



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI BİTKİLERDE HİPERGLİSEMİ VE  
DİYABETİK KOMPLİKASYONLARIN  
ENGELLENMESİNDE ETKİN OLABİLECEK  
FENOLİK YAPIDA BİLEŞİKLERİN İNCELENMESİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

**Gonca ÇETİN**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 09.08.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BAZI BİTKİLERDE HİPERGLİSEMİ VE DİYABETİK  
KOMPLİKASYONLARIN ENGELLENMESİNDE ETKİN  
OLABİLECEK FENOLİK YAPIDA BİLEŞİKLERİN  
İNCELENMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Gonca ÇETİN**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 09.08.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**



Gonca ÇETİN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Bazı Bitkilerde Hiperglisemi ve Diyabetik Komplikasyonların Engellenmesinde Etkin Olabilecek Fenolik Yapıda Bileşiklerin İncelenmesi ve Karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Prof.Dr. Figen ZİHNİOĞLU  
**Raportör Üye** : Doç.Dr. Burcu OKUTUCU  
**Üye** : Dr.Öğr. Üyesi Halil KOYU





## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Bitkilerde Hiperglisemi ve Diyabetik Komplikasyonların Engellenmesinde Etkin Olabilecek Fenolik Yapıda Bileşiklerin İncelenmesi ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09/08/2018

Gonca ÇETİN



**ÖZET****BAZI BİTKİLERDE HİPERGLİSEMİ VE DİYABETİK  
KOMPLİKASYONLARIN ENGELLENMESİNDE ETKİN  
OLABİLECEK FENOLİK YAPIDA BİLEŞİKLERİN İNCELENMESİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

ÇETİN, Gonca

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Temmuz 2018, 69 sayfa

Diyabet, hiperglisemi ve insulin dirençliliği ile karakterize edilen multifaktöriyel, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Her geçen gün dünya popülasyonunda hastalığa maruz kalan kişilerin artması ile gerek hastalığın oluşumunun engellenmesi gerekse yeni tedavilerin geliştirilmesi bir zorunluluk halini almıştır. Son yıllarda birçok doğal kaynaktan diyabet tedavisinde kullanılabilecek ve farklı mekanizmalar üzerinden etkin olabilecek bileşiklerin incelenmesine ilgi artmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen tedavi edici etkiye sahip bileşikler sentetik orijinli olanlara oranla düşük toksisite, fizyolojik koşullarda yüksek kararlılık ve yeni ilaçların dizaynı için çeşitli kimyasal yapıları içermeleri açısından avantajlıdır. Bu amaçla birçok bitki ekstresi gerek fitokimyasal gerekse biyolojik etkinlikleri açısından araştırılmış olup bitkisel kaynaklarda yapılan çalışmalarda benzeri etkileri gösteren polifenolik bileşiklerin ağırlıkta olduğu çok sayıda çalışma mevcuttur. Fenolik bileşikler çok etkin olmakla birlikte kullanım dozları ayarlanmadığında veya ekste olarak alındıklarında bazı sağlık problemlerine neden olduklarından dolayı tartışılmaktadırlar.

Bu çalışma kapsamında *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), *Hypericum* sp. (Sarı kantaron), *Calendula* sp. (Aynı sefa) ve *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) ekstrelerinin fitokimyasal testleri, fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi, antioksidan etkinliği ve diyabet ile ilgili çeşitli biyolojik etkinliklerinin incelenmesi ve karakterizasyonu hedeflendi.

Tüm bitki ekstralarının fenolik bileşiklerce zengin olduğu gözlemlendi. Hibiskus ekstralarında antioksidan etkinlik, lipoksigenaz ve  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu; Sarı kantaron ekstralarında antioksidan ve deglukasyon etkinlik,  $\alpha$ -glukozidaz ve dipeptidil peptidaz 4 inhibisyonu; Aynı sefa ekstralarında antioksidan ve metal şelatlama etkinliği; Karayemiş ekstralarında ise antioksidan, metal şelatlama ve deglukasyon etkinlik,  $\alpha$ -glukozidaz,  $\alpha$ -amilaz ve dipeptidil peptidaz 4 inhibisyonu gözlemlendi.

Sonuç olarak her bitki ekstresinde, diyabet ve komplikasyonları ile ilişkili birden fazla biyolojik etkinlik gözlenmesi nedeni ile diyabet ve komplikasyonlarının önlenmesinde potansiyel ilaç etken maddeleri için kaynak olabilecekleri ancak bu amaca yönelik olarak etken madde saflaştırılması ve yapı tayini, *in vitro* ve *in vivo* kinetik çalışmalar vb. ileri düzeyde çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğu açıktır.

**Anahtar sözcükler:** Diyabet, fenolik bileşikler, antioksidan, enzim inhibisyonu

**ABSTRACT****INVESTIGATION AND CHARACTERISATION OF PHENOLIC COMPOUNDS THAT CAN BE EFFECTIVENESS OF PREVENTION OF HYPERGLYCEMIA AND DIABETIC COMPLICATIONS IN SOME PLANTS**

ÇETİN, Gonca

MSc in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

July 2018, 69 pages

Diabetes mellitus is multifactorial and chronic disease which is characterized with hyperglycemia and insulin resistance. Because of increasing numbers of people exposed to the disease in the world population, preventing the formation of the disease and developing new treatments has become a necessity. In recent years, there is an increased interest in the study of compounds from many natural sources that can be used in diabetes treatment. The therapeutically active compounds obtained from natural sources are advantageous in terms of low toxicity, high stability in physiological conditions instead of those of synthetic origin and they have various chemical structures for the design of new drugs. For this purpose, many plant extracts have been investigated for their phytochemical and biological activity and there are a number of studies that focus on polyphenolic compounds. Phenolic compounds are very effective and are being discussed because they cause some health problems when the dosage is not adjusted or taken as supplement.

The aim of this study is that investigation of phytochemical tests, phenolic compound contents, antioxidant activity and various biological activities related to diabetes and characterisation of *Hibiscus sabdariffa* L., *Hypericum* sp., *Calendula* sp. and *Prunus laurocerasus* L. extracts.

It has been observed that all plant extracts are rich in phenolic compounds. Antioxidant activity, lipoxygenase and  $\alpha$ -amylase inhibition in *Hibiscus sabdariffa* L extracts; antioxidant and deglycation activity, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and dipeptidyl peptidase 4 in *Hypericum* sp. extracts; Antioxidant and

metal chelating efficacy in *Calendula* sp. extracts; The effects of antioxidant, metal chelating and reducing activity,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and dipeptidyl peptidase 4 were observed in *Prunus laurocerasus* L. extracts.

In conclusion, in each plant extract, multiple biological activities associated with diabetes and its complications, can be the source of potential drug effects in the prevention of diabetes and its complications. It is clear that it is necessary to carry out *in vitro* and *in vivo* kinetic studies of these plant extracts.

**Keywords:** Diabetes mellitus, phenolic compounds, antioxidant, enzyme inhibition



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda yardımını esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübesi ile adımlarıma ışık tutan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Figen Zihnioğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Dr. Zinar Pınar GÜMÜŞ'e, çalışmalarım süresince her zaman ilgisini ve alakasını gördüğüm sevgili Dr. Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim aileme ve sevgili arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

|                                                                   |       |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                        | vii   |
| ABSTRACT .....                                                    | ix    |
| TEŞEKKÜR .....                                                    | xi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                             | xviii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                            | xxii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                              | xxiv  |
| 1.GİRİŞ.....                                                      | 1     |
| 1.1 Diyabet.....                                                  | 1     |
| 1.2 Diyabetik Komplikasyonlar .....                               | 2     |
| 1.2.1 Diyabetin İnflamasyon ve Oksidatif Stres ile İlişkisi ..... | 3     |
| 1.2.2 Protein Glikasyonu .....                                    | 5     |
| 1.3. Diyabet Tedavisindeki Yaklaşımlar .....                      | 5     |
| 1.3.1 Kan Glukozunun Dengelenmesi .....                           | 5     |
| 1.3.1.1 Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP-4) İnhibitörleri .....         | 6     |
| 1.3.1.2 $\alpha$ -Glukozidaz İnhibitörleri .....                  | 7     |
| 1.2.1.3 $\alpha$ -Amilaz İnhibitörleri.....                       | 7     |

**İÇİNDEKİLER (devam)**

|                                                  | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------|--------------|
| 1.3.2 Diyabetik Komplikasyonların Önlenmesi..... | 7            |
| 1.3.2.1 Antioksidanlar .....                     | 7            |
| 1.3.2.2 Anti-inflamatuar Ajanlar .....           | 8            |
| 1.3.2.3 Deglikasyon Ajanları .....               | 8            |
| 1.3.2.4 Metal Şelatlayıcılar .....               | 9            |
| 1.4 Bitki Kaynaklı Doğal Ürünler.....            | 9            |
| 1.5 Fitokimyasallar.....                         | 10           |
| 1.6 Fenolik Bileşikler .....                     | 10           |
| 1.6.1 Fenolik Asitler.....                       | 11           |
| 1.6.1.1 Hidroksisinamik Asitler .....            | 11           |
| 1.6.1.2 Hidroksibenzoik Asitler .....            | 11           |
| 1.6.2 Flavonoidler .....                         | 11           |
| 1.6.2.1 Antosiyaninler .....                     | 12           |
| 1.6.2.2 Flavonlar .....                          | 12           |
| 1.6.2.3 Flavonoller .....                        | 12           |
| 1.6.2.4 Flavanonlar.....                         | 13           |

