea& Febiger, Malvern, Philadelphia.
- Stücker, M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgärtl, H., Lübbers, D.W., 2002, The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis, *Journal of Physiology*, 538, 985-994.
- Sumantran, V.N., Kulkarni, A.A., Harsulkar, A., Wele, A., Koppikar, S.J., Chandwaskar, R., Gaire, V., Dalvi, M., Wagh, U.V., 2007, Hyaluronidase and collagenase inhibitory activities of the herbal formulation *Triphala guggulu*, *Journal of Biosciences*, 32, 755-761.
- Suntar I, Koca U, Keles H, Akkol E.K., 2011, Wound healing activity of *Rubus sanctus* Schreber (Rosaceae): Preclinical study in animal models, *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 2011, 816156.
- Tane, N., Takeda, T., Shioji, T., Ohyama, H., Itoh, H., 1976, Effect of vitamin B6 deficiency on collagen metabolism in rats, *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 22, 105-114.
- Tang, X., Liu, J., Dong, W., Li, P., Li, L., Lin, C., Zheng, Y., Hou, J., Li, D., 2013, The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 820695.
- Tao, Y.M., Yao, L.Y., Qin, Q.Y., Shen, W., 2013, Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Bulbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12662-12669.
- Tekman, Ş., Öner, N., 1981, *Genel Biyokimya*, üçüncü baskı, Fatih Yayınevi – İstanbul, 351-367.
- Tetsuhiro, N., Keita, T., Yasuaki, G., Saori, G., Naoki, T., Kaeko, K., Masatoshi, I., Saburo, H., Akinori, A., Takeshi, K., Hazhiro, S., 2007, Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide peptide fibril formation and neurotoxicity, *Neurology Report*, 18, 813-816.
- Thring, T.S.A., Hili, P., Naughton, D.P., 2009, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants., *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9-27.

- Tlili, N., Khaldi, A., Triki, S., Munné-Bosch, S., 2010, Phenolic compounds and vitamin antioxidants of caper (*Capparis spinosa*), *Plants Foods for Human Nutrition*, 65, 260-265.
- Tlili, N., Elfalleh, W., Saadaoui, E., Khaldi, A., Triki, S., Nasri, N., 2011, The caper (*Capparis L.*): ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties, *Fitoterapia*, 82, 93-101.
- Tunali, S., 2013, The effects of vitamin B6 on lens antioxidant system in valproic acid-administered rats, *Human & Experimental Toxicology*, doi: 10.1177/0960327113506233.
- Tüzün, C., 1997, *Biyokimya*, üçüncü baskı, Palme Yayınları –Ankara, pp: 124-125.
- Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J., Wang, Z., Datta, S.C., Fisher, G. J., Voorhees, J. J, 2000, Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin, *Journal of Investigative Dermatology*, 114, 480–486.
- Varga, G., Docsa, T., Gergely, P., Juhász, L., Somsák, L., 2013, Synthesis of tartaric acid analogues of FR258900 and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 1789-1792.
- Verma, S., Singh, A., Mishra, A., 2013, Gallic acid: molecular rival of cancer, *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 35, 473-485.
- Visse, R., Nagase, H., 2003, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circulation Research*, 92, 827-39.
- Waldorf, H., Fewkes, 1995, Wound Healing, *Advances in Dermatology*, 10, 77-96.
- Walsh, R., 2012, Alternative perspectives of enzyme kinetic modeling. *Medicinal Chemistry and Drug Design*, Canada, ISBN 978-953-51-0513-8
- Wang, S., Zhu, F., Meckling, K.A., Marcone, M.F., 2013, Antioxidant capacity of food mixtures is not correlated with their antiproliferative activity against mcf-7 breast cancer cells, *Journal of Medicinal Food*, 16, 1138-1145.
- Woolley, D.E., Roberts, D.R., Evanson, J.M., 1975, Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66, 747-754.
- Yan, K.H., Lee, L.M., Yan, S.H., Huang, H.C., Li, C.C., Lin, H.T., Chen, P.S., 2013, Tomatidine inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cell A549 by reducing matrix metalloproteinases expression, *Chemico-Biological Interactions*, 203, 580-587.

- Yamamoto, Y., Uede, K., Yonei, N., Kishioka, A., Ohtani, T., Furukawa. 2006, Effects of alpha-hydroxy acids on the human skin of Japanese subjects: The rationale for chemical peeling, *Journal of Dermatology*, 1, 16-22.
- Yusufoglu, A., Sacan, O., Yildiz, T., Yanardag, R., 2013, (R)-, (S)- and (R,S)-Phenyl tridecyl carbinols exhibit antielastase and anticollagenase activities, *FEBS Journal* 280, 328-328.
- Zhang, H., Chang, M., Hansen, C.N., Basso D.M., Noble-Haeusslein, L. J., 2011, Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury. *Neurotherapeutics*, 8, 206-220.
- Zhang, J., Huang, Y., Kikuchi, T., Tokuda, H., Suzuki, N., Inafuku, K., Miura, M., Motohashi S, Suzuki T, Akihisa T., 2012, Cucurbitane triterpenoids from the leaves of *Momordica charantia*, and their cancer chemopreventive effects and cytotoxicities, *Chemistry & Biodiversity*, 9, 428-440.
- Zhang, Q.C., Zhao, Y., Bian H.M., 2013a, Anti-Thrombotic effect of a novel formula from Corni Fructus with malic acid, succinic acid and citric acid, *Phytoteraphy Research*, doi: 10.1002/ptr.5052.
- Zhang, Q.C., Zhao, Y., Bian H.M., 2013b, Antiplatelet activity of a novel formula composed of malic acid, succinic acid and citric acid from *Cornus officinalis* fruit, *Phytoteraphy Research*, doi: 10.1002/ptr.4934.
- Zheng, Z. P., Cheng, K. W., Zhu, Q., Wang, X. C., Lin, Z. X., Wang, M., 2010, Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: A structure-activity relationship study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5368–5373.

<http://selliogfenci.blogspot.com/2012/05/derimiz-ve-yaps.html>

<http://www.joint-muscle-relief.com/how-to-build-collagen.html>

http://tr.wikipedia.org/wiki/Kollajen_heliks

<http://www.biyolojidersnotlari.com/cgi-sys/suspendedpage.cgi>

http://tr.wikibooks.org/wiki/Dosya:Bir_substrat.svg

<http://tr.wikibooks.org/wiki/Biyokimya/Kataliz>

ÖZGEÇMİŞ

Fotoğraf

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Gizem Sinanoğlu
Uyruğu	TC
Doğum tarihi, Yeri	10.07.1986
Telefon	0555 5579348
E-mail	gizgizems@hotmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Anabilim Dalı / Biyokimya Programı	2013
Lisans	İ. Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü	2010
Lise	İstanbul (Erkek) Lisesi	2005

Makaleler / Bildiriler

Kongreler

A- Yurt Dışı Kongreler

Sinanoglu, G., Tunali, S., Yanardag, R., 2011, Alpha glucosidase, aldose reductase inhibition and antioxidant activity of *Ornithogalum sigmoideum* Freyn et Sint. *The 2nd Euro-Mediterranean Conference Plant Natural Products: From Biodiversity to Bioindustry, Alexandria, Egypt, 11-13 December*, P88.

Sinanoglu, G., Sacan, O., Yanardag, R., 2012, Elastase inhibitory activities of various plant oils. <i>International Symposium On Enviromental Impacts Health Implications And Therapeutic Approaches, ISEHT, Nellore, India, 15-17 July, HT29.</i>