



**ASTRAGALUS BRACHYCALYX FISCHER BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE DİYABETLİ RATLARIN BÖBREK
DOKULARINDA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ İLE ALFA GLİKOZİDAZ VE ALFA
AMİLAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hazırlayan: Cihan KARA

Danışman: Doç. Dr. Fikret TÜRKAN

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

İĞDIR 2023

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
IĞDIR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ASTRAGALUS BRACHYCALYX FISCHER BİTKİSİNİN ANTiOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE DİYABETLİ RATLARIN BÖBREK
DOKULARINDA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ İLE ALFA GLİKOZİDAZ VE ALFA
AMİLAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Hazırlayan: Cihan KARA

Danışman: Doç. Dr. Fikret TÜRKAN

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

IĞDIR 2023

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Cihan KARA



ÖZET

ASTRAGALUS BRACHYCALYX FISCHER BİTKİSİNİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE DİYABETLİ RATLARIN BÖBREK DOKULARINDA İYİLEŞTİRİCİ ETKİSİ İLE ALFA GLİKOZİDAZ VE ALFA AMİLAZ ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KARA,Cihan

Yüksek Lisans Tezi

BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Fikret TÜRKAN

Ocak-2023, 46 Sayfa

Bu tez çalışmasında *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının α -glikozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Standart inhibitör olarak Akarboz molekülü kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının ve Akarboz molekülünün α -glikozidaz enzimi inhibisyonu üzerine IC_{50} değerleri sırasıyla; 12,84 mg/L ve 19,25 mg/mL hesaplandı. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının ve Akarboz molekülünün α -amilaz enzimi inhibisyonu üzerine IC_{50} değerleri sırasıyla; 13,59 mg/mL ve 18,73 mg/mL bulundu. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının antioksidan kapasitesini belirlemek için; ABTS^{•+} süpürücü etkisi, ferrik iyonları (Fe^{+2}), bakır iyonları (Cu^{+2}) indirgeme yetenekleri ve DPPH• indirgeme kapasitesi metodları uygulandı. Karşılaştırmak için standart antioksidanlar; Askorbik Asit, BHA, BHT ve α -Tokoferol kullanıldı. Elde edilen veriler sonucunda bitki kök ekstratının yüksek düzeyde antioksidan etki gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmanın diğer basamağında STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının böbrek dokusunda oluşan dilatasyon ve dejenerasyonları iyileştirdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus brachycalyx* Fischer, α -Glikozidaz, α -Amilaz, Diyabet, Antioksidan.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *ASTRAGALUS BRACHYCALYX* FISCHER PLANT, INVESTIGATION OF HEALING EFFECT ON RENAL TISSUES OF DIABETIC RATS AND ON ALPHA GLUCOSIDASE AND ALPHA AMYLASE ENZYME ACTIVITIES

KARA, Cihan

Master's Thesis

Department Of Bioengineering and Sciences

Advisor: Assoc. Dr. Fikret TURKAN

January-2023 46 Pages

This thesis study investigated the inhibition effects of *Astragalus brachycalyx* Fischer plant root extract on α -glucosidase and α -amylase enzymes. IC_{50} values were calculated using the Acarbose molecule as the standard inhibitor. IC_{50} values of *Astragalus brachycalyx* Fischer plant root extract and Acarbose molecule on inhibition of α -glucosidase enzyme were respectively; 12.84 mg/L and 19.25 mg/mL were calculated. IC_{50} values of *Astragalus brachycalyx* Fischer plant root extract and Acarbose molecule on inhibition of α -amylase enzyme were respectively; 13.59 mg/mL and 18.73 mg/mL found. To determine the antioxidant capacity of the root extract of *Astragalus brachycalyx* Fischer, ABTS^{•+} scavenging effect, ferric ions (Fe⁺²), copper ions (Cu⁺²) reducing abilities, and DPPH[•] reducing capacity methods were applied. Standard antioxidants were used to compare; Ascorbic Acid, BHA, BHT, and α -Tocopherol. As a result of the data obtained, it was observed that the plant root extract showed a high level of antioxidant effect. In the other step of the study, it was observed that the root extract of the *Astragalus brachycalyx* Fischer plant improved the dilatation and degenerations in the kidney tissue in rats with diabetes mellitus with STZ.

Keywords: *Astragalus brachycalyx* Fischer, α -Glycosidase, α -Amylase, Diabetes Mellitus, Antioxidant.

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım esnasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirilerinden yararlandığım ve her ihtiyaç duyduğumda fedakarca yanımda olan saygıdeğer danışmanım Sayın **Doç. Dr. Fikret TÜRKAN**'a teşekkür ederim. İğdır Üniversitesi öğretim üyesi **Doç. Dr. Mehmet Nuri ATALAR**'a, **Dr. Öğr. Üyesi Abdülmelik ARAS**'a ve tüm ALUM personeline, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanları ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Zübeyir HUYUT**'a, Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Fikret ALTINDAĞ**'a, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Kenan YILDIZHAN**'a, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KELEŞ**'e ve bugüne kadar destekleriyle beni yalnız bırakmayan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmayı SHY0720A19 numara ile maddi olarak destekleyen, İğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na ayrıca teşekkür ederim.

Cihan KARA

İĞDIR/2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet	1
1.1.1. Diyabet Tipleri.....	2
1.1.1.1. Tip 1 Diyabet	2
1.1.1.2. Tip 2 Diyabet	2
1.1.1.3. Gestasyonel Diyabet	3
1.2. Serbest Radikaller.....	3
1.3. Antioksidanlar	4
1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	4
1.3.2. Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi	4
1.3.3. Antioksidan Aktiviteyi Belirleyen Kimyasal Testler	5
1.3.3.1. Hidrojen Atomunun Transferine Dayalı Testler (HAT)	5
1.3.3.2. Tek Elektron Transferine Dayalı Testler (SET).....	5
1.3.3.3. Karma Mod Testleri (HAT / SET).....	6
1.4. Enzimler	6
1.4.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	7
1.4.2.1. Enzim Aktiflik Birimleri.....	8
1.4.2.2. Enzim Aktivitesi	8
1.4.2.3. Enzim Ünitesi (EÜ).....	8
1.4.2.4. Katal	8
1.4.2.5. Spesifik Aktivite	8

1.4.2.6. Turnover Sayısı (Molar Aktivite)	8
1.4.3. Enzim İnhibisyonu.....	8
1.4.3.1. Geriye Dönüşümlü (reversibl) İnhibisyonlar	9
1.4.3.1.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon	9
1.4.3.1.2. Yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon.....	9
1.4.3.1.3. Yarı Yarışmalı (unkompetitif) İnhibisyon.....	9
1.4.4. Alfa-Glikozidaz Enzimi.....	9
1.4.5. Alfa-Amilaz Enzimi	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	12
3. MATERYAL ve METOT	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması	14
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	14
3.1.3. Kullanılan Enzimler.....	15
3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	15
3.1.5. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	15
3.1.6. α -Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	16
3.1.7. İnhibitör Çözeltilerin hazırlanması	16
3.2. Metod.....	16
3.2.1. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	16
3.2.1.1. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini	16
3.2.1.2. α -Amilaz Enziminin Aktivite Tayini	17
3.2.1.3. Total İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler (FRAP)	17
3.2.1.4. KUPRAK Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler.....	17
3.2.1.5. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler.....	18
3.2.1.6. ABTS ⁺ Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler.....	18
3.2.1.7. Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kapasitesi (Kuprakmetodu).....	18
3.2.1.8. FRAP Yöntemi ile İndirgeme Aktivitesi	19
3.2.1.9. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi	19

3.2.1.10. 2,2-Azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonikasit) (ABTS) Radikal Giderme Aktivitesi.....	19
3.2.2. Deneysel Muamele	20
3.2.3. Böbrek Dokusu Histopatolojik Değerlendirilmesi Gereç ve Yöntem	20
3.2.4. Böbrek α -glukosidaz ve α -amilaz aktivitesinin tayini	21
4. BULGULAR	22
4.1 α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzim İnhibisyonu İle İlgili Araştırma Bulguları	22
4.2. Antioksidan Çalışmaları İle İlgili Araştırma Bulguları	26
4.2.1. Cu^{2+} - Cu^{+} İndirgeme Kuvveti (KUPRAK metodu) Bulguları.....	26
4.2.2. Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Bulguları	27
4.2.3. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları	28
4.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları.....	29
4.3. Böbrek Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi Bulguları.....	30
4.4. Böbrek Dokusunda α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzim Aktivasyon Bulguları	33
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
KAYNAKÇA	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%.....	Yüzde
G.....	Gram
µl.....	Mikrolitre
µM.....	Mikromolar
Kg.....	Kilogram
M.....	Molar
mg.....	Miligram
°C.....	Santigrat Derece
pH.....	Hidrojen iyonu konsantrasyonu

Kısaltmalar

ABTS'S.....	2,2'-Azino- bis (3-etilenzotiyazolin -6- sülfanik asit radikali
ABTS.....	2,2'-Azino- bis (3-etilenzotiyazolin -6- sülfanik asit
BHA.....	Bitülenmiş hidroksianisol
BHT.....	Bitülenmiş hidroksitoluen
DPPH.....	1,1-Difenil 2-pikril hidroliz
DPPH-H.....	1,1-Difenil 2-pikril hidroliz radikali
STZ.....	Streptozosin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Antioksidanların Sınıflandırılması (Wotton, 2011).....	4
Şekil 1.2 α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzimlerin Etki Mekanizmaları (Taslimi, 2017)..	10
Şekil 4.1. α - Glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite – [ABKE] grafiği.....	22
Şekil 4.2. α - Glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine Akarboz molekülünün farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite – [Akarboz] grafiği.....	23
Şekil 4.3. α - Amilaz enzimi aktivitesi üzerine <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisiin kök ekstratının farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite – [ABKE] grafiği.....	24
Şekil 4.4. α - Amilaz enzimi aktivitesi üzerine ABKE'nin farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite – [Akarboz] grafiği.....	25
Şekil 4.5. <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 $\mu\text{g/mL}$) KUPRAK metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması.....	27
Şekil 4.6. <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (10 – 20 – 30 $\mu\text{g/mL}$) FRAP metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması.....	28
Şekil 4.7. <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 $\mu\text{g/mL}$) DPPH metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA, BHA ve α -Tokoferol) ile kıyaslanması.....	29
Şekil 4.8. <i>Astragalus brachycalyx</i> Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 $\mu\text{g/mL}$) ABTS metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması.....	29
Şekil 4.9. NK grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü.....	30
Şekil 4.10. DK grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü (Tübüler dilatasyon (ok), Vasküler dilatasyon (kesikli ok), tübüler dejenerasyon (okbaşı)).....	31
Şekil 4.11. DA grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü.....	31
Şekil 4.12. DAB-1 grubu böbrek dokusunun histolojik görünümü.....	32
Şekil 4.13. DAB-2 grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü.....	32
Şekil 4.14. Böbrek dokusundaki α -glikozidaz enzimi aktivasyon değerleri.....	34
Şekil 4.15. Böbrek dokusundaki α -amilaz enzimi aktivasyon değerleri.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

- Çizelge 4.1.** α - Glikozidaz enzimi üzerine Astragalus brachycalyx Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları22
- Çizelge 4.2.** α - Glikosidaz enzimi üzerine Akarboz molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları23
- Çizelge 4.3.** α - Amilaz enzimi üzerine Astragalus brachycalyx Fischer bitkisinin kök ekstratının IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları24
- Çizelge 4.4.** α - Amilaz enzimi üzerine Akarboz molekülünün IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları25
- Çizelge 4.5.** α -Glikozidaz Enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ABKE ve Akarboz molekülünün IC₅₀ ve R² değerleri.....26
- Çizelge 4.6.** α -Amilaz Enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ABKE ve Akarboz molekülünün IC₅₀ ve R² değerleri26
- Çizelge 4.7.** Astragalus brachycalyx Fischer bitkisi kök ekstratının böbrek dokusu protein miktarı ve α -glikozidaz enzim aktivasyonu üzerine etkisi33
- Çizelge 4.8.** Astragalus brachycalyx Fischer bitkisi kök ekstratının böbrek dokusu protein miktarı ve α -amilaz enzim aktivasyonu üzerine etkisi35

1. GİRİŞ

Bitkilerin iyileştirici etkileri eski çağlardan beri bilinmektedir. Dolayısıyla bitkilerden elde edilen ilaçların kullanımı önemli bir konudur. Geleneksel yolla bitkileri ilaç olarak kullanımında; sulandırma, demleme, çiğ olarak tüketme, fırınlama ve merhem şeklinde yöntemler uygulanmıştır. Ancak olası yan etkilerinden dolayı ve bilinçli olarak kullanılabilmesi için şifalı bitkilere yönelik bilimsel çalışmaların yapılması da elzemdir. Buna yönelik halk arasında ‘‘Geven’’ olarak bilinen *Astragalus* L. cinsine ait *Astragalus brachycalyx* Fischer türü; yakacak olarak, hayvanlarda yem olarak kullanılmasının yanında bitki kökünün kaynatılmasıyla elde edilen özütün sıvı olarak tüketilmesi sonucu insanlarda şeker hastalığını (Diabetes Mellitus) iyileştirici etkisi olduğu düşünülmektedir.

Leguminosae (Fabaceae) familyasından *Astragalus* L. Cinsi çiçekli bitkilerin en kalabalık cinslerinden biridir. *Astragalus* L. Cinsine ait bitkiler tek veya çok yıllık otlar, çüce çalılar ve çalılardan oluşur(Podlech, 2008). Dünya’da 2500-3000 arasında türü bulunan bu cinsin 469 taksonomik bölüm içeriği bilinmektedir(Dinç vd., 2013). Türkiye florasında 425 takson ile en zengin cins *Astragalus* L.’dir ve 201 türü endemiktir(Ekici vd., 2008, Davis, 1970).

Astragalus türlerinin en bilinenleri *A. brachycalyx* Fischer, *A. gummifer*, *A. microcephalus* Will’dir. Bu türlerin bazılarında ‘‘kitre’’ denilen bir madde elde edilir. Kitre; gıda, kozmetik sanayide, kimya ve eczacılık alanlarında kullanılır (Kadioğlu vd., 2008). *Astragalus* türlerinin kökleri, antoksidan, antibakteriyel, antiperspirant, antidiyabetik ve diüretik etkilerinden dolayı halk arasında kullanılmaktadır(Lim vd., 2011, Teyeb vd., 2012, Bedir vd., 2000, Albayrak ve Kaya, 2018).

1.1. Diyabet

Diabetes mellitus (DM), insülin salgılanmaması, insülin direnci yada bu iki durumunda beraber gözlenmesi durumunda yüksek kan şekeri konsantrasyonuyla karakterize edilen bir metabolik rahatsızlıktır. DM, kronik ve akut komplikasyonlar nedeniyle dünyada en sık görülen hastalıklardan biridir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu 2021 DM raporuna göre Dünya’da 537 milyon yetişkin (20/79 yaş) diyabetli yaşıyor (10’da 1’i). Bu sayının 2030’da 643 milyona, 2045’te ise 783 milyona çıkacağı tahmin ediliyor. Diyabetli her 4 yetişkinden 3’ü düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşıyor. Diyabet, 2021’de 6,7 milyon ölümden sorumludur (her 5 saniyede 1 kişi). Diyabet, sağlık harcamalarında son 15 yılda %316 artışla 966 milyar Amerikan Doları harcanmıştır(IDF, 2021).