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 1.6.2.5 Flavanoller (Kateşinler) .....                   | 13 |
| 1.6.2.6 İzoflavonlar .....                               | 13 |
| 1.6.2.7 Flavanonollar .....                              | 13 |
| 1.7 Biyolojik Aktif Doğal Bitki Kaynakları .....         | 14 |
| 1.7.1 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Hibiskus) .....     | 14 |
| 1.7.2. <i>Hypericum perforatum</i> (Sarı Kantaron) ..... | 14 |
| 1.7.3 <i>Calendula officinalis</i> (Aynı Sefa) .....     | 14 |
| 1.7.4 <i>Prunus laurocerasus</i> L. (Karayemiş) .....    | 15 |
| 2. MATERYAL VE METOT .....                               | 16 |
| 2.1 Materyal .....                                       | 16 |
| 2.2 Metot .....                                          | 16 |
| 2.2.1 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması .....             | 16 |
| 2.2.2 Fitokimyasal Testler (Kalitatif) .....             | 17 |
| 2.2.3 Fenolik Bileşiklerin Tayini (Kantitatif) .....     | 19 |
| 2.2.3.1 Total Fenol Tayini .....                         | 19 |
| 2.2.3.2 Total Flavonoid Tayini .....                     | 19 |

## İÇİNDEKİLER (devam)

|                                                                                  | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.2.3.3 Total Antosiyanin Tayini .....                                           | 20           |
| 2.2.4 Antioksidan Etkinliğin Belirlenmesi.....                                   | 21           |
| 2.2.5 $\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonunun Belirlenmesi .....                     | 22           |
| 2.2.6 DPP-4 İnhibisyonunun Belirlenmesi .....                                    | 23           |
| 2.2.7 $\alpha$ -Amilaz İnhibisyonunun Belirlenmesi .....                         | 25           |
| 2.2.8 Lipoksigenaz İnhibisyonunun Belirlenmesi.....                              | 25           |
| 2.2.9 Deglikasyon Etkinliğinin Belirlenmesi .....                                | 27           |
| 2.2.10 Metal Şelatlama Etkinliğinin Belirlenmesi .....                           | 28           |
| 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....                                                    | 29           |
| 3.1 Bitki Ekstrelerinin Eldesi .....                                             | 29           |
| 3.2 Fitokimyasal Testler (Kalitatif).....                                        | 31           |
| 3.3 Fenolik Bileşiklerin Tayini (Kantitatif) .....                               | 33           |
| 3.4 Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Etkinliği ve EC <sub>50</sub> Değerleri..... | 37           |
| 3.5 Metal Şelatlama Kapasitesi ve EC <sub>50</sub> Değerleri .....               | 42           |
| 3.6 $\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerleri .....         | 44           |
| 3.7 DPP-4 İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....         | 47           |

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8 $\alpha$ -Amilaz İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....       | 50 |
| 3.9 Lipoksigenaz Enzim İnhibisyonunun ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi ..... | 53 |
| 3.10 Glikasyon İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....             | 55 |
| 4. GENEL DEĞERLENDİRME .....                                                              | 58 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ.....                                                                     | 61 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                             | 68 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>                                                                           | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1 Uluslararası Diyabet Federasyonu 6.Diyabet Atlası verileri .....                   | 1            |
| 1.2 Diyabetin patafizyolojisi.....                                                     | 2            |
| 1.3 Diyabetik komplikasyonlar .....                                                    | 3            |
| 1.4 Diyabetin oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkisi .....                        | 3            |
| 1.5 Oksidatif denge .....                                                              | 4            |
| 1.6 AGE oluşumu .....                                                                  | 5            |
| 1.7 Antioksidan etki mekanizması.....                                                  | 8            |
| 1.8 Fenolik asitler .....                                                              | 11           |
| 1.9 Flavonoidlerin genel yapısı.....                                                   | 12           |
| 3.1 Elde edilen bitki ekstraktları .....                                               | 30           |
| 3.2 Total fenol ve flavonoid kalibrasyon grafikleri .....                              | 34           |
| 3.2a Total fenol tayini kalibrasyon grafiği.....                                       | 34           |
| 3.2b Total flavonoid tayini kalibrasyon grafiği .....                                  | 34           |
| 3.3 Hibiskus ekstraktları antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları..... | 38           |
| 3.3a Hibiskus metanolik ekstresi .....                                                 | 38           |
| 3.3b Hibiskus etanolik ekstresi.....                                                   | 38           |
| 3.3c Hibiskus demleme ekstresi .....                                                   | 38           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u>                                                                                               | <u>Sayfa</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.4 Aynı sefa ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları .....                     | 38           |
| 3.4a Aynı sefa metanolik ekstresi .....                                                                    | 38           |
| 3.4 b Aynı sefa etanolik ekstresi.....                                                                     | 38           |
| 3.5 Sarı kantaron ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları .....                 | 39           |
| 3.5a Sarı kantaron metanolik ekstresi.....                                                                 | 39           |
| 3.5b Sarı kantaron etanolik ekstresi.....                                                                  | 39           |
| 3.5c Sarı kantaron demeleme ekstresi .....                                                                 | 39           |
| 3.6 Karayemiş ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları .....                     | 39           |
| 3.6a Karayemiş metanolik ekstresi.....                                                                     | 39           |
| 3.6b Karayemiş etanolik ekstresi.....                                                                      | 39           |
| 3.7 Askorbik asit'in antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonu .....                            | 40           |
| 3.8 Aynı sefa ve Karayemiş ekstrelerinin metal şelatlama % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları ..... | 43           |
| 3.8a Aynı sefa metanolik ekstresinin metal şelatlama % etkinlik eğrisi ve lineer regresyonu .....          | 43           |
| 3.8b Karayemiş ekstresinin metal şelatlama % etkinlik eğrisi ve lineer regresyonu.....                     | 43           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u>                                                                                                   | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.9 Sarı kantaron ekstrelerinin % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları.....                             | 46           |
| 3.9a Sarı kantaron etanolik ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                        | 46           |
| 3.9b Sarı kantaron demleme ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                         | 46           |
| 3.10 Karayemiş ekstrelerinin % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları .                                   | 46           |
| 3.10a Karayemiş metanolik ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                          | 46           |
| 3.10b Karayemiş eetanolik ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                          | 46           |
| 3.11 Akarbozun % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu .....                                                  | 46           |
| 3.12 Karayemiş ekstrelerinin % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları..                                   | 49           |
| 3.12a Karayemiş metanolik ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                          | 49           |
| 3.12b Karayemiş etanolik ekstrelesinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                           | 49           |
| 3.13 Sarı kantaron etanolik ekstresinin ve Diprotein A'nın % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları ..... | 49           |
| 3.13a Sarı kantaron etanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.....                         | 49           |
| 3.13b Diprotein A'nın % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu .....                                           | 49           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u>                                                                                                         | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.14 Hibiskus ve Karayemiş'in % inhibisyon eğrileri ve regresyonları .....                                           | 42           |
| 3.14a Hibiskus metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrilesi ve lineer regresyonu.....                                 | 52           |
| 3.14b Karayemiş metanolik ekstresi % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu                                          | 52           |
| 3.15 Hibiskus metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu                                         | 54           |
| 3.16 Sarı kantaron ve Karayemiş'in % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları .....                               | 56           |
| 3.16a Sarı kantaron metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrilesi ve lineer regresyonu.....                            | 56           |
| 3.16b Karayemiş metanolik ekstresi % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu                                          | 56           |
| 4.1 Bitki ekstralarının kantitatif total fenol, total flavonoid ve antosiyanin içeriklerinin karşılaştırılması. .... | 58           |
| 4.2 Bitki ekstralarının gösterdiği biyolojik etkinliklerin değerlendirilmesi. ..                                     | 59           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u>                                                                             | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1.1 Günümüzde diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları....             | 6            |
| 2.1 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. ve <i>Hypericum</i> sp. ekstraksiyon koşulları.....      | 17           |
| 2.2 <i>Calendula</i> sp. ekstraksiyon koşulları .....                                      | 17           |
| 2.3 <i>Prunus laurocerasus</i> L. ekstraksiyon koşulları.....                              | 17           |
| 2.4 Fitokimyasal testler .....                                                             | 18           |
| 2.5 Total fenol içeriğinin belirlenmesi .....                                              | 19           |
| 2.6 Total flavonoid içeriğinin belirlenmesi .....                                          | 20           |
| 2.7 Total antosiyanin içeriğinin belirlenmesi.....                                         | 20           |
| 2.8 Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. ....                                           | 21           |
| 2.9 $\alpha$ -Glukozidaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi .....                        | 22           |
| 2.10 $\alpha$ -Amilaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi .....                           | 25           |
| 2.11 Lipoksigenaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi.....                                | 26           |
| 2.12 Glikasyon inhibisyonunun belirlenmesi ( <i>in vitro</i> ). ....                       | 27           |
| 3.1 Bitki ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri.....                                        | 30           |
| 3.2 Karayemiş ve Hibiskus'un fitokimyasal analizleri .....                                 | 32           |
| 3.3 Aynı safa ve Sarı Kantaron'un'un fitokimyasal analizleri.....                          | 32           |
| 3.4 Bitki ekstrelerinin total fenol, total flavonoid ve total antosiyanin içerikleri ..... | 35           |

## ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

| <u>Çizelge</u>                                                                                                                    | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.5 Bitki ekstralarının antioksidan etkinlikleri (EC <sub>50</sub> değerleri).....                                                | 40           |
| 3.6 Bitki ekstralarının metal şelatlama (%) kapasiteleri(Radikal oluşumunun İnhibisyonu).....                                     | 42           |
| 3.7 Aynı sefa ve Karayemiş etanolik ekstralarının metal şelatlama EC <sub>50</sub> değerleri. ....                                | 43           |
| 3.8 Bitki ekstralarının α-glukozidaz inhibisyon etkinlikleri.....                                                                 | 45           |
| 3.9 Sarı kantaron ve Karayemiş ekstralarının, α-glukozidaz inhibisyonu;IC <sub>50</sub> değerleri.....                            | 47           |
| 3.10 Bitki ekstralarının DPP-4 enzim inhibisyonu.....                                                                             | 48           |
| 3.11 Sarı kantaron ve Karayemiş ekstralarının, DPP-4 inhibisyonu;IC <sub>50</sub> değerleri.....                                  | 50           |
| 3.12 Bitki ekstralarının α-amilaz enzim inhibisyonu.....                                                                          | 51           |
| 3.13 Hibiskus ve Karayemiş ekstralarının, α-amilaz enzim inhibisyonu; IC <sub>50</sub> değerleri.....                             | 52           |
| 3.14 Tüm bitkilerin metanolik ekstralarının belirli fenol derişimlerinde gösterdiği lipoksigenaz enzim inhibisyonu yüzdeleri..... | 53           |
| 3.15 Hibiskus metanolik ekstresinin lipoksigenaz inhibisyonu; IC <sub>50</sub> değeri .....                                       | 54           |
| 3.16 Bitki ekstralarının glikasyon inhibisyonu (AGE oluşumu).....                                                                 | 55           |
| 3.17 Sarı kantaron ve Karayemiş metanolik ekstralarının, glikasyon inhibisyonu;IC <sub>50</sub> değerleri .....                   | 56           |

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

| <u>Simgeler</u>                                                | <u>Açıklama</u>    |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| $\beta$                                                        | Beta               |
| $\alpha$                                                       | Alfa               |
| Fe                                                             | Demir              |
| Cu                                                             | Bakır              |
| -OH                                                            | Hidroksil          |
| -OCH <sub>3</sub>                                              | Metoksi            |
| p                                                              | Para               |
| C <sub>3</sub>                                                 | Karbon 3           |
| C <sub>6</sub>                                                 | Karbon 6           |
| FeCl <sub>3</sub>                                              | Demir (III) klorür |
| KI                                                             | Potasyum iyodür    |
| I                                                              | İyot               |
| NaOH                                                           | Sodyum hidroksit   |
| Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | Kurşun asetat      |
| HCl                                                            | Hidroklorik asit   |
| NH <sub>3</sub>                                                | Amonyak            |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                 | Sülfirik asit      |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Simgeler</u>                           | <u>Açıklama</u>                         |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| $\text{Na}_2\text{CO}_3$                  | Sodyum karbonat                         |
| $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Alüminyum (III) klorür hekza hidrat     |
| KCl                                       | Potasyum klorür                         |
| $\varepsilon$                             | Ekstinksiyon katsayısı                  |
| L                                         | Işık yolu                               |
| U                                         | Unite                                   |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | Bakır (II) sülfat penta hidrat          |
| <u>Kısaltmalar</u>                        |                                         |
| AGE                                       | İleri glikasyon son ürünleri            |
| ROT                                       | Reaktif oksijen türleri                 |
| DNA                                       | Deoksiribo nükleik asit                 |
| GLP-1                                     | Glukagon benzeri peptid-1               |
| GIP                                       | Glukoz bağımlı insulintropik polipeptid |
| DPP-4                                     | Dipeptidil peptidaz-4                   |
| LDL                                       | Düşük yoğunluklu lipoprotein            |
| WHO                                       | Dünya Sağlık Örgütü                     |
| UV/Vis                                    | Ultraviyole/Görünür bölge               |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

### Kısaltmalar

|                  |                                  |
|------------------|----------------------------------|
| GA               | Gallik asit                      |
| GAE              | Gallik asit eşdeğeri             |
| QE               | Kuersetin eşdeğeri               |
| MA               | Molekül ağırlığı                 |
| A                | Absorbans                        |
| M                | Molar                            |
| SF               | Seyreltme faktörü                |
| BCA              | Bikinkoninik asit                |
| DPPH             | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil     |
| IC <sub>50</sub> | %50 inhibisyon gösteren derişim  |
| EC <sub>50</sub> | %50 etkinlik gösteren derişim    |
| pNF              | p-Nitrofenol                     |
| pNA              | p-Nitroanilid                    |
| XO               | Ksilenol oranj                   |
| FOX              | Ferröz oksidasyon-Ksilenol oranj |
| FAS              | Amonyum demir (II) sülfat        |
| TMM              | Müreksit                         |

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar

BSA Sığır serum albumin

MeOH Metanol

EtOH Etanol





## 1.GİRİŞ

### 1.1 Diyabet

Diyabet, hiperglisemi ve insulin dirençliliğinde bozukluk ile karakterize edilen multifaktöriyel, kronik bir metabolizma hastalığıdır. Her geçen gün diyabetin görülme sıklığı artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu'na göre dünyada 425 milyon diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2045 yılında 629 milyona yükseleceği düşünülmektedir (Yeung et al., 2018). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre de diyabet, 2030 yılında dünyadaki ölüm sebepleri arasında yedinci sırada yer alacaktır (Kerru et al., 2018).

**DIYABET VE BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI (BGT) (20-79 yaş aralığı)**

|                                   | 2013 | 2035 |
|-----------------------------------|------|------|
| <b>Diyabet</b>                    |      |      |
| Küresel Prevelans (%)             | 8.3  | 10.1 |
| Nispi prevelans (%)               | 8.3  | 8.8  |
| Diyabetli insan sayısı (milyon)   | 382  | 592  |
| <b>BGT</b>                        |      |      |
| Küresel prevelans (%)             | 6,9  | 8.0  |
| Nispi prevelans (%)               | 6.9  | 7.3  |
| BGT'li insanların sayısı (milyon) | 316  | 471  |

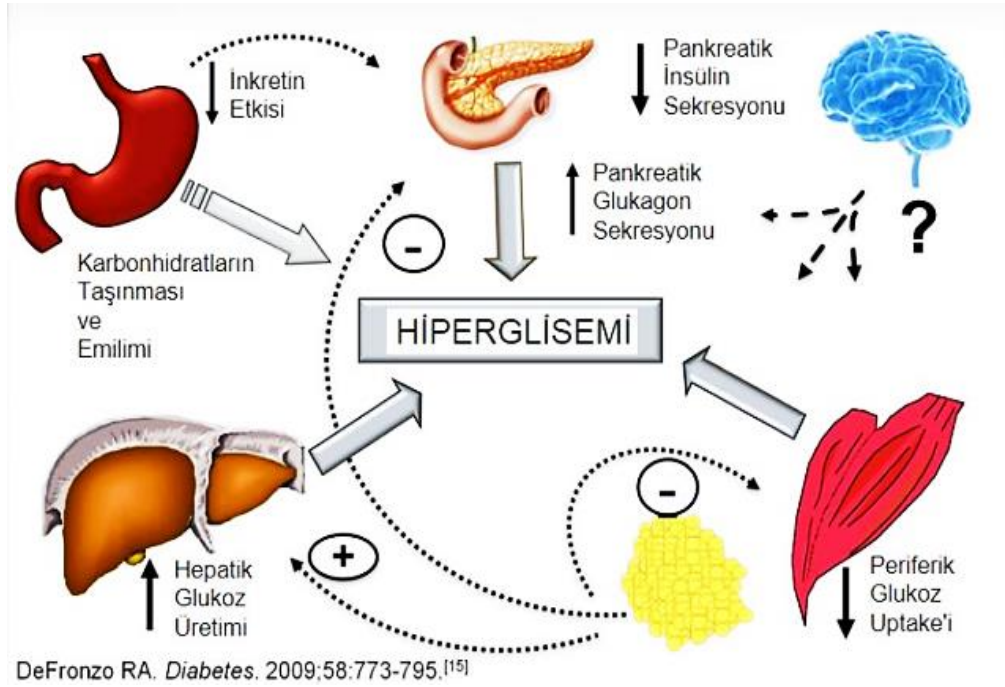
**2013-2035 yılları arası 20-79 yaş aralığındaki diyabetli nüfusun en fazla olduğu 10 ülke**

| Ülke/Bölge        | 2013 (milyon) | Ülke/Bölge        | 2035 (milyon) |
|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| Çin               | 98.4          | Çin               | 142.7         |
| Hindistan         | 65.1          | Hindistan         | 109.0         |
| ABD               | 24.4          | ABD               | 29.7          |
| Brezilya          | 11.9          | Brezilya          | 19.2          |
| Rusya Federasyonu | 10.9          | Meksika           | 15.7          |
| Meksika           | 8.7           | Endonezya         | 14.1          |
| Endonezya         | 8.5           | Mısır             | 13.1          |
| Almanya           | 7.6           | Pakistan          | 12.8          |
| Mısır             | 7.5           | <b>TÜRKİYE</b>    | 11.8          |
| Japonya           | 7.2           | Rusya Federasyonu | 11.2          |

Şekil 1.1 Uluslararası Diyabet Federasyonu 6.Diyabet Atlası verileri.