1.1.1. Diyabet Tipleri

1.1.1.1. Tip 1 Diyabet

Dünyadaki diyabetlilerin %5-10’unu oluşturan bu diyabet formu, pankreasta insülin üretiminden sorumlu beta hücrelerinin otoimmün yıkımıyla ortaya çıkar. Bu otoimmün yıkıma 6. kromozom üzerinde bulunan DQA ve DQB genleriyle bağlantılı bir temel olduğu düşünölmektedir. Yaşı bağlı olarak da Beta hücrelerinin yıkım hızı değişkenlik gösterir. Genellikle bebek ve çocuklarda daha hızlı, yetişkinlerde ise daha yavaştır(ADA, 2014).

Tedavi edilmezse insülin eksikliği, hiperglisemi ve ketoasidaz gibi metabolik rahatsızlıklar gözlenir. Bu durumda kan şekeri düzeyinin sık sık kontrol edilerek, insülini enjeksiyon yoluyla verilmesiyle doğal Beta hücrelerinin etkisi taklit edilmeye çalışılır(Gregory vd., 2013).

Tip 1 diyabet hiperglisemi, poliüri, susuzluk hissi gibi semptomlar halinde kendini gösterir. Tedavisi yoktur ve hastalar ömürleri boyunca insülin enjeksiyonuna bağımlıdırlar. Bununla birlikte, glikoz izleme, insülin pompaları, hibrit kapalı döngü sistemleri gibi yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir (Katsarou vd., 2017).

1.1.1.2. Tip 2 Diyabet

Diyabetli hastaların yaklaşık %90’ını oluşturan Tip 2 diyabet hem hastalar hem de bakıcılar için derin psikolojik ve fiziksel sıkıntı vererek sağlık sistemine büyük bir yük olan bir hastalıktır. Tip 2 diyabet ile ilgili risk faktörleri hakkında edinilen bilgilere ve önlemeye yönelik başarılı programlarla ilgili kanıtlara rağmen, hastalığa yakalanma riski ve hastalığın yaygınlığı artmaya devam etmektedir (Chatterjee, 2017).

Tip 2 diyabet iki ana faktörden kaynaklanır; pankreasın Beta hücrelerinin kusurlu insülin salgılaması ve insüline duyarlı dokuların insüline uygun şekilde yanıt

verememesidir. İnsülin salgılanması ve hedef hücreler tarafından tanınması glikoz metabolizması açısından önemlidir ve burada görev alan moleküler mekanizmalar sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Galicia Garcia vd., 2020).

Tip 2 diyabet, insülin direnci nedeniyle bozulmuş glikoz toleransı ile bağlantılıdır. Genetik yatkınlık, çevresel faktörler, diyet, fiziksel hareketsizlik ve obezite gibi faktörlerle birlikte bozulmuş glikoz toleransı, insülin direncinin ilerlemesine ve Tip 2 diyabetin gelişimine önemli ölçüde neden olur (Stumvoll vd., 2005; Zimmet vd., 2001).

1.1.1.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM), daha önceden diyabet tanısı konmamış kadınlarda gebelik sırasında kronik hiperglisemiye neden olan bir gebelik komplikasyonudur(ADA, 2018).

1.1.1.4. Diğer Diyabet Türleri

Ekzokrin pankreas hastalıkları (örn. Pankreatit, kistik fibroz, hemokromatoz), endokrinopatiler (örn. Cushing sendromu, akromegali, feokromositoma), tıbbi olarak kimyasal olarak indükatörler (örn. glukokortikoidler, nöroleptikler, interferon-alfa, pentamidin), insülin genetik kusurları, enfeksiyonlar nedeniyle oluşan diyabet türleri de mevcuttur(Petersmann vd., 2019).

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller; yörüngelerinin dış orbitallerinde bir yada birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran iyon, atom veya moleküllerdir. Serbest radikaller ortaklanmamış elektron bulundurduklarından kararsız yapıdadır ve diğer maddelerle reaksiyona girip kararlı hale geçme eğilimindedirler. Kaynağı bakımından serbest radikaller, oksijen veya nitrojen kaynaklı olabilirler. Oksijen kaynaklılar; süperoksit, hidroksil, peroksil, lipit peroksil ve alkolsillerdir. Nitrojen kaynaklıları ise; nitrikoksit ve nitrojendioksit oluşturur(Shinde vd., 2012). Serbest radikaller canlı vücudunda birbirinden zıt iki duruma yol açabilirler; birincisi, artan serbest radikal konsantrasyonu proteinler, lipidler ve nükleik asitler üzerinde zararlı etkiler oluşturarak kalıcı rahatsızlıklara yol açabilir. Eğer serbest radikal konsantrasyonu hücrenin tolere edebileceği bir düzeyde ise; lökositler ve makrofajların fagositoz olayında, embriyonik

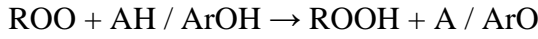
Kullanılan radikal kaynak biyolojik olarak uygun olmalıdır,
Uygulaması basit olmalıdır,
Tanımlanmış bir kimyasal mekanizmaya sahip olmalıdır,
Kullanılacak aletler ve kimyasallar ulaşılabilir olmalıdır,
Hem hidrofobik hem de lipofilik antioksidanların analizine uygun olmalıdır,
Yöntem kalite kontrol analizleri için uygulanabilir olmalıdır(Wu ve Schaich, 2005).

1.3.3. Antioksidan Aktiviteyi Belirleyen Kimyasal Testler

Kimyasal reaksiyon çeşidine göre antioksidan aktiviteyi belirleyen testler 3 gruba ayrılır. Bunlar; Hidrojen Atomu Transferi (HAT), Tek Elektron Transferi (SET) ve karma mod testleridir (HAT/SET).

1.3.3.1. Hidrojen Atomunun Transferine Dayalı Testler (HAT)

HAT testleri, bir antioksidanın bir hidrojen atomu vererek serbest radikalleri uzaklaştırma kabiliyetini ölçer.



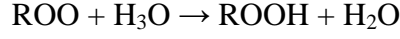
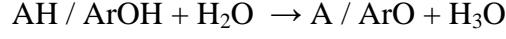
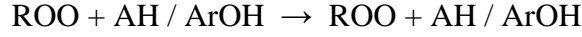
Burada; fenolün (ArOH; bir antioksidan), bir peroksil radikali (ROO) ile reaksiyonundan oluşan ariloksil radikali (ArO) ile stabilize edilir ve AH korunan moleküldür.

HAT tabanlı testlerin tipik örnekleri; Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi (ORAC),

Toplam Peroksil Yakalama Antioksidan Parametresi (TRAP) ve Toplam Oksiradikal Temizleme Kapasitesi (TOSC) yöntemleridir.

1.3.3.2. Tek Elektron Transferine Dayalı Testler (SET)

Tek bir elektron transferi yoluyla bir antioksidanın, metal iyonları, karbonil gruplarını ve serbest radikalleri azaltma prensibine dayanır.



SET yöntemlerinde reaktif fonksiyonel grubun iyonizasyon ve deprotonasyon potansiyeline dayanır. Bu yüzden SET reaksiyonlarında pH değeri önemlidir.

Tipik SET testleri; Folin-Ciocalteu testi (FC), Bakır Antioksidan Kapasitesi Azaltma Testleri (KUPRAK) ve Antioksidan Gücün Ferrik Redüksiyonu (FRAP) testleridir. Bu testlerde bir antioksidanın bir oksidantı azaltma kapasitesi ölçülür ve bu azalışa bağlı olarak renk değişimi gözlenir. Renk değişimi derecesi, toplam antioksidan kapasiteyle orantılıdır.

1.3.3.3. Karma Mod Testleri (HAT / SET)

Karma mod testleri genellikle sabit bir kromoforun ortadan kaldırılmasına yönelik testlerdir. Bunlar; ABTS (2,2'-azinobis-3- etilbenzthiazolin -6- sülfanik asit) ve DPPH (2,2- difenil -1- pikrilhidrazil) radikallerinin süpürülmesiyle etki eder.

Karma mod testleri ABTS / TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite) testi, DPPH testi ve DMPD (N,N -dimetil -p- fenilendiamin dihidroklorür) radikal nötralizasyon testidir.

1.4. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonların belirli aşamalardan geçişini düzenleyen ve reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin yakın zaman kadar protein yapılı olduğu düşünülmüştür ancak 1980'li yıllarda bazı ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin de katalizör olarak etki ettiği keşfedilmiştir (Robinson, 2015). Canlı vücudunda gerçekleşen bütün reaksiyonlar, işlem tamamlandıktan sonra kendisi değişmeksizin reaksiyon hızını arttıran enzimler aracılığıyla yürütülmektedir (Ferrier, 2019). Enzimler hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte, enzim terimini ilk olarak 1878 yılında W. Kühne kullanmıştır. 1897 yılında Buchner ilk defa bir hücreden enzim ayrıştırarak, hücre dışında da enzim aktivitesini gözlemlemiştir (Topal, 1985).

Enzimler, metabolik reaksiyonlarda ‘‘substrat’’ olarak adlandırılan maddelere etki ederler ve substratlar enzime özgüdür. Enzimlerin bir kısmı reaksiyonları aktive edici yardımcı kısma ihtiyaç duymayıp sadece protein yapıdırlar. Bunlara basit enzimler denir. Bileşik enzimler ise kofaktör ve koenzime ihtiyaç duyarlar. Kofaktör; enzimin etkinlik gösterebilmesi için gerekli olan inorganik iyonadır. Koenzim, karmaşık organik moleküller veya mataloorganik yapıda olup enzimi aktive edici özellik gösterir. Enzimin kofaktör veya koenzimden ayrı olan protein kısmına apoenzim, kofaktör veya koenzimle birlikte aktifleşen enzime ise holoenzim denir (Nelson and Cox, 2013). Bazı enzimlerin protein kısmı hem kofaktör hem de koenzim gruplarına birlikte ihtiyaç duyarlar. Yani enzimin aktivite gösterebilmesi için kofaktör ve koenzimin beraber bulunması gerekir (Türkan, 2015).

Enzim ile substrat bağlanmasını açıklayan iki model vardır. Fisher modeli denen anahtar kilit modelinde enzimin aktif bölgesi ile substrat arasında tamamlayıcı nitelikte bir uyum söz konusudur. Koshland modeli yada indüklenmiş uyum modelinde ise substrat molekülünün bağlanması ile enzimdeki konformasyonel değişim sonucu aktif bölge katalize hale gelmiş olur (Koshland, 1995).

1.4.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

1. Oksiredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
2. Transferazlar: Bazı fonksiyonel grupların transfer tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Çift bağların oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Moleküller arasında grup transferi ile izomerik formların oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligazlar: Adenozin Tri Fosfat (ATP) veya diğer fosfatlı bileşiklerden faydalanarak, bunlarda bulunan difosfat bağının hidroliziyle iki molekül arasında yeni bağlar oluşmasını katalizlerler.
7. Translokazlar: Hidronların, inorganik katyonların, inorganik anyonların, aminoasit ve peptidlerin translokasyonu, karbonhidrat ve türevlerinin yer değişimini katalizleyen enzimlerdir (McDonald and Tipton, 2021).

1.4.2.1. Enzim Aktiflik Birimleri

Enzimler, biyolojik ortamlarda miktarları çok az olmasına rağmen aktivite gösterebilirler. Enzim miktarının azlığından dolayı miktar ölçümü yerine aktivite ölçümü yapılmaktadır(Türkan, 2009).

1.4.2.2.Enzim Aktivitesi

Bir tepkimede belirli bir sürede, optimum koşullarda, enzim etkisiyle substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır.

1.4.2.3.Enzim Ünitesi (EÜ)

25°C’de , optimum koşullarda, bir dakikada 1 milimolar substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

1.4.2.4.Katal

Bir mol substratı bir saniyede reaksiyona sokan enzim miktarıdır. Katal, çok büyük bir miktarı temsil eden bir birimdir. Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından belirlenmiştir.

1.4.2.5.Spesifik Aktivite

Bir miligram (mg) protein başına düşen enzim aktivitesine spesifik aktivite denir. Enzim ünitesi (EÜ)/mg protein şeklinde elde edilmektedir. Spesifik aktivite aynı zamanda enzimin saflık derecesinin bir göstergesidir.

1.4.2.6.Turnover Sayısı (Molar Aktivite)

Birim zamanda bir tek enzim tarafından ürüne dönüşen substratın molekül sayısıdır ve ‘kcat’ sembolü ile gösterilir.

1.4.3. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin etkisini seçici olarak düşürülmesine bazı durumlarda durdurulmasına sebep olan kimyasallar vardır. Enzimin etkisini negatif yönde değiştiren bu kimyasallara inhibitör ve meydana gelen reaksiyona ise inhibisyon denilmektedir. Bu durum bazen istenilen bazen ise istenilmeyen durumlara neden olmaktadır. İnhibitör adı verilen kimyasal maddeler biyolojik katalizör olan enzimlere zayıf bağlarla bağlanıyorsa bu genellikle geri dönüşümlü (reversibl) olarak adlandırılırken eğer inhibisyon adı verilen kimyasallar biyolojik katalizörlere kovalent bağlarla bağlanıyorsa geri dönüşümsüz (irreversibl) olarak adlandırılır.

1.4.3.1. Geriye Dönüşümlü (reversibl) İnhibisyonlar

Geriye dönüşümlü (reversibl) inhibisyonlar inhibitörlerin enzimlere bağlanma türüne göre 3'e ayrılmaktadır. Bunlar yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon , yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon olarak isimlendirilmektedir.

1.4.3.1.1.Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

İnhibitör, enzimin aktif bölgesine substratla yarışarak bağlanır. İnhibitör madde ile substrat birbirlerine benzerlik gösterdikleri için inhibitör madde substrat kadar kolay bir şekilde bağlanabildiğinden bu bağlanma sonucunda substrat enzime bağlanamayacağından ürün oluşumu olmamaktadır. Bu tür inhibisyonlarda, inhibitörlerin enzimin substrata bağlanmasını engellenmesi ana amaçtır. Kompetitif inhibisyonda maksimum hıza (V_{max}) ulaşmak için daha fazla substrata ihtiyaç vardır. Ortamdaki substrat miktarının artırılmasıyla enzimin inhibitöre olan duyarlılığı azalır ve böylece inhibisyon ortadan kalkmış olur. İnhibitör miktarının artırılması durumunda ise enzimin substrata olan ilgisi azalır, böylece K_M değeri artar V_{max} değeri ise değişmez(Oğuz, 2020).

1.4.3.1.2.Yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon

Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat yapı olarak birbirlerine benzemediklerinden substratla inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanırlar. Yarışmasız inhibitör, ya enzim- substrat kompleksine ya da serbest enzime bağlanırlar böylece tepkimenin hızını düşürürler. Bu tip inhibisyonlarda substrat maddenin miktarının artması inhibisyonu ortadan kaldırmaz.

1.4.3.1.3.Yarı Yarışmalı (unkompetitif) İnhibisyon

Yarı Yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonlarda İnhibitör direkt enzim- substrat kompleksine bağlanır. İnhibitörün enzime bağlanmasıyla ürün oluşumu sonlanır.