Amerikan Diyabet Birliği teşhis ve sınıflandırma kriterlerine göre diyabet dört sınıf altında incelenmektedir; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, gestasyonel diyabet ve spesifik diyabet. Tip 1 ve tip 2 diyabet, diyabetin en yaygın formlarıdır. Tip 1 diyabet, insulin bağımlı diyabet olarak da adlandırılmakta ve genellikle genç yaşlarda tanısı konmaktadır. Pankreatik beta ( $\beta$ ) hücrelerinde otoimmün hasara bağlı olarak gelişmektedir. Beta hücreleri, pankreasın Langerhans adacıklarında bulunurlar ve insulinin üretimi ile salınımından sorumludurlar. Tip 1 diyabeti olan

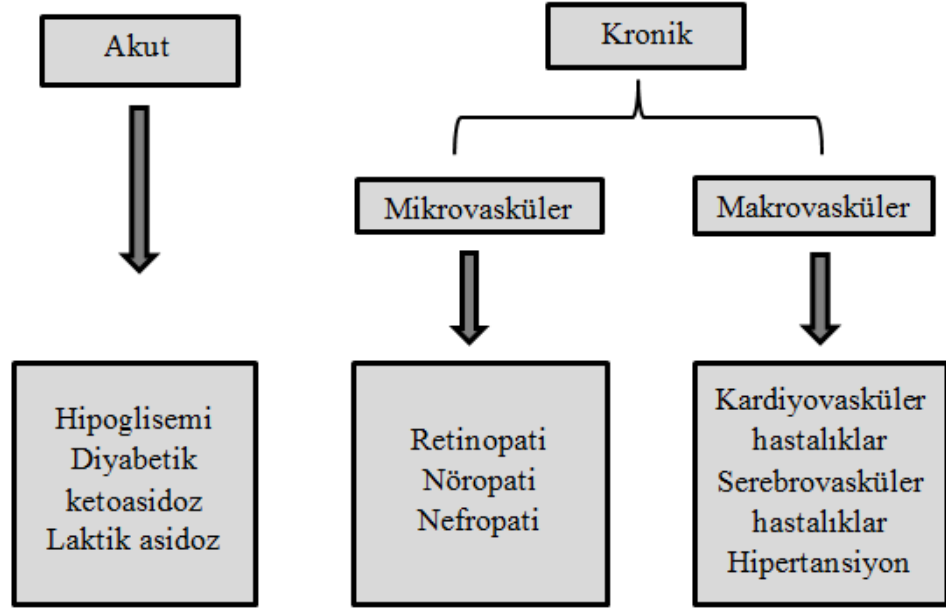
hastalarda bu hücreler, hastanın kendi immün sistemi tarafından tahrip edilirler. Hastaların, insülin üretimindeki yetersizlikleri nedeniyle, insülin hormonu takviyesi almaları gerekir. Tip 2 diyabet ise, insülin direnci ve bozulmuş insülin sekresyonu ile karakterize edilmektedir. İnsülin direnci; periferik dokuların insülin hormonuna beklenen yanıtı vermemesi olarak tanımlanır. Tip 2 diyabet, insüline bağımlı olmayan diyabet veya erişkin diyabet olarak da adlandırılır. Hastalık, karaciğer ve kas gibi periferik dokularda oluşan insülin direnci ile birlikte pankreasta insülin üretiminin gittikçe azalması ile seyreder. Tip 2 diyabetin epidemiyolojik belirteçleri ve risk faktörleri; genetik, demografik (cinsiyet, yaş, etnik grup), davranış/yaşam stili ve metabolik etkenler olarak sıralanabilir.



Şekil 1.2 Diyabetin patafizyolojisi.

## 1.2 Diyabetik Komplikasyonlar

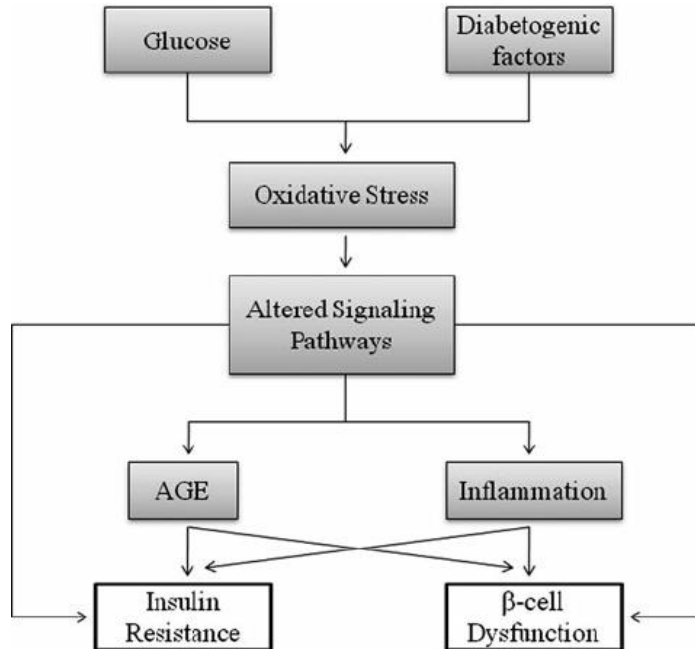
Uzun süreli hiperglisemi durumunda; özellikle gözlerde, sinirlerde, böbreklerde ve kalpte olmak üzere vücutta geri dönüşümsüz ciddi hasarlar meydana gelir. Diyabetin ilerleyen safhalarında, diyabetik hastalarda birçok komplikasyon gelişme riski bulunur. Bu komplikasyonlar, öncelikle akut ve kronik komplikasyonlar olarak ayrılır. Kronik komplikasyonlar da mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere iki grupta toplanır (Greene, 1986).



Şekil 1.3 Diyabetik komplikasyonlar.

### 1.2.1 Diyabetin İnflamasyon ve Oksidatif Stres ile İlişkisi

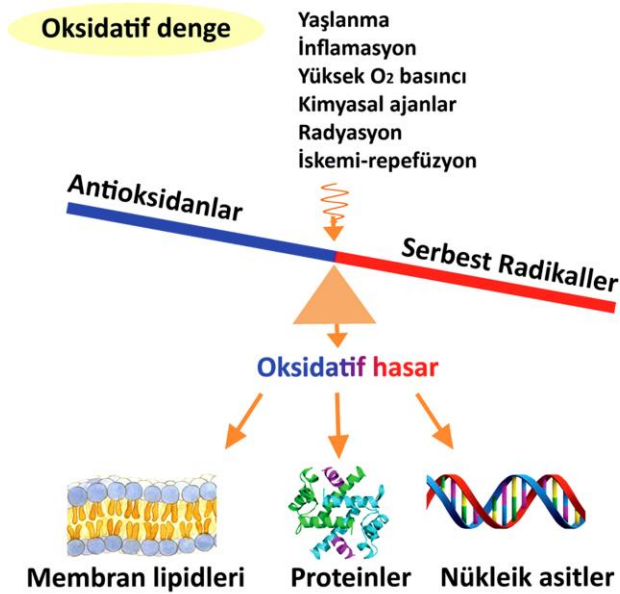
Genetik yatkınlık, yaş, kilo gibi faktörler diyabet gelişimini etkiler. Obezite, diyabet için en önemli risk faktörlerinden biridir. Diğer bir yandan obezite, düşük dereceli sistemik inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir.



Şekil 1.4 Diyabetin oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkisi.