1.4.4. Alfa-Glikozidaz Enzimi

α -glikozidaz bir karbonhidrat hidroliz enzimi olup oligosakkaritler ve disakkaritlerin glikoza dönüştürülmesinde anahtar rol oynar ve üretilen monosakkaritler ince bağırsak tarafından emilerek kan glikoz seviyelerinin artmasına neden olur (Kim vd., 2017). Bundan dolayı GAA, Tip 2 diyabetin önlenmesi ve tedavisinde ana hedef enzim olarak kabul edilmiştir. α -glikozidaz inhibitörleri (AGI), diyabet hastalarının kan glikoz

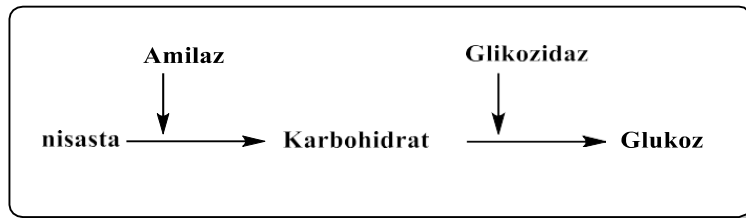
düzeylerini kontrol etmede önemlidir. AGI'leri karbonhidrat sindirimini geciktirerek ve dolayısıyla monosakkaritlerin emilimini azaltarak kan şekeri seviyesini normal düzeyde tutarlar(Salar vd., 2016).

α -glikozidaz inhibitörleri (AGI'ler) benzersiz bir anti-diyabetik ilaç sınıfıdır. Gastrointestinal sistemdeki karbonhidrat emilimini geciktirmek için çalışarak postprandiyal hiperglisemiye kontrol eder ve kardiyovasküler fayda sağlarlar(Kalra, 2014). Akarboz, miglitol, nojirimycin ve voglibose gibi bilinen sentetik bileşikler alfa-glikozidaz inhibisyonunda önemli rol oynarlar. Ancak bazı belirgin yan etkileri vardır (karın ağrısı, karın şişkinliği, gaz, ishal, kramp gibi). Bu nedenle doğal ürünlerden elde edilen bileşiklerin AGI'nunda kullanmak daha ilgi çekici hale gelmiştir. Ayrıca Amerikan Klinik Endokronologlar Birliği (AACE) ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) doğal AGI'leri Tip2 diyabet için birinci basamak tedavi olarak kabul etmiştir (Chen ve Guo, 2017).

1.4.5. Alfa-Amilaz Enzimi

Nişasta bileşiğinde bulunan α -1,4-glikozit bağların hidrolizini gerçekleştiren enzimdir.

Bazı canlı organizmalardan ve çeşitli kaynaklardan sağlanabilir. Canlı olan bütün organizmalarda bulunur bunun yanı sıra, spesifiklik, etkinliği ve zorunluluğu, hücreden hücreye farklılık gösterebilir. Nişasta bileşiğinde bulunan α -1,4-glikozit bağların kopmasını gerçekleştiren amilaz enzimi birçok canlı organizmadan elde edilir (Taslimi ve Gülçin, 2017).



Şekil 1.2 α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzimlerin Etki Mekanizmaları (Taslimi, 2017)

Ticari olarak kullanılan ilk karbonhidraz enzimi amilaz'dır(Taslimi, 2017). Özellikle Bacillus cinsine ait bakterlilerin amilazları oldukça fazla çalışılan enzim kaynaklarını oluşturur. Bu durumun temel sebebi bakteriyel α -amilazlar sıcaklığa fungal α -amilazlardan daha fazla miktarda stabil durumda olduklarından kaynaklıdır (Taslimi, vd., 2017).

Gıda sanayisinde de α -amilaz enziminden faydalanılmaktadır. Kullanım alanları çok fazla olmasının yanında ekmeğin tüketim süresinin arttırılması kullanım alanlarının en yaygınını oluşturur. Fırıncılık ve alkollü içecek olan bira yapımında da kullanılan α -amilaz Bacillus ve Aspergillus'dan elde edilir. Bununla birlikte arpa ve buğday maltında da bulunur. Ayrıca meyve suyu üretiminde de uygulama alanı bulan α -amilaz ticari olarak bazı meyve sularının berraklaştırılması alanında da uygulanmaktadır. Meyveler tam olgunluğa erişmeden toplanmaları sonucunda ilerinde bir miktar nişasta bulunur. Nişasta bulunduğu için meyve sularında bulanıklık hali oluşmaktadır. Bu durumun önüne geçilmesi adına α -amilaz kullanılmaktadır (Taslimi, 2017).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Halk arasında şeker düşürücü olan kullanılan *Astaragalus brachycalyx* Fiscer kök kısmının antidiyabetik ve antioksidan etkiye sahip olup olmadığı araştırıldı.

Siahpoos vd., (2010), *Astaragalus brachycalyx*'in hava kısımlarından dört farklı ekstratını (metanol, kloroform, polifenol ve su) hazırlayarak, antioksidan aktivite testi için DPPH ve TEAC testlerini uygulamışlardır. Sonuçlara göre; her iki yöntemle de *Astaragalus brachycalyx*'in antioksidan aktiviteye sahip olduğu, polifenik özütün DPPH testine maksimum aktivite gösterdiği, TEAC testinde ise sulu özütün maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bingöl vd., (2021), *Astaragalus brachycalyx*'in buharlaştırılmış etanol özütünün antioksidan aktivitesini ölçmek için DPPH, ABTS testleri , ferrik iyonlar ve bakır iyonları indirgeme yeteneklerini ölçen testler uygulamışlardır. Ayrıca asetilkolinesteraz, α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerine IC₅₀ değerlerini ölçmüşlerdir. Yapılan ölçümler sonucunda *Astaragalus brachycalyx*'in alfa amilaz, α -glukozidaz enzimlerine karşı standart bir inhibitör olan akarbozdan daha etkili olduğu gösterilmiştir. Asetilkolinesteraza karşı zayıf bir inhibisyon göstermiştir. *Astaragalus brachycalyx*'in yapılan testler sonucunda oldukça yüksek bir metal şelatlama, yüksek bir ABTS süpürme etkisi ve çok güçlü bir DPPH: uzaklaştırma etkisine sahip olduğu gösterilmiştir.

Suyundikov (2020)'un, Türkiye'de endemik tür olan *Thermopsis turcica* bitkisinin antidiyabetik özellikleri hakkında yaptığı çalışmada α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonunu incelemiştir. *Thermopsis turcica* bitkisinin dietil eter ve aseton ekstratlarının α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerinde akarboz kadar inhibisyon aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Berberler (2016)'in Muğla bölgesinde yetişen, Lamiaceae ailesine ait *Sideritis leptoclada*, *Phlomis Lycia*, *Phlomis fruticosa*, *Teucrium polium* ve *Teucrium chamaedrys ssp. lydium* bitkilerinin etanol ekstratlarının α -amilaz, α -glukozidaz ve lipaz enzimleri üzerinde inhibisyonunu incelemiştir. Bu bitkilerin, α -amilaz, α -glukozidaz ve lipaz enzimlerini güçlü miktarda inhibe ettiklerini gözlemlemiş, diyabet ve obezite ile

ilgili rahatsızlıkların giderilmesinde ilaç eldesinin hammaddesinin ortaya çıkarılmasında potansiyele sahip olduğunu saptamıştır.

Demir vd., (2019)'nin nar kabuğu ekstratının antidiyabetik etkilerini gözlemlemek için α -glikozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerine yaptıkları çalışmada, nar kabuğunun α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerini Akarboz'a yakın bir inhibisyon gösterdiği gözlenmiştir.

Yuca vd., (2022) *Peganum harmala* L. bitkisinin α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibisyonu üzerine çalışmışlardır. *Peganum harmala* L. bitkisinin meyve ve herbasından hazırlanan metanolik ekstratlarının antidiyabetik etki gösterdiği ve sentetik ilaçlara karşı bitkisel alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırmamızın canlı materyali olan sıçanlar (*Wistar albino*) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi araştırma hastanesindeki deney hayvanları ünitesinden temin edilmiştir. Çalışmalar sırasında kullanılan saf kimyasallar Sigma Aldrich Company'den alınarak uygulanmıştır. Etkilerini araştırdığımız *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi Muş İline bağlı Karabey Köyünde temin edilmiştir. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin tanımlanması Muş Alparslan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından yapılmıştır.

3.1.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Liyofilize salin ekstresi Dalar ve Konczak (2013) metodunun modifiye şekline göre hazırlandı. Öğütülmüş bitki numunesinden 50 gr tartılarak, bir cam behere konulu ve 1000 ml salin ile ekstre edilerek, beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatıldı. +4°C'de, 2 saat süreyle çalkalayıcıda homojenize olan karışım, daha sonra santrifüj cihazına yerleştirildi. Homojenize karışım 20 dk boyunca, 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen supernatant enjektör yardımı ile 0.45 µm'lik hidrofilik filtreden (Millipore) geçirildi.

Bu işlem iki defa daha tekrarlanarak elde edilen tüm supernatantlar aynı kaba konuldu. Daha sonra supernatantlar, evaporatör yardımıyla +37°C'de çözücünden arındırıldı. Yoğunlaştırılan ekstre saf suda çözdürülerek, soğutucuda dondurulacak ve daha sonra -51 °C sıcaklık ve 50 millitor basınç şartlarında liyofilize cihazında bir hafta süreyle bekletildi. Elde edilen liyofilize salin fraksiyonu elde edilecek, analiz işlemlerine başlanana dek, -20 °C'de muhafaza edildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antioksidan aktivite kapasitesi belirlemek üzere gerekli incelemelerde kullanılan kimyasal maddelerden DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikali, ABTS (2,2-Azinobis-3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) radikali, Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Sodyum fosfat , 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside , Na₂HPO₄, K₃Fe (CN)₆, KH₂PO₄, TCA(Trikloro asetik asit), FeCl₃, CuCl₂, saf su ve etil alkol İğdır Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edildi.

3.1.3. Kullanılan Enzimler

- α -Amilaz ve α -Glikosidaz

3.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Spektrofotometre: Cary 60 UV- Vis
- pH metre: Mettler Toledo 26
- Karıştırıcı (Vortex): Wizelmix vm-10
- Hassas terazi: Radwag
- Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr
- Otomatik pipetler: Eppendorf
- Saf su cihazı: RİOsTM 8
- Saf su tankı: Millipore
- Buzdolapları: Arçelik
- Manyetik karıştırıcı: Wise Stir-MSH-20A

3.1.5. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,1 mM Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (Enzim seyretmek için): 6 mg sodyum fosfat hassas terazide tartma işleminden sonra üzerine 450 mL saf su eklenerek pH'sı pH metre ile 6,9 olacak şekilde ayarlayıp saf su ile toplam çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde hazırlandı.

2. 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (Aktivite ölçmesi için): 5,99 g sodyum fosfat hassas terazide tartılıp üzerine 450 mL saf su eklenerek pH'sı pH metre ile 6,9 olacak şekilde ayarlanıp saf su ile toplam çözelti hacmi 500 mL olacak şekilde hazırlandı.

3.5 mM'lık 4-Nitrophenyl β -D-lucopyranoside substrat çözeltisinin hazırlanışı: 0,0376 g substrat hasas terazide tartıldıktan sonra 0,1 M'lık fosfat tampon içerisinde 25 mL'de çözüldü.

3.1.6. α -Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1.0,1 mM Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (Enzim seyretmek için): 6 mg sodyum fosfat hassas terazide tartılıp üzerine 450 mL saf suya eklenerek pH metre ile pH'sı 6,9'a ayarlanıp saf su ile toplam çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

2.0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlanması (Aktivite ölçmesi için): 5,99 g sodyum fosfat tamponu hassas terazide tartılarak üzerine 450 mL saf su eklenerek çözdürülür ve pH metre ile pH'sı 6,9'a ayarlandıktan sonra son çözelti hacmi 500 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

3.Nişasta Substrat Olarak Hazırlanışı: 20 mg nişasta hassas terazide tartılarak 20 mL saf su içerisinde çözüldü.

3.1.7. İnhibitör Çözeltilerin hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılan *Astaragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratı 1mg hassas terazide tartıldı ve üzerine 1 mL etil alkol eklenerek çözdürülerek stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra her bir inhibitör için 100 μ L alınarak distile su ile 1000 μ L'ye tamamlanarak seyreltik çözeltiler hazırlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.2.1.1. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini

Tao vdadaşlarının kaydedilen prosedürüne göre α -glikozidaz enzim aktivitesinde, substrat olarak p-NPG kullanılarak belirlendi; numuneler 20 mg hassas terazide tartılarak 2 mL'de çözümlenerek ayarlandı(EtOH:H₂O).

Tüm enzim inhibisyonu elde edilmesi durumunda fosfat tamponunda çoklu çözeltiler hazırlandı. Öncelikli olarak 75 uL fosfat tamponu, fosfat tamponu (0,15 U/mL, pH 7,4) ve 5 uL numune içindeki 20 uL enzim çözeltisi ile birleştirildi. Sonrasında p-NPG eklenmeden önce 35°C'de 10 dakika süresince ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra ise fosfat tamponunda (5 mM, pH= 7,4) 20 uL p-NPG eklemesi yapılarak inkübasyon işlemi tekrar 35°C'de yapıldı. Verilerin ışığında IC₅₀ değerleri hesaplandı. Pozitif kontrol olarak akarboz bileşiği kullanıldı. Absorbans değerleri 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bir birim α - glikozidaz dakikada 1,0 mol substrat hidrolizini katalize eden enzim miktarıdır (pH: 7,4).

3.2.1.2. α -Amilaz Enziminin Aktivite Tayini

Xiao vdadaşları tarafından kaydedilen prosedürüne göre α -amilaz enziminin aktivitesi belirlendi. Yapılan bu çalışmada, substrat çözeltisini hazırlamak için, 2 g nişasta hassas terazide tartılarak 80 mL NaOH çözeltisi (0,4 M) içerisinde çözündürülmüş ve 30 dakika süresince 80°C'de ısıtma işlemi yapılmıştır. Daha sonra buzlu suda 2.0 M HCl ile soğutulma işleminin ardından, çözeltinin pH'sı pH metre ile 6.9'a ayarlandı ve 100 mL tamamlamak için H₂O eklendi. Numune örnekleri 20 mg'ı 2 mL'de eritilerek hazırlandı (EtOH:H₂O). Tüm enzim inhibisyonu elde edilmesi durumunda fosfat tamponunda çoklu çözeltiler hazırlandı. Yüzey (35 μ L), fosfat tamponu (pH 6,9; 35 μ L) ve numunenin (5 μ L) çözeltileri karıştırıldı ve 35°C'de 30 dakika önceden inkübasyon işlemi yapıldı. Sonrasında 50 μ g/mL'lik bir enzim solüsyonundan 20 μ L eklenildi. Hazırlanmış olan çözelti 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon, 50 mL 0,1 M HCl eklenerek tamamlandı. Absorbans değerleri 580 nm'de spektrofotometrik olarak saptanmıştır. Bir birim α -amilaz enzimi 20°C'de pH 6,9'da 3 dakika içerisinde nişastadan 1,0 mg maltoz açığa çıkararak enzim miktarıdır.

3.2.1.3. Total İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler (FRAP)

1. 0,2 M pH 6,6 fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı : 6,24 g Na₂HPO₄ 180 ml saf suda çözündürüldü ardından pH metre de pH'ı 6,6'ya getirildi. Toplam çözelti hacmi 200 ml olacak şekilde saf su ile ayarlandı.

2. %1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisinin hazırlanışı: 1,5 g K₃Fe(CN)₆ saf suda çözündürülerek toplam çözelti hacmi 150 ml olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanışı: 15 g TCA saf suda çözündürülerek toplam çözelti hacmi 150 ml olacak şekilde saf su eklendi.

4. %0.1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanışı: 165 mg FeCl₃.6H₂O saf suda çözündürülerek toplam çözelti hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

3.2.1.4.KUPRAK Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanışı: 47 mg CuCl₂ alınarak , 50 ml saf suda çözüldü.

2. $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanışı :78 mg neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

3. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanışı (pH: 6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve üzerine 80 ml saf su eklenerek cözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlanarak toplam çözelti hacmi 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

3.2.1.5.DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH çözeltisinin hazırlanışı: 39 mg DPPH alınarak üzerine 100 ml etanol eklenerek bir gece süreyle manyetik karıştırıcı ile iyice çözünme işlemi gerçekleştirilerek karıştırılarak çözelti hazırlandı.

3.2.1.6. ABTS⁺ Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanışı (pH 7,4): 1,36 g KH_2PO_4 alınarak 90 ml saf suda cözündürüldü. pH metre yardımıyla pH'sı 7,4 olacak şekilde hazırlandı. Toplam çözelti hacmi saf su eklenerek 100 ml'ye tamamlandı.

2. 2 mM'lık ABTS çözeltisinin hazırlanışı: 11 mg ABTS alınarak üzerine 80 ml saf su eklenerek çözünme işlemi gerçekleşti. Çözelti toplam hacmi saf su eklenerek 100 ml'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

3. 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanışı: 66,25 mg $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ alınarak üzerine 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu eklenerek çözünmesi için manyetik karıştırıcı ile karıştırılma işlemi yapıldı. Toplam çözelti hacmi saf su ile 100 ml olacak şekilde ayarlanarak çözelti hazırlandı.

3.2.1.7. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesi (Kuprakmetodu)

Apak vd. uygulamış olduğu Kuprak (2007) yöntemine dayanarak gerçekleştirildi. Hazırlanan deney tüplerine 0,01 M'lık 0,25 ml CuCl_2 çözeltisi eklendi. CuCl_2 çözeltisi üzerine 0,25 ml $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi ve 1 M'lık amonyum asetat tamponu eklendi. Çözelti iyice vortexlendikten sonra birbirinden farklı derişimlerde (10 – 20 - 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sentezlenen organik moleküller veya standartlar ilave edildi. 30 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra 450 nm'de absorbansları not edildi. Reaksiyon karışımının artan absorbansı değeri artan kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesini gösterir.

3.2.1.8. FRAP Yöntemi ile İndirgemeAktivitesi

Total indirgeme kuvveti tayini sentezlenen organik moleküllerde Oyaizu (1986) methodunda birkaç bazı değişiklikler uygulanarak gerçekleştirildi. Stok çözeltiden birbirinden farklı olacak şekilde konsantrasyonlardan belirli miktarlarda alınarak deney tüplerine aktarıldı. Saf su eklenerek toplam hacim 1 ml'ye tamamlandı. Sonrasın da her bir deney tüpüne 2,5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür $K_3Fe(CN)_6$ ve pH'sı 6,6 olan 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu eklenerek karışım $50^{\circ}C$ 'de 20 dk. süresince inkübasyona bırakıldı. Yapılan uygulamaların ardından 2,5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) reaksiyon karışımına eklendi. Çözeltinin üst fazından 2,5 ml alınarak üzerine % 0,1'lik 0,5 ml $FeCl_3$ ve 2,5 ml saf su eklenerek 700 nm'de absorbands değeri ölçüldü.

3.2.1.9. DPPH (1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil) Radikali Giderme Aktivitesi

Sentez moleküller için DPPH radikali giderme aktivitesi Blois yönteminde (1958) bazı kısmi değişiklikler uygulanarak çalışıldı (Bursal ve Gülçin 2011). Serbest radikal olarak DPPH^{*} 'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak ise bir önceki aktivite yöntemlerinde kullanılmış olan 1mg/ml derişimdeki stok çözeltisi kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. Birbirinden farklı derişimlerdeki stok çözeltiler deney tüplerine alındı ve toplam çözelti hacimleri etil alkol ile 3 ml'ye tamamlandı. Sonraki basamak olarak ise her bir deney tüpüne stok DPPH^{*} çözeltisinden 1'er ml eklendi ve oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakılarak 517 nm 'körde absorbands değeri kaydedildi. Kör olarak etanol, kontrol olarakta 1 ml DPPH^{*} çözeltisi ve 3 ml etanol kullanıldı. Azalan absorbands değeri geriye kalan DPPH^{*} çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermektedir.

3.2.1.10. 2,2-Azino-bis(3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonikasit) (ABTS) Radikali GidermeAktivitesi

Re vd. yapmış oldukları çalışmaya göre sentez moleküllerin ABTS radikali giderme aktivitesi belirlendi (1999). İlk basamak olarak 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanarak çalışmaya başlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretilmiş oldu. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbands değeri 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan sentez molekülün farklı derişimlerine (10-30 $\mu g/mL$) birer mL ABTS radikal çözeltisi eklendi

otuz dakika inkübasyon gerçekleştirildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbans değerleri kaydedildi.

3.2.2. Deneysel Muamele

Wistar cinsi sıçan deney hayvanları gruplara ayrılmadan önce akut toksisite testi için ratlara hazırlanmış olan bitki ekstratı her grupta 3 sıçan bulunacak şekilde 3 farklı dozda (250mg/kg, 500mg/kg ve 1000mg/kg) 15 sıçana verilerek gözlem yapıldı. Gözlem sonucunda verilmesi gerek uygun dozlar belirlendi. Daha sonra gruplar aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Toksisite testinde kullanılan 15 adet sıçanın yanı sıra, deneysel çalışmada 35 adet sıçan, (Genel toplamda da $15 + 35 = 50$) sıçan kullanıldı. Deneysel çalışmada kullanılan 35 adet sıçanlardan biri kontrol olmak üzere her grup 7 sıçandan oluşacak şekilde rastgele toplam 5 grup oluşturuldu. Gruplarımızdan bir tanesi kullandığımız bitki ekstraktının şeker hastalığına ne kadar iyi geldiğini belirlemek için piyasada şeker düşürücü olarak kullanılan (akarboz =20mg/kg) referans olarak kullanıldı. Normal kontrol grubunun dışındaki diğer gruplardaki sıçanlara taze olarak hazırlanan 0.1M buffer sitrat içinde streptozotosin (STZ) (45 mg/kg vücut ağırlığı) olacak şekilde intraperitoneal (karın içi) yoldan verilerek diyabet olmaları sağlandı. I. Grup olan sağlıklı normal kontrol (NK) grubuna normal sıçan yemi ve musluk suyu, II. Grup olan diyabetik kontrol (DK) grubuna normal sıçan yemi ve musluk suyu, III. Grup diyabetik+akarboz (20mg/kg) (DA), IV. Grup olan diyabetik+*Astragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratı (ABKE) (DAB-1) 100 mg/kg, V. Grup olan diyabetik *Astragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratı (ABKE) (DAB-2) 400 mg/kg olacak şekilde gruplandırıldı ve 28 gün boyunca uygulama devam etti. Ayrıca deneme boyunca ratların günlük su ve yem tüketimi ile haftalık canlı ağırlık kayıtları alındı.

3.2.3. Böbrek Dokusu Histopatolojik Değerlendirilmesi Gereç ve Yöntem

Böbreğin Histopatolojik değerlendirmesi için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyası kullanıldı. Dokular %10 tamponlu formaldehit içerisinde fikse edildikten sonra rutin histolojik takip aşamalarını takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinize ve rehidrat edildikten sonra H-E boyası ile boyanarak mikroskopta incelendi (Olympus BX53, Japan). Histopatolojik değerlendirme için gruplardaki her hayvan için rastgele örnekleme

yapılarak ortalama 12-15 alanda değerlendirme yapıldı. Bulgular, incelenen bölgelerde gözlenen hasar derecesine göre semikantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre: - (normal doku), çok az hasar: + (hasar<%25), az hasar : ++ (%25-50), orta hasar: +++ (%50-75), şiddetli hasar: ++++ (hasar>%75) şeklinde değerlendirildi.

3.2.4. Böbrek α -glukosidaz ve α -amilaz aktivitesinin tayini

Böbrek α -glukosidaz aktivitesinin tayini, Anestezi sonrası uzunlamasına kesilen böbrekler soğuk salin ile yıkanıp ve 10 mL (%0.9 NaCl) ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat dokular ile p-nitrofenilglukopiranosid (20 mM fosfat tamponu içinde, 5 mM olarak, pH 6.9) ile inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 20 dakika boyunca, 37°C bekletildi ve 2 ml 0.1 M Na₂CO₃ eklenmesi ile reaksiyon sonlandırıldı. α -glukosidaz ve α -amilaz aktiviteleri, 400 nm'de spektrofotometre yardımı ile pNPG'den açığa çıkan sarı renkli p-nitrofenol'ün miktarının ölçülmesi sayesinde belirlendi (Thovhogi, 2009).

$$\text{İnhibisyon (\%)} \text{ Hesaplama} = [(AC-AN) / AC \times 100]$$

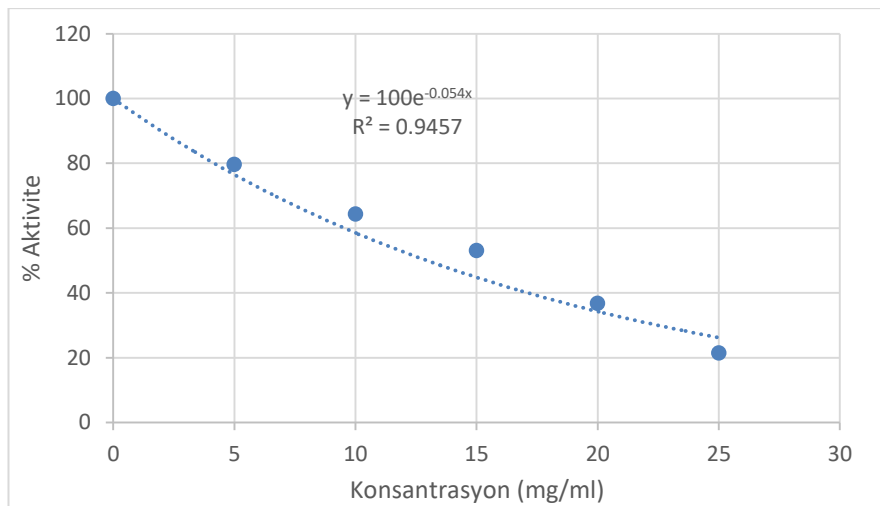
(AC : kontrol, AN : Bitki ekstraktı uygulanmış numune

4. BULGULAR

4.1 α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzim İnhibisyonu İle İlgili Araştırma Bulguları

Çizelge 4.1 α - Glikozidaz enzimi üzerine *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları

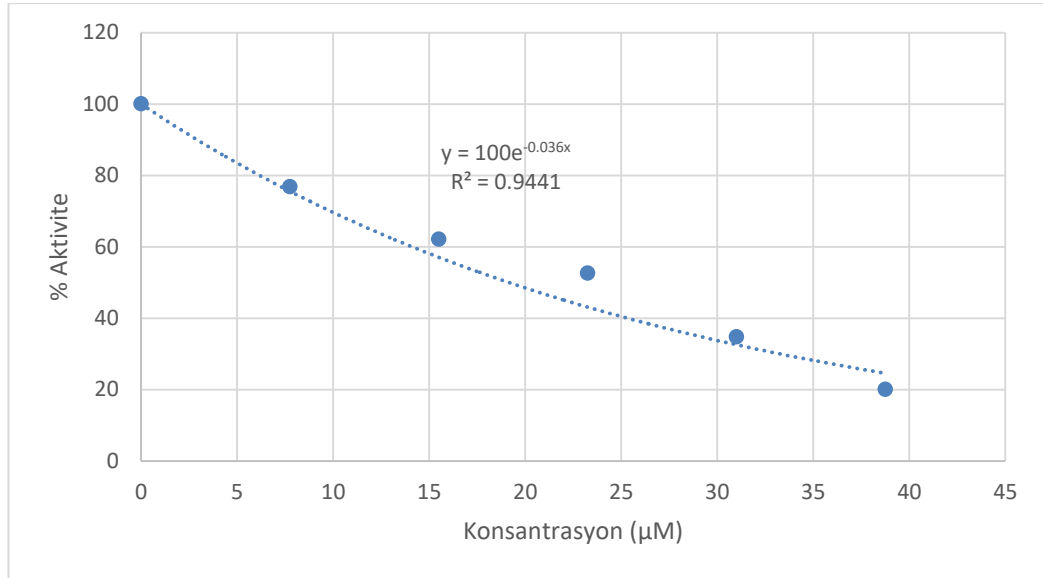
Sodyum Fosfat Tamponu (μ l)	500	500	500	500	500	500
p – NPG (μ l)	100	100	100	100	100	100
Enzim (μ l)	30	30	30	30	30	30
Saf Su (μ l)	370	365	360	355	350	345
İnhibitör ((μ l)	-	5	10	15	20	25
Toplam Hacim (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki Substrat Kons. (μ M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Küvetteki İnhibitör Kons. (μ lM)	-	0,775	1,55	2,325	3,1	3,8758
% Aktivite	100	79,59	64,28	53,06	36,73	21,42



Şekil 4.1. α - Glikosidaz enzimi aktivitesi üzerine *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite - [ABKE] grafiğı

Çizelge 4.2. α - Glikozidaz enzimi üzerine Akarboz molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları

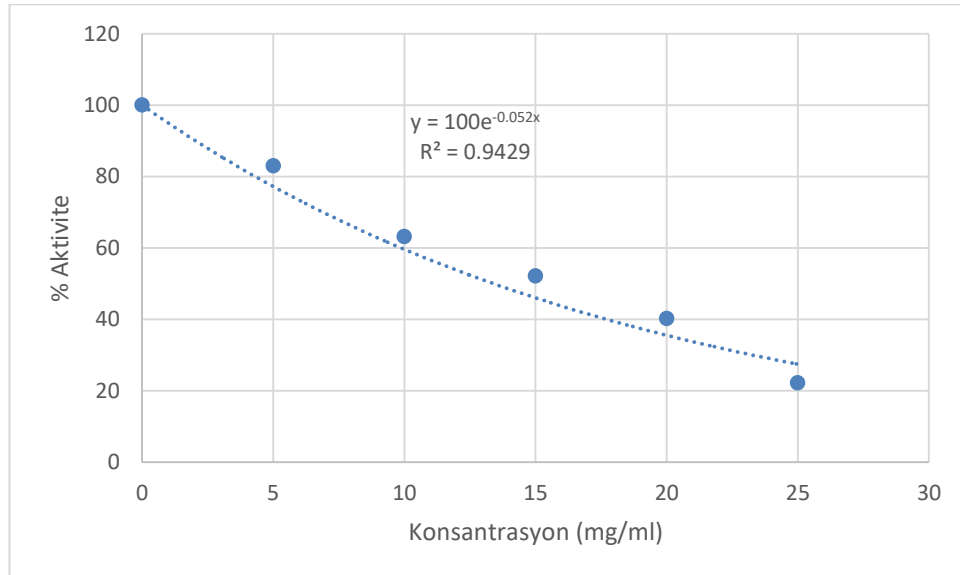
Sodyum Fosfat Tamponu (μ l)	500	500	500	500	500	500
p – NPG (μ l)	100	100	100	100	100	100
Enzim (μ l)	30	30	30	30	30	30
Saf Su (μ l)	370	365	360	355	350	345
İnhibitör (μ l)	-	5	10	15	20	25
Toplam Hacim (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki Substrat Kons. (μ M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Küvetteki İnhibitör Kons. (μ M)	-	0,775	1,55	2,325	3,1	3,8758
% Aktivite	100	79,59	64,28	53,06	36,73	21,42