İnflamasyon, mikroorganizmaların veya toksinlerin hücrelere zarar vermesinin önlenmesi ya da hasar sonucu oluşan nekrotik ve ölü dokuların uzaklaştırılmasına yönelik, organizmanın devamlılığı için geliştirilmiş koruyucu bir yanıttır. Vücutta meydana gelen inflamatuvar yanıt, akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır. Akut inflamasyon deride bir kesik olması, bileğin incinmesi veya boğaz ağrısı gibi durumların sonucunda ortaya çıkar. Kısa sürelidir ve çoğu zaman birkaç gün içerisinde biter. Kronik inflamasyon ise uzun süre boyunca devam eder ve vücutta ciddi sorunlara neden olur. Kronik inflamasyon durumunda yüksek miktarda salgılanan sitokinler sebebi ile pankreasın beta hücrelerinde fonksiyon bozuklukları gözlenir. Diyabetli hastalarda sık görülen abdominal obezitedeki karın içi yağ dokusu, düşük seviyeli kronik inflamatuvar durumun önemli bir belirleyicisidir (Prodham and Filigheddu, 2014).

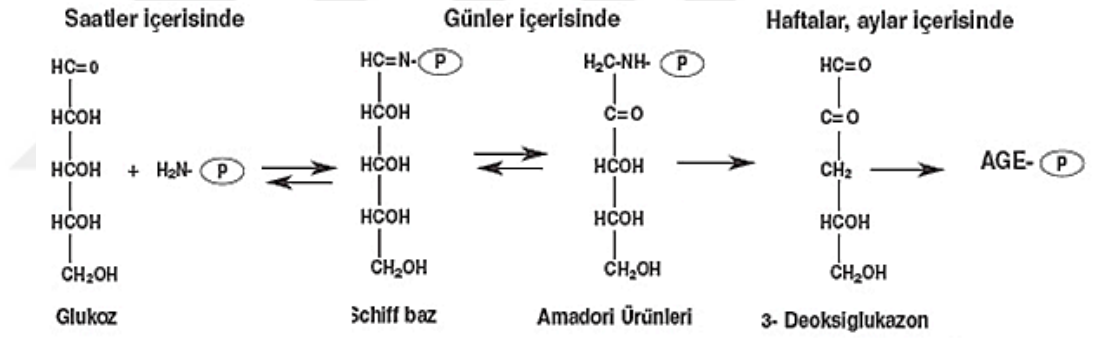
Diyabet ve inflamasyon aynı zamanda oksidatif stres ile de ilişkilidir. Oksidatif stres serbest radikal üretimindeki dengesizlikten kaynaklanır. Böylece, mitokondriyal disfonksiyon artar ve antioksidan savunma azalır (Altan vd., 2006). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarındaki artış sonucunda hücre membranlarında hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek hücre zedelenmesine yol açar (Özcan vd, 2015). Kan glukoz seviyesinin yüksek seyretmesi ile birlikte oksidatif stresin, vasküler komplikasyonlar ve lipid peroksidasyonuna da neden olduğu rapor edilmektedir.



Şekil 1.5 Oksidatif denge.

## 1.2.2 Protein Glikasyonu

Proteinlerin serbest amino gruplarının, şekerlerin karbonil grupları ile enzimatik olmayan ve kendiliğinden gerçekleşen reaksiyonlarına protein glikasyonu denir. Protein glikasyonu çok adımlı bir kimyasal süreçtir ve hiperglisemi sonucunda gözlenmektedir. Protein glikasyonu Schiff bazı oluşumuyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüşmektedir (Simm, 2013). Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken, daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür. Bu ürünlerin birikmesi ile proteinlerin yapısında değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin; yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar, nöropati, nefropati, retinopati, Alzheimer hastalığı gibi birçok önemli hastalık ile ilişkisi vardır (Awasthi and Saraswathi, 2016).



Şekil 1.6 AGE oluşumu.

## 1.3 Diyabet Tedavisindeki Yaklaşımlar

### 1.3.1 Kan Glukozunun Dengelenmesi

Diyabetin hem dünyada hızla yaygınlaşması hem de yukarıda bahsedilen etkileri nedeniyle, diyabetin tedavisine yönelik çalışmalar gün geçtikçe daha da önemli hale gelmiştir. Bu bağlamda konuya ilişkin farklı yaklaşımlar ile yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmaların temelinde öncelikle yüksek kan glukoz düzeyinin kontrol altına alınması yatmaktadır. Tip 1 diyabette, insulin enjeksiyonu ile tedavi sağlanırken; tip 2 diyabet tedavisinde insulin direncinin azaltılması ve besin sindirimi ile gelen glukozun kana geçişinin yavaşlatılması amaçlanmaktadır (Kerru et al., 2018).

Çizelge 1.1 Günümüzde diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları.

| <b>Diyabet Tipi</b>  | <b>Tedavi</b>                                    | <b>İlaç Adı</b>                                       | <b>Mekanizması</b>                                                                           |
|----------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tip 1 diyabet</b> | İnsulin                                          | İnsulin                                               | İnsulin reseptörünün fosforilasyonunu uyarır                                                 |
| <b>Tip 2 diyabet</b> | Sulfonilüreler                                   | Gliclazide, Glimepiride, Glyburide                    | Daha fazla insulin üretimi için pankreası uyarır                                             |
|                      | Meglitinidler                                    | Nateglinide, Repaglinide                              | Daha fazla insulin üretimi için pankreası uyarır                                             |
|                      | Biguanidinler                                    | Metmorfin                                             | Karaciğerdeki glukoz sentezini azaltır                                                       |
|                      | Tiazolidinedionlar                               | Pioglitazone, Rosiglitazone                           | Karaciğerdeki glukoz sentezini azaltır ve hücrelerdeki insulin hassasiyetini artırır         |
|                      | Alfa glukozidaz inhibitörleri                    | Acarbose                                              | Sindirilmiş karbohidratların absorpsiyonunu azaltır                                          |
|                      | Dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri      | Linagliptine, Saxagliptine, Sitagliptine, Alogliptine | Kan şekerinin kontrolünde yer alan barsak hormonlarının (inkretinlerin) etkisini artırır     |
|                      | Glukagon benzeri peptid-1 agonisti               | Exenatide, Liraglutide, Dulaglutide                   | Kan şekerinin kontrolünde yer alan barsak hormonlarının (inkretinlerin) etkisini taklit eder |
|                      | Sodyum glukoz kotasıyıcı 2 (SGLT2) inhibitörleri | Canagliflozine, Dapagliflozine, Empagliflozine        | Glukozun böbrekten kana geçişini yavaşlatır                                                  |

### 1.3.1.1 Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP-4) İnhibitörleri

Tip 2 diyabetik hastalarda, besin sindiriminde hiperglisemi ve glukoz intoleransı ile ilişkili olarak, inkretin hormon cevabı azalır. İnkretin hormonlar, pankreas beta hücrelerinden glukoz ile uyarılan insülin salgılanmasını artırır. Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insulintropik polipeptid (GIP) en önemli iki inkretin hormonlarıdır (Li et al., 2018). GLP-1 özellikle ileum ve kolondaki L hücrelerinden salınırken, GIP yoğun olarak duodenum olmak üzere proksimal ince barsakta bulunan K hücrelerinden salınmaktadır. GLP-1'in yarı ömrü 1–2 dakika, GIP'in de 2–3 dakikadır. İnkretinler hızlı bir şekilde dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) enzimi tarafından yıkılırlar. DPP-4'ün GLP-1'in

yıkımındaki rolünün keşfi DPP-4 inhibitörlerin tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmasının önünü açmıştır (Göksu ve Ünal, 2017).

### **1.3.1.2 Alfa Glukozidaz İnhibitörleri**

Alfa glukozidaz enzimleri ince barsağın yüzeyinde bulunurlar ve kompleks karbohidratların parçalanmasından sorumludurlar. Bu enzimler oligosakkaritleri ve disakkaritleri, monosakkaritlere yıkarlar. Monosakkaritler de barsak duvarından kolayca emilip kana geçerler. Alfa glukozidaz enzim inhibitörleri bu enzimleri kompetitif olarak inhibe ederler (Liu and Ma, 2017). Alfa glukozidaz enzim inhibitörleri karbohidrat emilimini geciktirmelerinin yanı sıra, gastrointestinal hormonal aksı değiştirebilirler. Bu inhibitörler insülin sekresyonunu artırır. Fakat bu etkinin ortaya çıkması için plazma glukoz seviyesinin yükselmesi gerekir. Alfa glukozidaz inhibitörleri aynı zamanda, glukagon benzeri peptidin (GLP-1) postprandial seviyelerini artırır. Bu hormon glukagon sekresyonunu inhibe eder (DeGeeter and Williamson., 2014).