Şekil 4.2. α - Glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine Akarboz molekülünün farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite - [Akarboz] grafiğı

Çizelge 4.3. α - Amilaz enzimi üzerine *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları

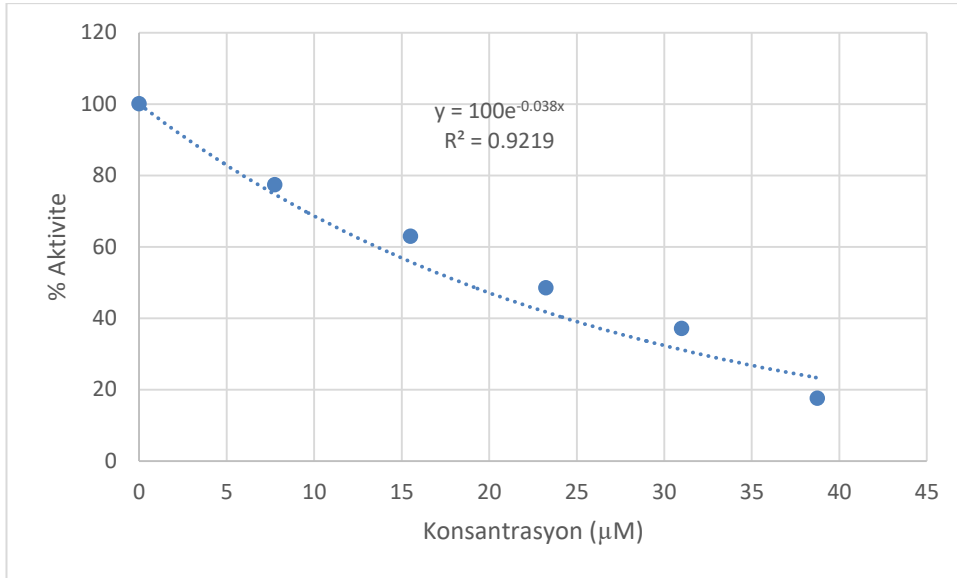
Sodyum Fosfat Tamponu (μ l)	500	500	500	500	500	500
Enzim(μ l)	30	30	30	30	30	30
Substrat(μ l)	100	100	100	100	100	100
Saf Su(μ l)	370	365	360	355	350	345
İnhibitör (μ l)	-	5	10	15	20	25
Toplam Hacim (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki Substrat Kons. (μ M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Küvetteki İnhibitör Kons. (μ M)	-	0,775	1,55	2,325	3,1	3,8758
% Aktivite	100	79,59	64,28	53,06	36,73	21,42



Şekil 4.3. α - Amilaz enzimi aktivitesi üzerine *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite - [ABKE] grafiğı

Çizelge 4.4. α - Amilaz enzimi üzerine Akarboz molekülünün IC_{50} değerlerinin belirlenebilmesi için kullanılmış olan inhibitör ve substrat derişimleri ve bu derişimlere karşılık gelen çözeltilerin miktarları

Sodyum Fosfat Tamponu (μ l)	500	500	500	500	500	500
Enzim(μ l)	30	30	30	30	30	30
Substrat(μ l)	100	100	100	100	100	100
Saf Su(μ l)	370	365	360	355	350	345
inhibitör (μ l)	-	5	10	15	20	25
Toplam Hacim(μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Küvetteki Substrat Kons. (μ M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Küvetteki İnhibitör Kons. (μ M)	-	0,775	1,55	2,325	3,1	3,8758
% Aktivite	100	79,59	64,28	53,06	36,73	21,42



Şekil 4.4. α - Amilaz enzimi aktivitesi üzerine ABKE'nın farklı derişim değerlerine sahip inhibitör etkisi ile yapılan ölçümlerde elde edilen %Aktivite – [Akarboz] grafiğı

Çizelge 4.5. α -Glikozidaz Enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ABKE ve Akarboz molekülünün IC_{50} ve R^2 değerleri

	IC50 (mg/mL)	R²
ABKE	12,84	0,9429
Akarboz	19,25	0,9441

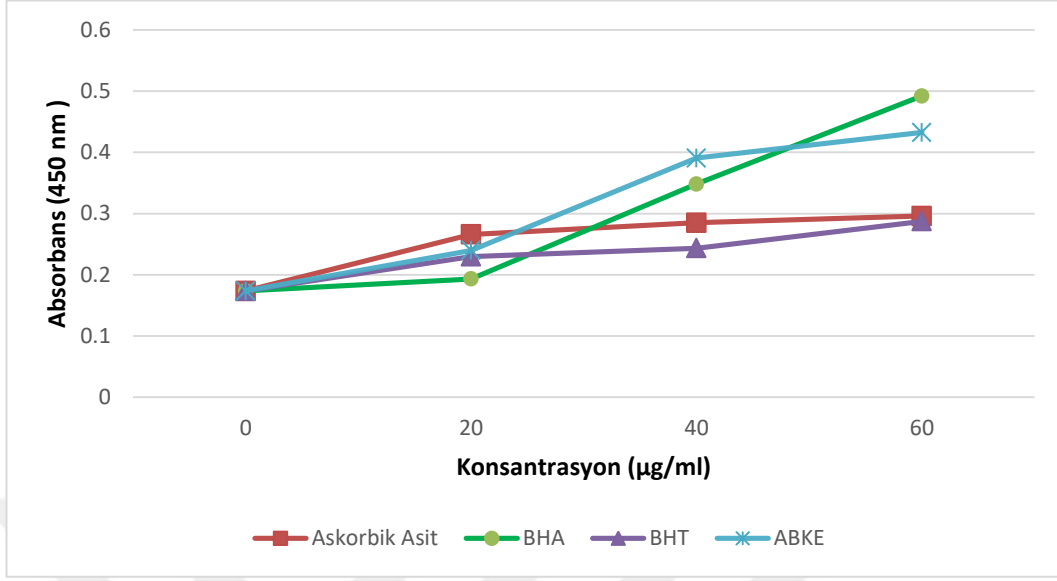
Çizelge 4.6. α -Amilaz Enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ABKE ve Akarboz molekülünün IC_{50} ve R^2 değerleri

	IC50 (mg/mL)	R²
ABKE	13,59	0,9429
Akarboz	18,73	0,9219

4.2. Antioksidan Çalışmaları İle İlgili Araştırma Bulguları

4.2.1. Cu^{2+} - Cu^+ İndirgeme Kuvveti (KUPRAK metodu) Bulguları

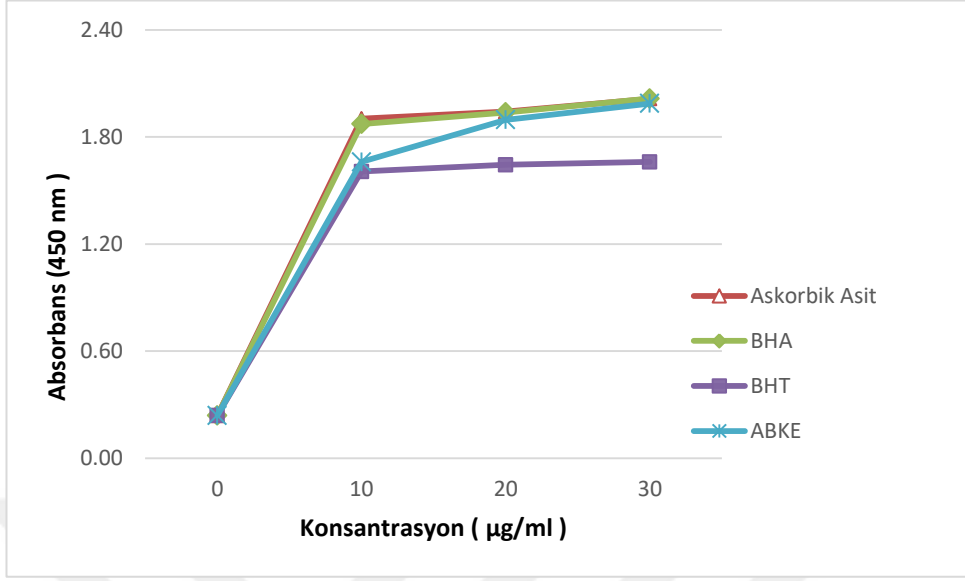
Çalışma bulgularına göre, 20 – 40 - 60 μ g/ml konsantrasyonlarda kuprik iyonlarını (Cu^{2+}), kupriz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktivitelerinin sıralanması BHA >ABKE> Askorik Asit > BHT şeklinde gerçekleşmiştir.



Şekil 4.5. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 µg/mL) KUPRAK metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması

4.2.2.Ferrik İndirgeme Kuvveti (FRAP) Bulguları

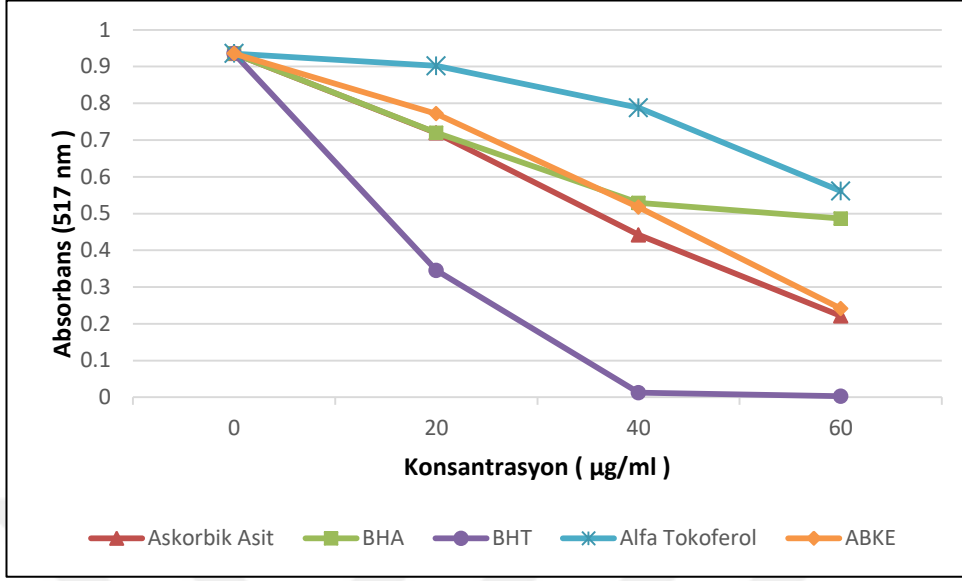
Çalışmamızda farklı derişimlerde (10 –20 – 30 µg/ml) çözeltiler 700 nm'de köre karşı asorbansları okunarak Fe^{+2} iyolarını indirgeme aktivitelerine bakılmıştır. Buna göre 30 µg/ml derişimde indirgeme aktiviteleri sırasıyla BHA > Askorbik Asit > ABKE> BHT şeklindedir.



Şekil 4.6. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (10 – 20 – 30 µg/mL) FRAP metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorbik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması

4.2.3.DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

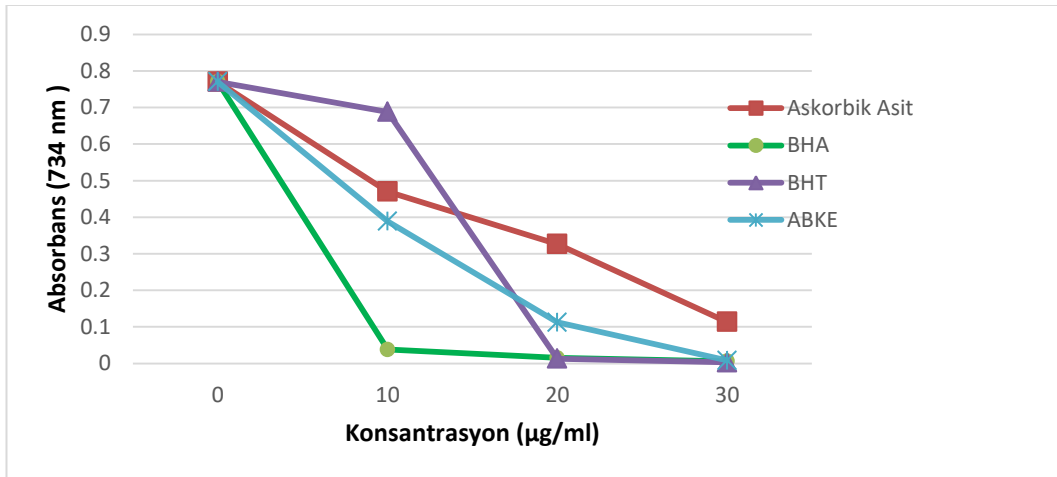
Çalışmamızda, 517 nm'de DPPH' indirgeme kapasiteleri 20 – 40 - 60 µg/ml konsantrasyonlarda, BHT > Askorbik Asit >ABKE> BHA > Alfa Tokoferol şeklinde gözlenmiştir.



Şekil 4.7. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 µg/mL) DPPH metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA, BHA ve α -Tokoferol) ile kıyaslanması

4.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

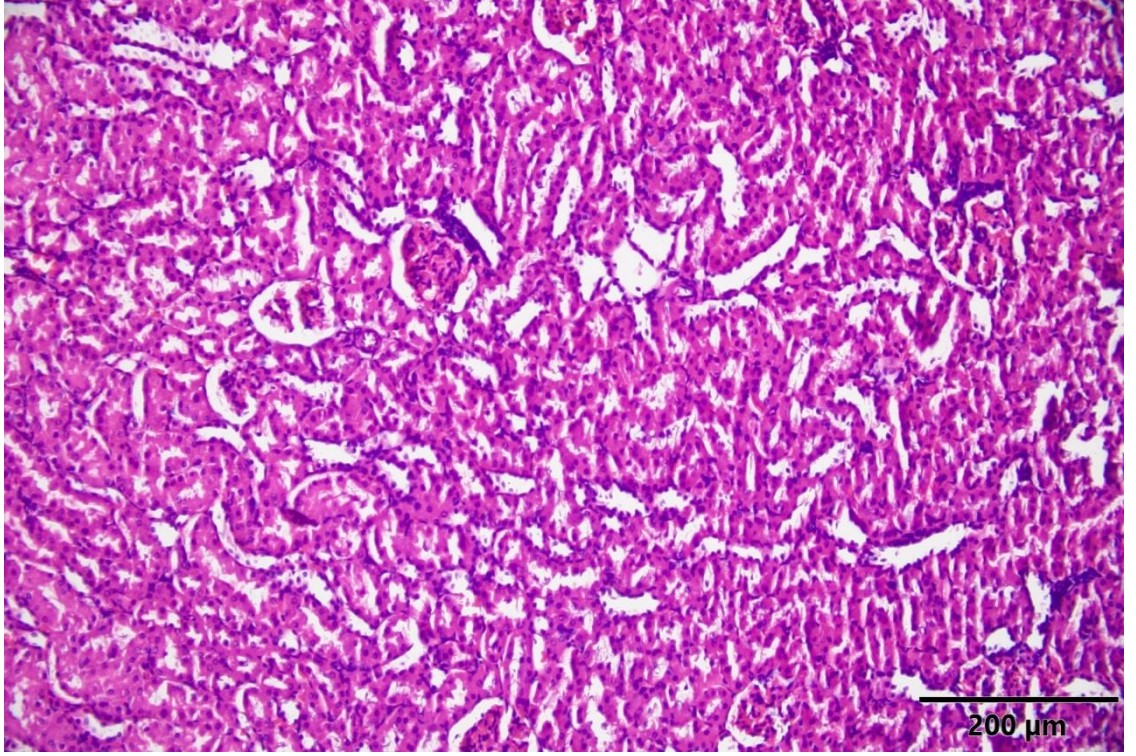
Yaptığımız çalışmada ABTS^{•+} indirgeme kapasiteleri 734 nm'de 10 -20 -30 µg/ml konsantrasyonda BHT > BHA > ABKE > Askorik Asit şeklindedir.