### **1.3.1.3 Alfa Amilaz İnhibitörleri**

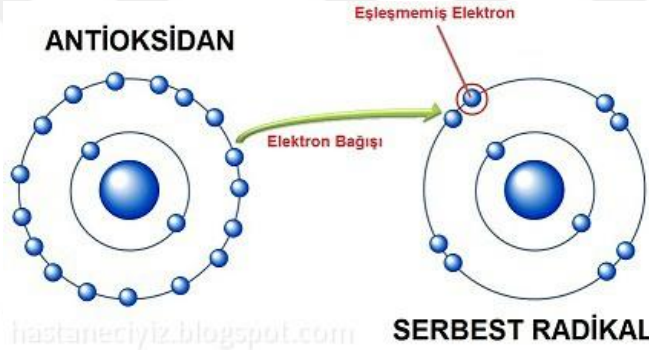
Tip 2 diyabetin tedavisindeki terapötik hedeflerden bir başkası da barsaktaki glukozun geri emilimini azaltmak için  $\alpha$ -amilaz enziminin inhibisyonu sağlamaktır. Alfa-amilaz ( $\alpha$ -1,4-glukan-4-glukanhidrolazlar) pankreas ve tükürük bezinin belirgin bir salgı ürünüdür. Kopmleks karbohidratların, oligosakkaritlere ve disakkaritlere hidrolizindeki ilk aşamadan sorumludur. Mevcut  $\alpha$ -amilaz inhibitörleri, hipoglisemi, diyare, şişkinlik ve barsak şişmesi gibi yan etkilere sahiptir. Bu nedenle, diyabet yönetimine yardımcı olabilecek daha az yan etkilerle, alternatif tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Oyedemi et al., 2017).

## **1.3.2 Diyabetik Komplikasyonların Önlenmesi**

### **1.3.2.1 Antioksidanlar**

Antioksidan savunma mekanizmaları, enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalar olabilir. Sıklıkla görülen enzimatik olmayan antioksidanlar A, C ve E vitaminleri, glutatyon, alfa lipoik asit, karışık karotenoidler, koenzim Q10, çeşitli polifenolik bileşikler, antioksidan mineraller (bakır, çinko, mangan ve

selenyum), folik asit, ürik asit, albümin ve B1, B2, B6 ve B12 vitaminleri gibi kofaktörlerdir. Enzimatik antioksidanlar ise süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazdan oluşur (Hamamcıoğlu, 2017). Normal fizyolojik şartlarda antioksidanlar sinyal iletimini, bağışıklık cevabını ve proliferasyonun düzenlenmesini etkilerler. Reaktif oksijen türlerinin yol açtığı kanser, diyabetik komplikasyonlar ve kardiyovasküler hastalıkların tedavi ve önlenmesinde antioksidanlar olası bir tedavi şekli olarak düşünülmektedir. Antioksidanların doymamış yağ asitleri üzerinde de koruyucu etkileri vardır; oksidatif stresi azaltarak, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna gitmesini, hücre membranında lipid peroksidasyonunu ve endonöral kan akımının azalmasını engellerler. Bu şekilde periferik sinir sistemi ve vasküler bozuklukları azaltırlar (Adegbola et al., 2017).



Şekil 1.7 Antioksidan etki mekanizması.

### 1.3.2.2 Anti-inflamatuar Ajanlar

Araşidonik asitin iki farklı metabolik sonu vardır; siklooksigenaz yolu ile prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüşür ya da lipoksigenaz yolu ile lökotrienlere ve hidroperoksi yağ asitlerine dönüşür. Siklooksigenaz ve lipoksigenaz yolu son ürünleri; artirit, ateş, kronik ağrı, sepsis, yara oluşumu, kolorektal kanserin karsinojenik süreci gibi birçok patolojik durumun indüklenmesine katılırlar. Steroid olmayan inflamasyon tedavisi, siklooksigenazların ve lipoksigenazların inhibisyonuna yöneliktir (Chung et al., 2009).

### 1.3.2.3 Deglikasyon Ajanları

Glikasyona uğramış proteinler, enzimatik deglikasyon mekanizmalarıyla onarılabilirler. Deglikasyon mekanizmasında görev alan enzimler organizmaya

(memeli, bakteri, bitki ) ve substratlarına göre farklılık gösterirler (Deppe et al., 2011). Deglikasyon enzimleri hücre içi enzimler olup hücre dışı proteinlerin deglikasyonuna etkin değildir. Deglikatif enzimlerin varlığına rağmen, hipergliseminin neden olduğu protein glikasyonu tam olarak önlenemez. Protein glikasyonunun neden olduğu sorunların giderilmesindeki diğer yaklaşım da AGE inhibitörleridir. Glikasyonun inhibisyonu, AGE oluşumunun ve AGE aracılı hasarın farklı adımlarına müdahalede bulunarak gerçekleştirilir (Khangholi et al., 2015).

#### 1.3.2.4 Metal Şelatlayıcılar

Metal iyonları, biyolojik süreçte ve metal homeostasisinde önemli bir rol oynar. Vücutta, anormal metal metabolizması ya da anormal metal emilimi nedeniyle metallerin fazla bulunması ya da eksik olması durumunda birçok hastalık ortaya çıkar (Prachayasittikul et al., 2013). Serbest demir (Fe) ve bakır (Cu) iyonları, memeli dokularında en fazla redoks-aktif metallerdir. Hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle doku hasarına neden olabilirler. Demir veya bakır katalize redoks reaksiyonları diyabet komplikasyonlarında rol oynayabilir. Diyabette, diyastolik disfonksiyona katkıda bulunan kardiyak kollajen içeriği artar. Ekstraselüler matriksteki  $\text{Cu}^{2+}$  miktarı diyabet ile 2-3 kat artar. Bir diyabetik komplikasyon olan glikasyon sonucu ise, kollajene bakır bağlanması artar ve kalpte doku hasarı meydana gelir. Diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada; bir  $\text{Fe}^{2+}$  şelatörü ve bir  $\text{Cu}^{2+}$  şelatörü uygulanmasının, siyatik motor sinir iletim hızındaki azalmaları iyileştirdiği, besleyici endonöral kan akışını eski haline getirdiği, sistemik arter basıncını azalttığı ve siyatik besleyici vasküler geçirgenliği sağladığı bildirilmiştir (Cooper et al., 2004).

#### 1.4 Bitki Kaynaklı Doğal Ürünler

Antik çağlardan beri bitki kaynaklı doğal ürünler, koruyucu ve iyileştirici ürünlerin temel kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre bitkisel ilaçları içeren geleneksel tıp, dünyadaki tüm ülkelerde yaygın olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edecektir. Gelişen dünyada nüfusun %70-95'i birincil tedavi olarak geleneksel tıpa güvenmektedir. Bu, doğal kaynakların daha az yan etki içermesine ve insan vücuduna daha kolay uyum sağlamasına dayandırılmaktadır. Çeşitli bitkiler, çeşitli biyolojik aktivitelere

(antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiglikatif, antihipertensif vb.) sahiptir. Bir bitkide birden çok biyolojik aktivite gözlenmesi ise birçok hastalığın veya hastalık komplikasyonlarının önlenmesi ya da tedavisi için değerlidir.

### 1.5 Fitokimyasallar

Fitokimyasallar, bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif kimyasal bileşikler olup bitkilerde doğal bir savunma sistemi olarak görev yapar ve renk, aroma ve tat sağlar. Günümüzde, fitokimyasallar koruyucu hekimlik ve diğer tıbbi ve biyolojik disiplinler tarafından vücut savunmasında kullanılan bir süper cephane gibi algılanmaktadır (Dündar, 2001). Kanser, kardiyovasküler sorunlar, hipertansiyon, hormonal bozukluklar ve diyabet gibi sorunların çözümünde kullanılırlar (Rescigno et al., 2015). Polifenoller, likopenler, izotiyosiyanatlar, karotenoidler, sülfidler gibi fitokimyasallar, çeşitli bitkiler aracılığıyla besinlerde yer alarak önemli görevler yüklenmektedirler. Bu kimyasalların insanlar açısından en önemli etkisi, vücutta serbest oksijen molekülleri ve serbest radikallerle reaksiyona giren antioksidanlar gibi işlev görmeleridir.

### 1.6 Fenolik Bileşikler

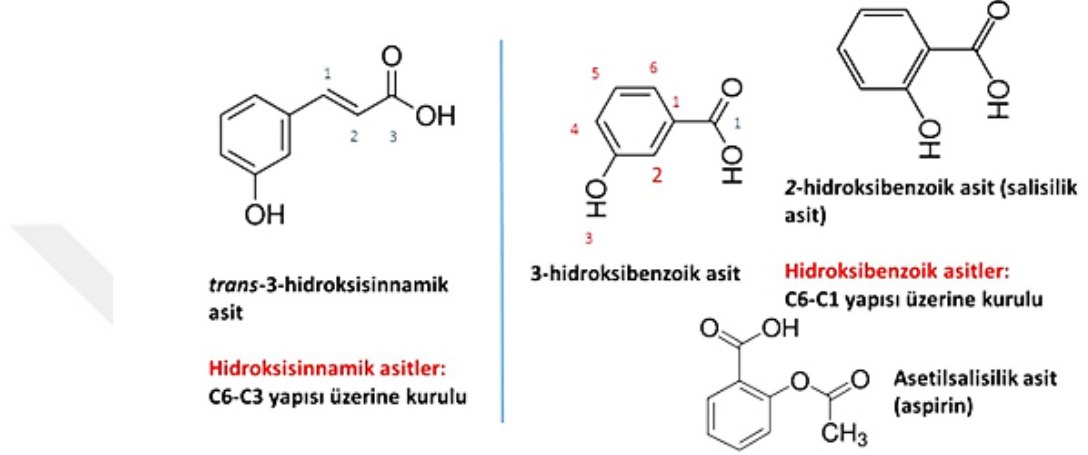
Bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkası içeren bileşikler grubuna fenolik bileşikler veya polifenoller denir. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, kırmızı ve mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar.

Fenolik bileşiklerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidan etkiye sahip olmalarıdır (Braakhuis et al., 2016). Meyve ve sebzelerin antioksidan özellikleri içerdikleri C ve E vitaminleri ile  $\alpha$ -karotenden ziyade fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra fenolik bileşikler, antimikrobiyal ve anti-inflamtuvar etkiye de sahiptirler (Kolaç vd., 2017).

Fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

### 1.6.1 Fenolik Asitler

Genel olarak serbest halde bulunmayan fenolik asitler; hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenirler. Bu bileşiklere -OH ve -OCH<sub>3</sub> grupları bağlanarak önemli fenolik asit türevleri oluşmaktadır.



Şekil 1.8 Fenolik asitler.

#### 1.6.1.1 Hidroksisinnamik Asitler

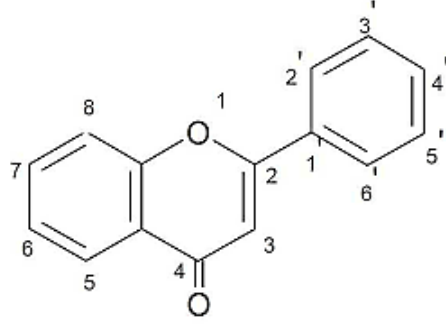
Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösteren hidroksisinnamik asitler arasında; ferulik asit, kafeik asit, kumarik asit ve sinapik asit ön plana çıkmaktadır. Çok az miktarlarda serbest halde bulunan hidroksisinnamik asitler, çoğunlukla asit türevleri halindedirler.

#### 1.6.1.2 Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitlerin  $\beta$ - oksidasyonu ile oluşur. Aralarında en çok bilinenler; salisilik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, siringik asit, gallik asittir.

### 1.6.2 Flavonoidler

Günümüze kadar tanımlanan fenolik bileşiklerin yarısından fazlası flavonoiddir. Flavonoidler, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> konfigürasyonda düzenlenmiş on beş karbon atomunu kapsayan, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir.



Şekil 1.9 Flavonoidlerin genel yapısı.

Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır. Heterosiklik halka şeklinde olan karbon halkasında meydana gelen değişimler flavonoidleri; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller(kateşinler), izoflavonlar, flavanonoller ve antosiyaninler olarak ana bileşik gruplarına ayırır. En yaygın gözlenenleri flavonoller ve flavonlardır.

#### 1.6.2.1 Antosiyaninler

Antosiyaninler; böğürtlen, ahududu, nar, kırmızı lahana gibi birçok meyve ve sebzenin pembeden mora kadar değişen renklerini veren pigmentlerdir. Doğada bulunan antosiyaninlerin genellikle üçüncü karbon atomundaki hidroksil grubuna; glukoz, galaktoz, ksiloz ve arabinoz gibi şekerlerden biri veya ikisinin bağlanması ile çok farklı renklerde antosiyaninler oluşur. Antosiyaninler, ortam koşullarına (asidik veya bazik) göre renk değişimi gösterirler.

#### 1.6.2.2 Flavonlar

Flavon ve flavon glikozidleri hemen her bitkide bulunan açık sarı renkli bileşiklerdir. Başlıca flavonlar; apigenin, luteolin, tangeritin, krisin, baikalein, skutellarein, vagonindir.

#### 1.6.2.3 Flavonoller

Flavonların üçüncü karbon atomuna hidroksil grubunun bağlanması ile flavonoller oluşmaktadır. Gıdalarda yaygın olarak glikozit formunda

bulunmaktadırlar. Başlıca flavonoller; kaempferol, kuersetin, mirisetin ve izoramnetindir.

#### **1.6.2.4 Flavanonlar**

Flavanonlar da doğada genellikle glikozit formda bulunurlar. Bunlar turunçgil meyvelerinde çok yaygın olarak bulunurlar ve acımsı bir tat verirler. Falvanonlardan naringin, hesperidin, naringenin en yaygın olanlarıdır. Moleküldeki bir halkanın açılması sonucunda önce tatlı kalkonlara, sonrasında hidrojenasyon yoluyla tatlı dihidrokalkonlara dönüşür. Dihidrokalkonların bir kısmı gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.

#### **1.6.2.5 Flavanoller (Kateşinler)**

Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubudur. Hemen hemen her meyvede bulunan kateşinler renksiz bileşiklerdir. Kateşinler, üçüncü karbon atomunda bir -OH grubu içerdiğinden flavan-3-ol olarak da adlandırılırlar. Flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar. Oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler; reaksiyon sonunda proantosiyantinleri oluştururlar. Proantosiyantinler de asidik ortamda ısıtıldıklarında antosiyantinlere dönüşürler.

#### **1.6.2.6 İzoflavonlar**

İzoflavonoidler bazı meyve ve sebzelerde, başta soya fasulyesi olmak üzere çeşitli baklagillerde bulunan bileşiklerdir. Fitoöstrojenlerin alt grubunda yer alırlar. Fitoöstrojenler, insan östradiol hormonuna yapısal benzerliklerinden dolayı östrojenik özelliklere sahiptirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarla izoflavonoidlerin biyoaktif bileşikler olduklarını ve kandaki kolesterol düzeyinin düşürülmesinde önemli rol aldıkları ortaya çıkmıştır. En yaygın olan izoflavonlar; daidzein, genistein ve glisiteindir.

#### **1.6.2.7 Flavanonollar**

Flavanonol grubunun en önemli üyesi taksifolindir. Taksofolin, fibril oluşumunu uyarıp stabilitesini destekleme özelliğinden dolayı medikal tıpta kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 1.7 Biyolojik Aktif Bitki Kaynakları

### 1.7.1 *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus)

Yetiştirilmesi kolay olan hibiskusun taze veya kurutulmuş formları; sıcak ve soğuk içeceklerin, fermente içeceklerin, reçellerin, dondurmanın, çikolatanın, aroma verici maddelerin, pudinglerin ve keklerin hazırlanmasında kullanılır. Özellikle Avrupa ülkelerinde çay olarak tüketimi yaygındır. Gıda maddelerinin yanı sıra alternatif tıpta da yaygın olarak kullanılır. Fenolik bileşikler açısından zengin (özellikle antosiyanin içeriği yüksek) olan bu bitkinin; antioksidan, antimikrobiyal, kansere karşı koruma, anti-diyabetik, anti-hipertansif ve diüretik etkilerinin de olduğu düşünülmektedir (Da-Costa-Rocha et al., 2014).

### 1.7.2 *Hypericum perforatum* (Sarı Kantaron)

Sarı kantaron, homeopatik alternatif tıp yöntemlerinde sıklıkla kullanılan bir bitkidir. Yüksek miktarda hiperforin ve hiperisin içermesinin yanı sıra fenolik bileşiklerce de zengindir. Sarı kantaron, genellikle depresif bozuklukların tedavisinde doğal bitki kaynağı olarak kullanılır. Nevralji, fibrozit, siyatik, menopozal nevroz, anksiyete, depresyon hastalıkları ve yaraların tedavisi için geliştirilen preparatlarda kullanılır (Barnes et al., 2001). Anti-mikrobiyal ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu da kanıtlanmıştır (Hammer and Birt, 2013).

### 1.7.3 *Calendula officinalis* (Aynı Sefa)

Aynı sefa; küçük cilt yaralarını, cilt enfeksiyonlarını, yanıkları, arı sokmasını, güneş yanığını ve siğilleri tedavi etmek amaçlı olarak ve bunun yanı sıra kozmetik sektöründe biyolojik katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fiume, 2001). Yara iyileştirici ajan olarak etkinliği ile ilgili hücre kültürü ve hayvan deneyi içeren birçok çalışma bulunmaktadır. Triterpenoidler ve flavonoidlerce çok zengindir. Bu bitkide bulunan bazı saponinler, sitotoksik özelliklere sahiptir. Bu nedenle ilaç olarak kullanımında uygun dozların belirlenmesi çok önemlidir (Basch et al., 2009).

#### **1.7.4 *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş)**

Karayemiş, diğer adıyla taflan, Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve yaz mevsiminde olgunlaşan meyvedir. Yaş meyve olarak tüketiminin yanında, reçel ve marmelat olarak da bu bölgede yaygın olarak tüketilmektedir (Celep et al., 2012). Karayemiş ile yapılan çalışmalarda, fenolik bileşikleri içerdiği ve antioksidan özellik gösterdiği belirtilmiştir (Kolaylı et al., 2003). Halk arasında mide ülseri, sindirim sistemi problemleri, bronşit, egzama ve hemoroid gibi durumlarda tedavi amaçlı olarak da tüketimi yaygındır. Ancak, bu konu hakkında bilimsel bir veri bulunmamaktadır.