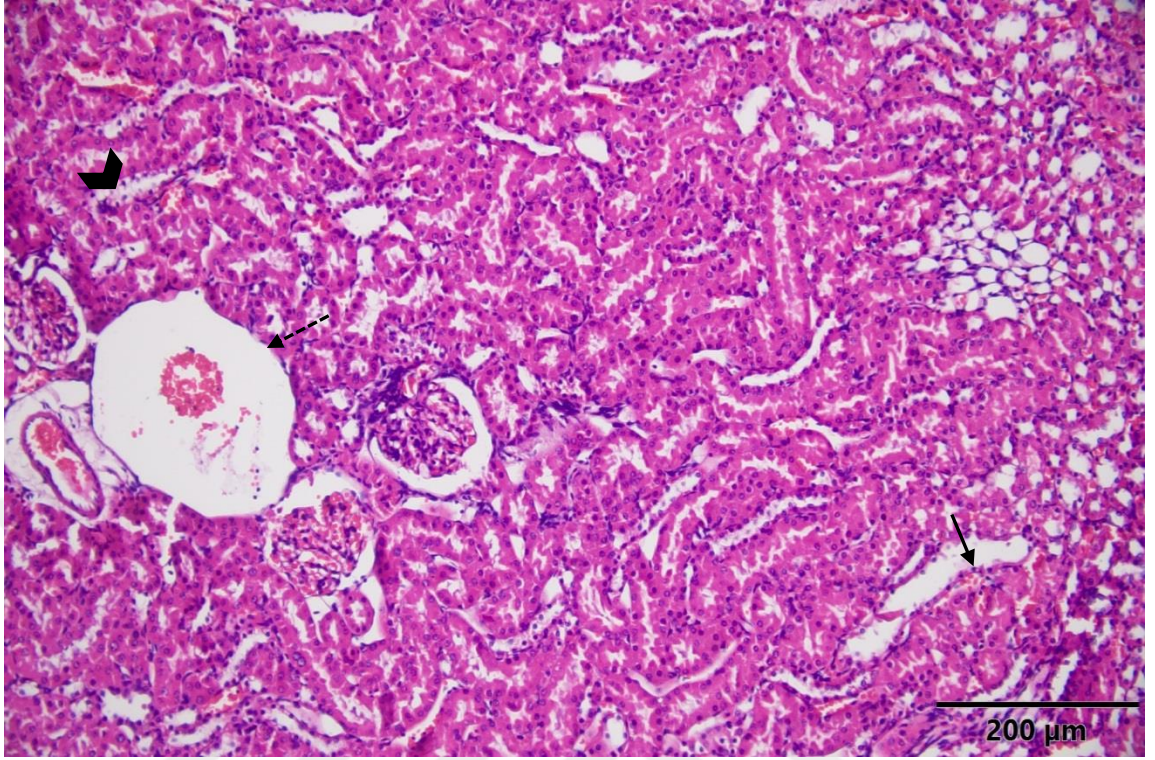
Şekil 4.8. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratı (ABKE)'nin farklı derişimlerde (20 – 40 – 60 µg/mL) ABTS metodu indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidanlar (Askorik Asit, BHA ve BHT) ile kıyaslanması

4.3.Böbrek Dokusunun Histopatolojik Değerlendirilmesi Bulguları

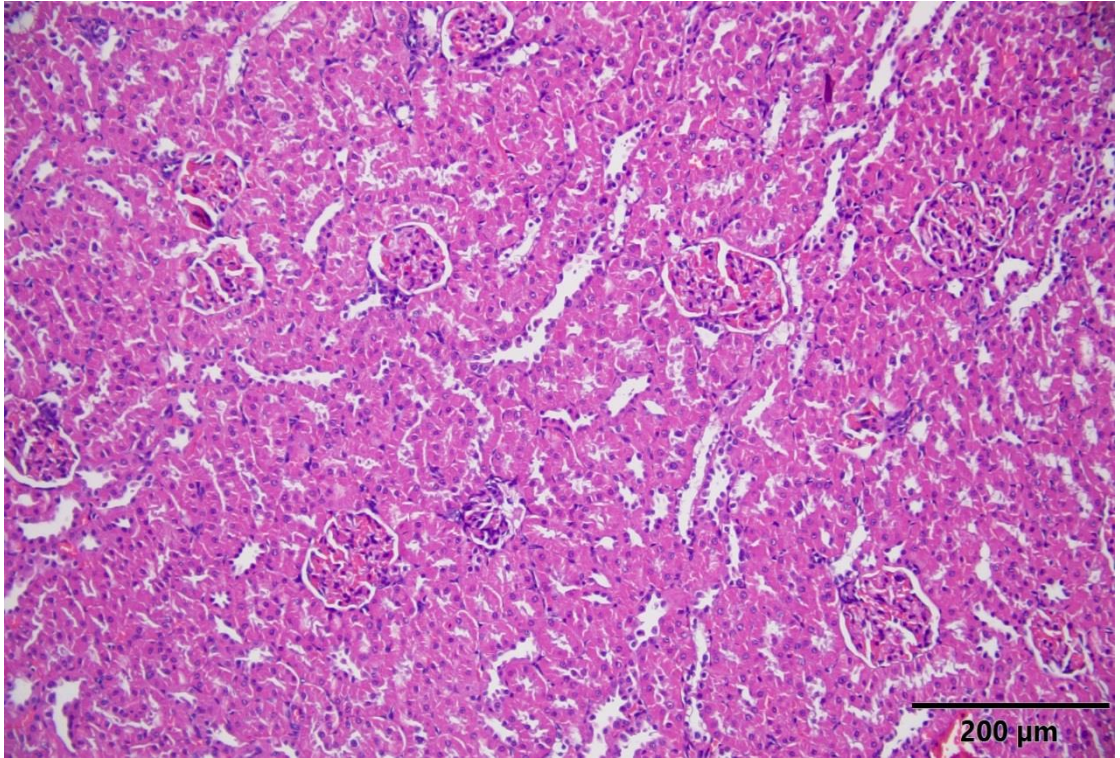
NK grubunda böbrek dokuları normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. Ancak DK grubundaki böbrek dokusunda tübüler ve vasküler dilatasyon, tübüler dejenerasyon gözlemlendi. DA ve DAB-2 gruplarında bu patolojik bulgular önemli derecede iyileştiği ve DAB-1 grubunda ise orta derecede iyileşme olduğu gözlemlendi.



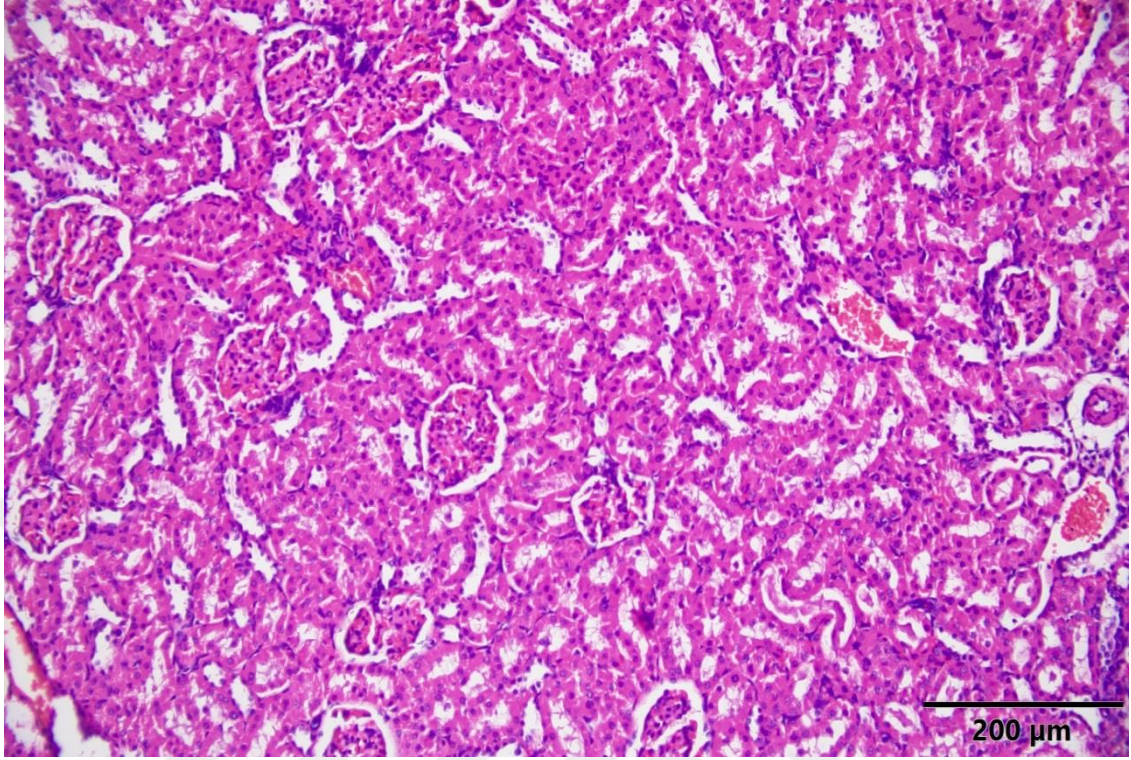
Şekil 4.9. NK grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü



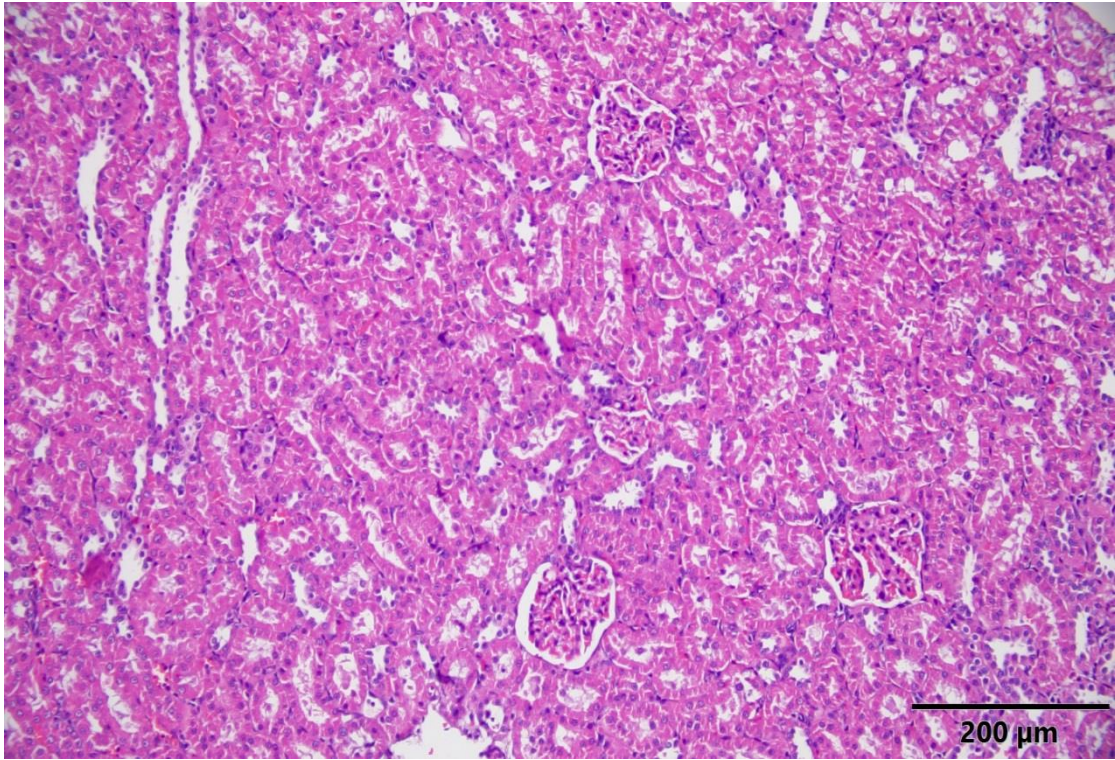
Şekil 4.10. DK grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü (Tübüler dilatasyon (ok), Vasküler dilatasyon (kesikli ok), tübüler dejenerasyon (okbaşı))



Şekil 4.11. DA grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü



Şekil 4.12. DAB-1 grubu böbrek dokusunun histolojik görünümü



Şekil 4.13. DAB-2 grubunun böbrek dokusu histolojik görünümü

4.4. Böbrek Dokusunda α -Glikozidaz ve α -Amilaz Enzim Aktivasyon Bulguları

Çizelge 4.7. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının böbrek dokusu protein miktarı ve α -glikozidaz enzim aktivasyonu üzerine etkisi

GUPLAR	AKTİVİTE (EU) α -glikozidaz Mean \pm Std	PROTEİN (mg/ml) Mean \pm Std	AKTİVİTE/PROTEİN Mean \pm Std
NK	0,186 \pm 0,008	130,509 \pm 27,704	0,0002 \pm 0,00008
DK	0,019 \pm 0,004	113,446 \pm 8,514	0,0003 \pm 0,00015
DA	0,008 \pm 0,001	135,964 \pm 20,168	0,00007 \pm 0,00001
DAB-1	0,011 \pm 0,0058	119,175 \pm 5,216	0,00009 \pm 0,00005
DAB-2	0,003 \pm 0,00083	95,002 \pm 4,017	0,00003 \pm 0,00001
P	a:0,627, b:0,008, c:0,755,d:0,010, e:0,009, f:0,952, g:0,011, h:0,037, I:0,817,İ:0,048	a:0,037, b:0,768, c:0,018,d:0,013, e:0,281, f:0,073, g:0,028, h:0,155, I:0,124,İ:0,548	a:0,37, b:0,013, c:0,558, d:0,022, e:0,064, f:0,215, g:0,090, h:0,051, I:0,244,İ:0,060

a:NK ve DK

b:NK ve DA

c:NK ve DAB-1

d:NK ve DAB-2

e:DK ve DA

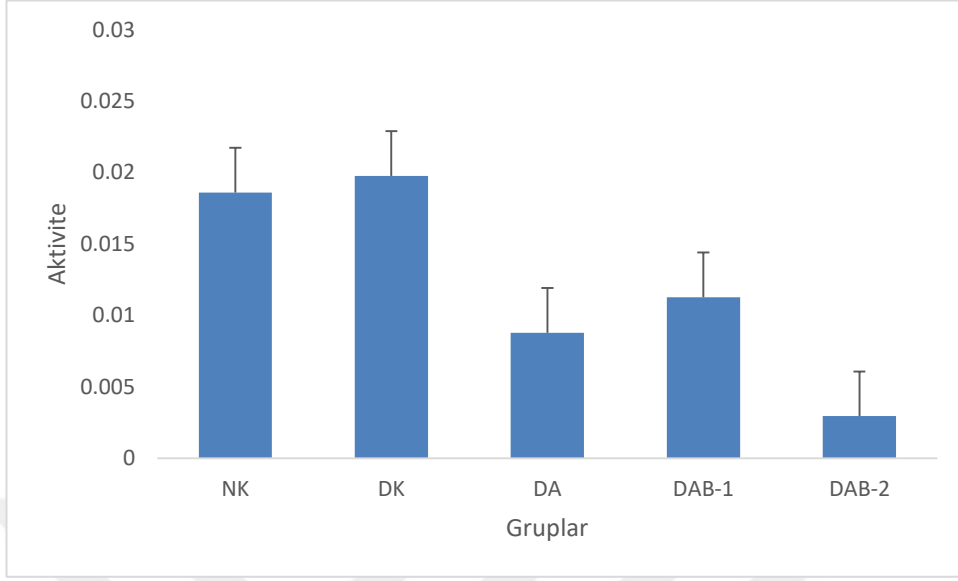
f:DK ve DAB-1

g:DK ve DA-2

h:DA ve DAB-1

I:DA ve DAB-2

İ:DAB-1 ve DAB-2



Şekil 4.14. Böbrek dokusundaki α -glikozidaz enzimi aktivasyon değerleri

Gruplar arası α -glikozidaz aktivitesi istatistiksel farkına bakıldığında sağlıklı NK ile DK ve DAB-1 grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) fakat kontrol grubuyla diğer gruplar arasında (DA ve DAB-2) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Bu farka bakıldığında, α -glikozidaz aktivitesi kontrol grubuna göre DA ve DAB-2 gruplarında daha düşük tespit edildi.

DK, α -glikozidaz aktivitesi ise DAB-1 ile istatistiksel bir fark tespit edilmez iken ($p>0.05$), DA ve DAB-2 ile anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Bu istatistiksel farkta, DA ve DAB-2 gruplarda α -glikozidaz aktivitesi daha düşük tespit edildi

Öte yandan; DA, α -glikozidaz aktivitesi DAB-1'den daha düşük bulunur iken ($p<0.05$), DAB-2 ile anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Son olarak α -glikozidaz aktivitesi DAB-1'e göre DAB-2'de daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

Gruplar arası total protein düzeyinde, NK ve DA arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken, NK istatistiksel olarak diğer gruplardan (DK, DAB-1 ve DAB-2) daha yüksek protein düzeyine sahipti.

Gruplar arası Aktivite(α -glikozidaz)/Protein ilişkisinde, sağlıklı ile DK ve DAB-1 arasında anlamlı bir fark görülmez iken ($p>0.05$), kontrol grubu (DK) ile diğer gruplardan DA ve DAB-2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Aktivite(α -glikozidaz)/Protein ilişkisinde ise DK, DAB-1 ile istatistiksel bir fark tespit

edilmez iken($p>0.05$), DA ve DAB-2 ile anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Yine, Aktivite(α -glikozidaz)/Protein DAB-2 ya göre DAB-1’de daha yüksek belirlendi.

Çizelge 4.8. *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi kök ekstratının böbrek dokusu protein miktarı ve α -amilaz enzim aktivasyonu üzerine etkisi

Gruplar	Aktivite (EU) α -amilaz Mean \pm Std	Protein (mg/ml) Mean \pm Std	Aktivite/Protein Mean \pm Std
NK	0,028848 \pm ,0112189	126,06375 \pm 20,0874385	0,0002086 \pm 0,00004284
DK	0,025504 \pm ,0034106	113,4466 \pm 8,5146441	0,0002381 \pm 0,00004590
DA	0,016892 \pm ,0036284	135,964 \pm 20,1689103	0,0001457 \pm 0,00003876
DAB-1	0,087500 \pm 0,0530625	116,023800 \pm 5,1239919	0,0002888 \pm 0,00003158
DAB-2	0,018823 \pm 0,0054532	94,9984 \pm 3,1116423	0,0002002 \pm 0,00005896
P	a:0,082, b:0,086, c:0,107, d:0,219 e:0,853, f:0,040 g:0,646, h:0,039 I:0,590, İ:0,045	a:0,193, b:0,940 c:0,063,d:0,030 e:0,281,f:0,094 g:0,011, h:0,124 I:0,073,İ:0,239	a:0,528, b:0,987 c:,804, d:0,580 e:0,520, f:0,305 g:0,861, h:0,830 I:0,545,İ:0,425

a:NK ve DK

b:NK ve DA

c:NK ve DAB-1

d:NK ve DAB-2

e:DK ve DA

f:DK ve DAB-1

g:DK ve DAB-2

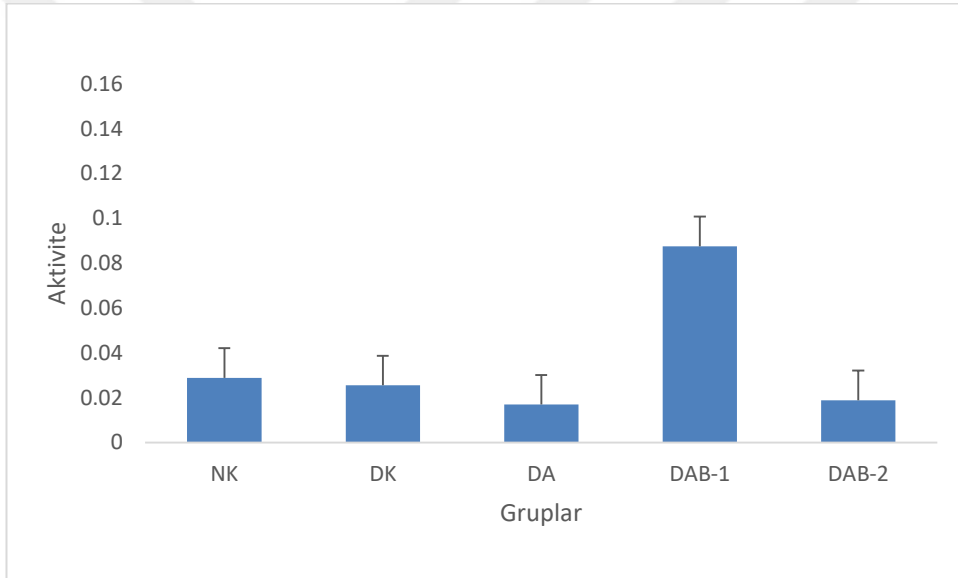
h:DA ve DAB-1

I:DA ve DAB-2

İ:DAB-1 ve DAB-2

Gruplar arası α -amilaz aktivitesinin istatistiksel analizinde, sağlıklı (NK) grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). DAB-1 diğer tüm gruplara göre daha yüksek aktivite belirlendi. DAB-1 istatistiksel olarak NK hariç diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Gruplar arası total protein düzeyinde ise, DAB-2 hem NK'den hem de DK'den istatistiksel olarak daha düşük bulunur iken, diğer gruplar arasında herhangi bir fark tespit edilmedi. Ayrıca gruplar arası Aktivite(α -amilaz)/Protein ilişkisine bakıldı ve gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 4.15. Böbrek dokusundaki α -amilaz enzimi aktivasyon değerleri

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı (ABKE)'nin alfa glikoziyaz ve alfa amilaz enzimleri üzerinde inhibisyon çalışmalarına bakıldı. Antioksidan özellik göstergesi özellikleri için farklı durumlardaki antioksidan kapasitesi ölçüldü. STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlara 28 gün boyunca *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı verildi.

Bitkiler, küresel çapta yaygın olarak gözlenen diyabet hastalığını önlemede ve tedavi etmede başvurulan önemli etmenlerdendir. Günümüzde kullanılan hipoglisemik ilaçlar, kan glikoz düzeyini normale döndürür ancak gastrointestinal rahatsızlıklara yol açabilir. Bu yüzden kan glikoz düzeyini kontrol altında tutmak için, alfa amilaz ve alfa glikoziyazı ihhibe eden ilaçların bulunması önemlidir.

Çalışmamızda; *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının alfa amilaz ve alfa glikoziyaz üzerindeki inhibisyonu üzerinde IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri; deneyde kullanılan ekstratların aktivitesini %50 oranında ihhibe ettiği numune ekstratlarının konsantrasyonunu belirtmektedir. Bir test örneğinin düşük IC₅₀ değeri daha yüksek inhibisyon gösterdiğinin işaretidir.

Kızıltaş vd. (2021)'in *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin buharlaştırılmış etanol ekstratı ile yaptıkları çalışmada α-glikoziyaz enzimi üzerinde 0,620 µg/mL, α-amilaz enzimi üzerinde 0,306 µg/mL IC₅₀ değerleri gözlenmiştir.

Keskin ve Kaya (2021)'nin *Gundelia tournefortii* L. bitkisi üzerine yaptıkları çalışmada; 0,1 M pH: 6,8 fosfat tamponunda, substrat olarak p - nitrofenil - α - D - glukopiranozit kullanılmış, 5 µL substrat, enzim çözeltisi (0,1 U), 900 µL fosfat tamponu karışımına 405 nm'de α-glikoziyaz enzimi üzerinde 20 µL bitki ekstratı ve akarboz ilavesi sonucu IC₅₀ değerleri sırasıyla 9,77 mg/mL ve 3,56 mg/mL bulunmuştur. α-amilaz enzimi inhibisyonu üzerine ise bitki ekstratı ve akarboz IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,18 mg/mL ve 3,21 mg/mL şeklinde gözlenmiştir.

Çalışmamız sonucuna elde ettiğimiz bulgular (Çizelge 4.5.) *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının ve Akarboz molekülünün, α-Glikoziyaz enzimi üzerinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 12,84 mg/mL ve 19,25 mg/mL şeklinde gözlenmiştir. α-Amilaz enzimi üzerinde IC₅₀ değerleri *Astragalus bracycalyx* Fischer

bitkisinin kök ekstratı 13,59 mg/mL, akarboz molekülü 18,73 mg/mL değerleri ölçülmüştür.

Elde ettiğimiz IC₅₀ değerleri, güçlü bir alfa glikozidaz ve alfa amilaz inhibitörü olan akarboz ile kıyaslanmıştır. Bu durumda *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı, hem α-glikozidaz hem de α-Amilaz aktivasyonları üzerinde akarboz molekülüne göre daha yüksek bir inhibisyon göstermiştir.

Oksidatif stres, tip2 diyabet de dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olur. Yapılan birçok çalışmada fenolik içeriklerin güçlü antioksidan özellik gösterdiği ve serbest radikallere karşı süpürücü etki sergilediği bilinmektedir(Sakulnarrat ve Konczak, 2012; Mai vd. 2007). Antiosidanlar, diyabette bozulan oksidatif stresin, protein glikasyonunun ve glikoz metabolizmasının düzelmesinde önemli etkiler gösterdiği bilinmektedir (Altan vd. 2006).

Kızıлтаş vd. (2021)'in *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin buharlaştırılmış etanol ekstratı (EEAB)'nın antioksidan özelliğini belirlemek için CUPRAC, FRAP, DPPH ve ABTS metodlarına göre bulgular şu şekildedir. KUPRAC metodunda Cu²⁺ indirgeme kapasiteleri BHT (1,561 ± 0,089, r²: 0,9978) > Askorbik Asit (1,069 ± 0,007, r²: 0,9722) > α-Tokoferol (0,785 ± 0,061, r²: 0,9986) > EEAB (0,598 ± 0,108, r²: 0,9808) şeklinde gözlenmiştir. FRAP metoduna göre sırasıyla Askorik Asit (1,624 ± 0,015, r²: 0,9930) > BHT (0,909 ± 0,006, r²: 0,9874) > α-Tokoferol (0,755 ± 0,075, r²: 0,9867) > EEAB (0,521 ± 0,108, r²: 0,9808) şeklindedir. DPPH metouna göre; Askorbik Asit (16,116 ± 0,003, r²: 0,9866) > α-Tokoferol (23,1 ± 0,032, r²: 0,9825) > BHT (31,5 ± 0,011, r²: 0,9754) > EEAB (115,5 ± 0,030, r²:0,9769)sıralaması gözlenmiştir. ABTS metoduna göre; α-Tokoferol (15,400 ± 0,03, r²: 0,9866) > EEAB (16,116 ± 0,069, r²: 0,03) > Askorbik Asit (23,10 ± 0,001, r²: 0,9998) > BHT (26,654 ± 0,030, r²: 0,9769) şeklindedir. Bu çalışma *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisi etanol ekstratının antioksidan kapasitesi, fenolik ve flavonoid içeriğiyle ilgili olarak standart antioksidanlarla kıyaslandığında yakın bir etki gösterdiği belirtilmiştir.

Siahpoosh vd. (2010)'nı *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırladıkları dört farklı ekstratın (metanol, kloroform, polifenol ve su) antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH ve TEAC testlerini uygulamışlardır. DPPH ve TEAC tahlilleri sonuçları belirli zaman noktalarında IC₅₀ ve TEAC değerleri

ifade edilmiştir. Bulgular; metanolik, kloroformik, polifenolik ve sulu ekstratlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.625, 0.827, 0.193 ve 0.279 mg/mL bulunmuştur. Ekstratların 2, 4 ve 6 dakikalık reaksiyonlardaki TEAC değerleri 22.29, 11.20, 17.06, 49.42; 20.07, 12.33, 18.47, 51.56; 25.19, 12.76, 18.78, 52.61 µmol Troloks eşdeğeri/100 g gözlenmiştir. Bu değerler *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırladıkları ekstratların her iki yöntemle ölçüldüğünde antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Polifenolik ekstratın DPPH testinde maksimum aktiviteye sahip olduğu, TEAC testinde ise sulu ekstratlarının maksimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Antioksidanlar, oksidatif stresi engellemek için terapötik araçlar olarak kullanılabilir (Liu vd. 2017). Zeng vd. (2016)'nın yaptıkları çalışmada antioksidan etki gösteren bazı fenolik bileşiklerin α-glikoziaz inhibitör etkisi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, *Astragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratını DPPH, CUPRAC, FRAP e ABTS olmak üzere antioksidan etkisini farklı yöntemlerle gözlemlendi. Bu ölçümlerde antioksidan özellik gösterdiği bilinen Askorbik Asit, BHA, BHT ve alfa-tokoferol kullanıldı.

Çalışmamızda, DPPH yönteminde; spektrofotometrede 517 nm'de asorbans değeri veren DPPH' serbest radikali kullanıldı. DPPH', antioksidanlarla reaksiyona girerek, serbest radikal olmayan DPPH-H oluşur. Böylelikle hazırlanmış olduğumuz DPPH çözeltisinin mor/menekşe rengi antioksidan yoğunluğa bağlı olarak değişim gösterir, ölçülen değerler sonucunda *Astragalus bracycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı diğer antioksidanlarda kıyaslandığında 60 µg/ml'deyüksek düzeyde DPPH' serbest radikali süpürücü etkisi göstermiştir.

ABTS analizi; ABTS^{•+} radikal katyonunun antioksidanlar tarafından 734nm'de absorbanısının engellenmesi temeline dayanır. Deney bulguları sonucunda 30 µg/ml'de *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı standart antioksidanlara yakın bir etki göstermiştir.

CUPRAC metodunda; kuprik iyonlarının (Cu⁺⁺), kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgenmesi temeline dayanır. 450 nm absorbansta *Astragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratı, BHA'dan düşük, BHT ve Askorbik Asitten daha fazla antioksidan etki gösterdiği gözlenmiştir.

FRAP; Fe(III)'ü Fe(II) tripiridiltriazin [Fe(II) - TPTZ] kompleksine indirgenmesi mantığına bağlı olarak 593 nm'de absorbans veren bir metottur. FRAP metoduna göre *Astragalus brachycalyx* Fischer kök ekstratı, Askorbik Asit ve BHA'dan daha düşük, BHT'den daha yüksek antioksidan özellik göstermiştir.

Diyabette, oksidatif strese neden olan serbest radikal artışı, antioksidan savunma mekanizmasındaki aksaklıklarda kaynaklanır. Serbest radikal miktarının diyabet ile artması, diyabette antioksidanlara daha fazla ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir(Dogukan, 2010).

Tüm deneyler üç ayrı tekrar şeklinde yapılarak DPPH, ABTS, KUPRAK ve FRAP antioksidan kapasite metotlarına göre kıyaslanmıştır. Deney sonuçlarına göre *Astragalus Brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının yüksek oranda antioksidan özellik sergilediği gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada, deney çalışmalarında en fazla tercih edilen hayvanlardan *Wistar albino* sıçanları tercih edildi. *Wistar albino* sıçanları; insanlarla olan metabolik benzerlikleri, laboratuvar ortamına adaptasyonları, kısa gebelik süresi, birim alanda daha çok sayıda yetiştirilebilmesi ve ömürlerinin kısa olması nedeniyle tercih edilmişlerdir(Van Zutphen vd., 2003).

Tip2 diyabetli hastalarda gözlenen kandaki yüksek glikoz yoğunluğuyla karakterie edilen duruma hiperglisemi denir. Hiperglisemi, artmış kan basıncı seviyeleri ve genetik yatkınlık nefropati gelişimi için ana risk faktörleridir. Hiperglisemi doğrudan veya hemodinamik modifikasyonlar yoluyla böbrek hasarına neden olur. Protein Kinaz – C aktivasyonu, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin üretimi ve diasilgliserol sentezini arttırır. Ayrıca glomerüler hiperfiltrasyon, kayma stresi ve mikroalbuminüri gibi hemodinamik değişikliklerden sorumludur. Bu değişiklikler glomerüler ve tübüler bölgelerde hücre dışı protein irikimine neden olarak mezangiyal genişlemeye ve glomerüler bazal membran kalınlaşmasına neden olur(Schena ve Loreto, 2005).

Diyetik Nefropati (DN), kronik hipergliseminin böbreğin çeşitli hücre tüplerinde işlev bozukluğuna neden olduğu ve sonuçta ilerleyici böbrek yetmezliğine yol açtığı metabolik bir bozukluk olan, diyabetli hastalarda gözlenen bir mikrovasküler komplikasyondur. Glomerüler podositler, mezangiyal ve endotel hücreleri, tübüler epitel, interstisyel fibroblastlar ve vasküler endotel dahil olmak üzere böbreğin tüm

hücre tiplerinin ddeğişen derecelerde de olsa hiperglisemik hasardan etkilendiği bilinmektedir.

Özcan (2009)'ın yaptığı çalışmada STZ ile diyabet oluşturulmuş Albino wistar sıçanlarının böbrek dokusu üzerine *Myrtus communis* bitkisinin tedavi edici etkileri gözlenmiştir. Biyokimyasal analizler sonucunda, diyabetik sıçanlarda bitki ekstratının böbrek fonksiyonlarında iyileşme olduğu gözlenmiştir. Edinilen bilimsel veriler, diyabetle oluşan böbrek fonksiyonları bozukluğunun giderilmesinde yeni doğal tedavi yöntemlerinin faydalı olacağına değinilmiştir.

Yaman ve Doğan (2016)'ın *Quercus branti* Lindl. (Meşe Palamudu) bitkisinden elde ettikleri ektrat, STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlara 21 gün boyunca gavaj yoluyla verilmiştir. Deney sonucunda Meşe Palamudu bitki ekstratının antioksidan aktivitesinden dolayı karaciğer ve pankreasta meydana gelen hasarı önlediği görülmüştür.

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlar üzerinde yaptığımız çalışmada; böbrek dokusunun histopatolojik incelenmesinde NK grubunun normal histolojik özellikler gösterdiği, DK grubunda tübüler ve vasküler dilatasyon, tübüler dejenerasyon gözleendiği ve bunların DAB-1 grubunda kısmen, DA ve DAB-2 gruplarında önemli derecede iyileştiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda; böbrek dokusu üzerinde α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerinin aktiviteleri incelendi. Gruplar arası α -glikozidaz aktivitesinin farkına bakıldığında DA ve DAB-2 gruplarında aktivasyon daha düşük tespit edilmiş olup diğer gruplarla anlamlı bir fark görüldü($p>0,05$). Gruplar arası α -amilaz aktivitesinin analizinde sağlıklı grup ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

α -glikozidaz ve α -amilaz inhibitörleri karonhidratların sindirimini engelleyerek veya geciktirerek kan şekeri seviyesinin kontrol altına tutulmasını sağlar.

α -glikozidaz ve α -amilaz inhibitörleri Tip2 diyabet hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde Akarboz molekülü Tip2 diyabet hastalarının kullandığı ilaçlarda bulunmaktadır. Ancak bu ilaçların yan etkilerinden dolayı bitkisel kaynaklı ilaçlara yönelik çalışmalar son dönemlerde artış göstermiştir.

Çalışmamızda *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibisyonları IC₅₀ değerleri spektrofotometrik yöntemle çalışıldı ve standart inhibitör olarak kullanılan Akaroz molekülü ile kıyaslandı. Sonuçlar mg/mL düzeyde literatüre uygun olarak bulundu.

Astragalus brachycalyx Fischer bitkisinin kök ekstratının antioksidan etkinliğini gözlemek için; ABTS, KUPRAK, FRAP ve DPPH yöntemleri çalışıldı. Standart antioksidanlar olarak askorbik asit, BHA ve BHT ile kıyaslandı. Veriler doğrultusunda *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının yüksek antioksidan etki göstermiştir.

İn vivo çalışmada denesel olarak STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının böbreklerdeki iyileştirici etkisine bakıldı. Böbrek histopatoloji sonuçlarına bakıldığında *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratının, diyabete bağlı olarak oluşan hasarları giderdiği gözlenmiştir.

Böbrek doku homojenatlarında α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerinin aktivite ölçümleri yapıldı. α -glikozidaz enziminin aktivitesinin, *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin kök ekstratı uygulanan gruplarda, Akarboz molekülü verilen grup ile kıyaslandığında anlamlı bir düşüş olduğu gözlenmiştir. α -amilaz enzim aktivite ölçümünde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda in vitro ve in vivo koşullarda elde edilen sonuçlara göre , *Astragalus brachycalyx* Fischer bitkisinin etken maddelerinin izole edilip belirlenerek, diyabetik nefropati komplikasyonlarının ilerlemesinin engellenmesinde alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğini önermekteyiz.

KAYNAKÇA

- Özcan F, 2009. *Diyabete bağlı olarak geliştirilmiş nefropatili rat modelinde Myricetin'in ve Mersin bitkisinin ekstratlarının böbrek dokusu üzerine etkisi.* Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Dogukan A, Tuzcu M, Jutury V, vd., 2010. *Effect of chromium histidinate on renal function, oxidative stress and heat-shock proteins in fat-fed streptozotocin-treated rats.* J Nutr.20: 112-120
- Leborvitz H.E., 1995. *A New Oral Therapy sfor Diabetes Management: Alpha Glucosidase İnhibition Wit Acarbose.* Clinic Diaetes 13 (6): 99-104.
- Liu S., Ai Z., Du F., Chen Y., Ni D. 2017. *Effect of Steeping Tempature On Antioxidant and İnhibitory Activites Of Green Tea Extracts Aganist Alpa-Amylase, Alpha-Glucosidase and İntestinal Glucose Uptake.* Foo Chem, 234:168-173.
- Mai TT, Thu NN, Tien PG, Van Chuyen N., 2007. *Alpha-Glucosidase İnhibitory and Antioxidant Activities of Vietnamese Edile Plants an Their Relationship ith Polyphenol Contents.* J Nutr Sci Vitaminol. 53 (3): 267-276.
- Schena P, Loreto G., 2005. **Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy.** Journal of The American Society of Nephrology. 16 (3-1); 30-33.
- Sakulnarmrat K, Konczak I., 2012. *Composition of Native Australian Herbs Polyphenolic-Rich Fractions and İn-vitro İnhibitory Activities Aganist Key Enzymes Relevant to Metabolic Syndrome.* Food Chemistry. 134 (2):1011-1019.
- Yaman T, Doğan A. 2016. Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Meşe Palamudu (Quercus branti Lindl.) Ekstratlarının Karaciğer ve Pankrestaki Koruyucu Etkileri. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi.* 1 (2); 7-15.

- Zeng B., Chen K., Du P., Wang S.S., Ren B., Ren Y.L., Yan H.S., Liang Y., Wu F.H. 2016. *Penolic Compounds from Clinopodium Chinense (Benth) Kuntze and Their Inhibitory Effect on Alpha-Glucosidase and Vascular Endothelial Cell Injury*. Chemistry&Biodiversity. 13(5): 566-601.
- Chen G. And Guo M. 2017. *Rapid Screening for alpha-glucosidase from Gymnema sylvestre by Affinity Protocols –HPLC-MS*. Front. Pharmacol, 8; 228-236.
- Kalra S. 2014. Alpha-glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association*.64, (4); 474-476.
- Halliwel B. 1996.*Antioxidants in Human Health and Disease. Annual review of nutrition*.16: 33-50
- Salar U., Taha M., Khan K.M., İsmail N.H., İmran S., Perveen S., Gül S., Wadood A. 2016. *Syntheses of new 3-thiazyl coumarin derivatives, in vitro alpha-glucosidase inhibitory activity and molecular modeling studies*. Eur. J. Med. Chem. 122; 196-204
- Kim J.H., Cho C.W., Kim H.Y., Kim K.T., Choi G.S., Kim H.H., Cho I.S., Kwon S.J., Choi S.K., Yoon J.Y., Yang S.Y., Kang J.S., Kim Y.H. 2017. *Alpha-Glucosidase Inhibition by Prenylated and Lavandulyl Compounds from Saphora flavences Roots and in Silico Analysis*. Int. J. Biol. Macromol, 102; 960-969.
- McDonald, A.G., Tipton, K.F. 2021. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS Journal*. 16274.
- Koshland Jr, D. E. 1995. *The key-lock theory and the induced fit theory*. Angewandte Chemie International Edition in English, 33 (23-24), 2375-2378.
- Türkan, F. 2015. *Karayemiş Meyvesinden (Prunus laurocerasus L.) Glutamat S-Transferaz enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum. 130.
- Nelson, D., Cox M. M. 2013. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, (Çev.Ed. Y. M. Elçi), Ankara: Palme Yayınevi.

- Ferrrier, D. R. 2019. *Lippincott Biyokimya: Görsel Anlatımlı Çalışma Kitabı* (Çev. E. Ululkaya). İzmir: Nobel Tıp Kitabevi.
- Topal, Ş., 1985. *Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye rennin'in yeri*. Gıda, 10, (1); 15-37.
- Robinson, P.K. 2015. *Enzymes: principles and biotechnological applications*. Essays in Biochemistry, 59; 1-41.
- Wu X., Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53, 10; 4290-4320
- Shinde A., Ganu J., Naik P. 2012. Effect of Free Radicals and Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Sciences*; 1 (2): 63-66.
- Petersmann A., Müller-Wieland D., Müller U. A., Landgraf R., Nauck M., Freckmann G., Heinemann L., Schleicher E. 2019. *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*; 127;1. 1-7
- American Diabetes Association, 2018. *Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes*. 41: 13-27
- Stumvoll M., Goldstein B.J., van Haeften T. W. 2005, Diabetes: *Principles of pathogenesis and therapy*, Lancet, 365: 1333-1346
- Zimmet P., Albert K. G., Shaw J. 2001, *Global and societal implications of the diabetic epidemic*. Nature, 414: 782-787
- Galicía García U., Benito Vicente A., Jebari S., Larrea Sebal A., Siddiqi H., Uribe K. B., Ostolazo H., Martín C., 2020, Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21 (17), 6275
- Chatterjee S., Khunti K., Melanie J. D., 2017, *Type 2 Diabetes*, The Lancet, 389/10085:2239-2251

- Katsarou A., Gudbjörnsdottir S., Rawshani A., Dabelea D., Bonifaio E., Anderson B. J., Jacobsen L.M., Schatz D.A., Lernmark A.,20117,*Type 1 Diaetes Mellitus*, Nature Reviews Disease Primers, 3, 17016.
- Gregory J.M., Moore D.J., Simmons J.H.,2013,*Type 1 Diabetes Mellitus*, Pediatrics in Review, 34(5); 203-215)
- American Diabetes Association, Diabetes Care, 2014; 37: 81-90
- Lim DH, Choi DB, Choi OY, Cho KA, Kim KA, Choi HS.,2011,*Effect of Astragalus sinicus L. extract on antioxidant activity*. J Ind End Chan; 17: 510-516.
- Teyeb H., Zanina N., Neffati M., Doubi W., Najjar MF.,2012, Cytotoxic and antibacterial activities of leaf extracts of *Astragalus gombiformis* Pomel (Fabaceae) growing wild in Tunisia. *Turk J Biol.* 36: 53-58.
- Bedir E., Pugh N., Calıs I., Passo DS., Khan IA.,2000, *Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from Astragalus species*. Biol Pharm Bull. 23: 834-837
- Albayrak S., Kaya O.,2018, Antioksidant and antimikrobial activities of our *Astragalus* species growing wild in Turkey. *Turk J Biochem.* 2018; 43 (4): 425-434
- Podlech, D.,2008,*Eski Sovyetler Birliği Hariç Tutularak Avrupa’da Astragalus L.* (Fabaceae) cinsi. Feddes Repertuarı, 119: 310-387.
- Davis PH. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Ebinburgh University Press, 1970:3, 49-168.
- Ekici M., Aytaç Z.,2008,*Akan M., Pınar M. A new species Astragalus L.* from Turkey, Bot J Linn Soc; 157: 741-747
- Dinç, M., Aytaç, Z. Doğu, S.,2013, Türkiye’den yeni bir *Astragalus* (Fabaceae) türü. *Türk Botanik Dergisi.* 37. 5: 801-846.
- Kadioğlu, B., Kadioğlu S., Turan, Y.,2008, Gevenlerin (*Astragalus* sp.) Farklı Kullanım Alanları ve Önemi. *Alınteri Ziraii Bilimler Dergisi.* 14.1: 17-26