## 2. MATERİYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasallar; Etanol, Metanol, Demir (III) klorür, Potasyum iyodür, İyot, Kurşun asetat, Hidroklorik asit, Sülfirik asit, Gallik asit, Sodyum karbobot, Kuersetin, Alüminyum klorür, Sodyum asetat, Asetik asit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, Ksilenol oranj, Sığır serum albümin, Hidroksilamin-HCl, müreksit, Amonyum demir (II) sülfat hekza hidrat, Tris baz, p-Nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozid, p-Nitrofenol, Gly-Pro-p-Nitroanilid, p-Nitroanilid, Nişasta, Bakır sülfat, Folin reaktifi Sigma (Almanya) firmasından; Potasyum klorür, Sodyum fosfat monobazik, Sodyum fosfat dibazik, Sodyum hidroksit Riedel (Almanya) firmasından; Linolenik asit, D-Glukoz Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.

Cihazlar; Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spektrometre, Hanna H1 2211 pH/ORP metre, Denver Instrument Hassas Tartı, Memmert Çalkalamalı Su Banyosu, Labnet Vortex Mixer, Chiltern Hotplate Manyetik Karıştırıcı HS31.

Hiperglisemi ve diyabetik komplikasyonların engellenmesinde etkin olabilecek fenolik yapıda bileşiklerin eldesinde kaynak olarak *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), *Hypericum* sp. (Sarı Kantaron), *Calendula* sp. (Aynı Sefa) ve *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) kullanıldı. *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) Trabzon yöresinden taze olarak ve diğer kuru bitkiler işlem görmemiş olarak aktardan sipariş usulü ile taze temin edildi ve Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalında tanımlandı.

### 2.2 Metot

#### 2.2.1 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Kuru olarak temin edilen *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), ve *Hypericum* sp. (Sarı Kantaron) bitkileri metanol, etanol ve infüzyon (demleme) ile *Calendula* sp. (Aynı Sefa) metanol ve etanol kullanılarak hazırlandı (Li et al., 2007; Yasir et al., 2016). Bu bitkilerin ekstrelerinin hazırlanmasında çiçek kısımları kullanıldı. Tüm bitkilerin ekstraksiyon koşulları sırasıyla Çizelge 2.1 ve 2.2 de verildi. Ekstraksiyon verimleri hazırlanan bitki ekstrelerinin belirli bir hacminin

kurutulması sonrası elde edilen miktarın bitki çıkış miktarı ile oranlanması ile hesaplandı.

Çizelge 2.1 *Hibiscus sabdariffa* L. ve *Hypericum* sp. ekstraksiyon koşulları.

|                                                                                                                          |                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1 gram bitki + 50mL %70 metanol                                                                                          | 24 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında çalkalama            |
| 1 gram bitki + 50mL %50 etanol                                                                                           |                                                                     |
| 1 gram + 50mL saf su                                                                                                     | 30 dakika boyunca kaynar su (100°C) banyosunda karanlıkta çalkalama |
| Ekstraksiyon sonrasında vakum altında filtrasyon yapıldı ve ekstreler +4°C de karanlıkta kullanılıncaya değin depolandı. |                                                                     |

Çizelge 2.2 *Calendula* sp. ekstraksiyon koşulları.

|                                                                                                                          |                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 0,7 gram bitki + 50mL %70 metanol                                                                                        | 24 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında çalkalama |
| 0,7 gram bitki + 50mL %50 etanol                                                                                         |                                                          |
| Ekstraksiyon sonrasında vakum altında filtrasyon yapıldı ve ekstreler +4°C de karanlıkta kullanılıncaya değin depolandı. |                                                          |

Taze olarak temin edilen *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) meyve ekstratlarının hazırlanması metanol ve etanollü ortamda gerçekleştirildi (Celep et al., 2012; Kolaylı et al., 2003) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 *Prunus laurocerasus* L. ekstraksiyon koşulları.

|                                                                                                                                  |                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8 gram bitki + 50mL %80 metanol                                                                                                  | Havanda öğütme ve sonikasyon sonrası, 2 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında çalkalama |
| 8 gram bitki + 50mL %70 etanol                                                                                                   |                                                                                               |
| Ekstraksiyon sonrasında, 9000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı ve ekstreler +4°C de karanlıkta kullanılıncaya değin depolandı. |                                                                                               |

## 2.2.2 Fitokimyasal Testler (Kalitatif)

Hazırlanan bitki ekstralarında alkaloidlerin, saponinlerin, tanenlerin, fenoller ve flavonoidlerin vb. varlığını belirlemek için gereken fitokimyasal analizler, Mazimba ve ark. nın kullandığı standart yöntemler ile gerçekleştirildi (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4 Fitokimyasal testler.

|                    |      | Örnek | Su | Reaktif                                                                 | Oluşan Renk                                           |
|--------------------|------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Tanen 1</b>     | Test | 1x    | 2x | 1x %1 FeCl <sub>3</sub>                                                 | Yeşil renk                                            |
|                    | Kör  | -     | 3x | 1x %1 FeCl <sub>3</sub>                                                 |                                                       |
| <b>Alkaloid</b>    | Test | 1x    | -  | 3x KI/I karışımı                                                        | Kahverengi çökelek                                    |
|                    | Kör  | -     | 1x | 3x KI/I karışımı                                                        |                                                       |
| <b>Kumarin</b>     | Test | 1x    | -  | 2x %10 NaOH                                                             | Sarı renk                                             |
|                    | Kör  | -     | 1x | 2x %10 NaOH                                                             |                                                       |
| <b>Fenol</b>       | Test | 1x    | -  | 3x %5 FeCl <sub>3</sub>                                                 | Koyu mavi-siyah renk                                  |
|                    | Kör  | -     | 1x | 3x %5 FeCl <sub>3</sub>                                                 |                                                       |
| <b>Aminoasit</b>   | Test | 1x    | -  | 3x<br>Ninhidrin reaktifi (%1)                                           | Mor renk                                              |
|                    | Kör  | -     | 1x | 3x<br>Ninhidrin reaktifi (%1)                                           |                                                       |
| <b>Tanen 2</b>     | Test | 2x    | -  | 3x<br>%1 Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | Sarı çökelek                                          |
|                    | Kör  | -     | 2x | 3x<br>%1 Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> |                                                       |
| <b>Antosiyanin</b> | Test | 1x    | -  | 2x 2M HCl ve<br>1x 4M NH <sub>3</sub>                                   | Pembe-kırmızı renk                                    |
|                    | Kör  | -     | 1x | 2x 2M HCl ve<br>1x 4M NH <sub>3</sub>                                   |                                                       |
| <b>Karbohidrat</b> | Test | 1x    | -  | 2x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                  | Kırmızı-mor renk                                      |
|                    | Kör  | -     | 1x | 2x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                  |                                                       |
| <b>Kinon</b>       | Test | 1x    | -  | 3x der. HCl                                                             | Sarı çökelek                                          |
|                    | Kör  | -     | 1x | 3x der. HCl                                                             |                                                       |
| <b>Glikozid</b>    | Test | 1x    | -  | 1x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(2 dak. bekleme)              | Kırmızı renk                                          |
|                    | Kör  | -     | 1x | 1x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(2 dak. bekleme)              |                                                       |
| <b>Fitosterol</b>  | Test | 1x    | -  | 1x Kloroform,<br>1x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                 | Sarı renk                                             |
|                    | Kör  | -     | 1x | 1x Kloroform,<br>1x der. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                 |                                                       |
| <b>Flavonoid</b>   | Test | 1x    | -  | 1x NaOH, 1x 2M HCl                                                      | Baz ile sarı renk oluşumu, asit ekleyince berraklaşma |
|                    | Kör  | -     | 1x | 1x NaOH, 1x 2M HCl                                                      |                                                       |

### 2.2.3 Fenolik Bileşiklerin Tayini (Kantitatif)

#### 2.2.3.1 Total Fenol Tayini

Bitki ekstralarının toplam fenolik bileşik içerikleri Folin-Ciocalteu'nun fenol reaksiyonuna göre kolorimetrik yöntem ile yapıldı (Seri et al., 2017). Kalibrasyon grafiği oluşturmak amacıyla beş farklı konsantrasyonda %80 etanolde hazırlanan gallik asit çözeltisi (5- 100 µg/ml) kullanıldı. Bitki ekstraları 3 farklı oranda seyreltilerek deneyler 3 kere tekrarlandı. Total fenolik içerik, gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden standart grafiği kullanılarak lineer regresyon formülasyonu ile hesaplandı.

Çizelge 2.5 Total fenolik içeriğin belirlenmesi.

|                                                | Test<br>(µL) | Kör 1<br>(µL) | Standart<br>(µL) | Kör 2<br>(µL) |
|------------------------------------------------|--------------|---------------|------------------|---------------|
| <b>Örnek</b>                                   | 200          | -             | -                | -             |
| <b>Etanol (%80)</b>                            | -            | 200           | -                | 200           |
| <b>Standart<br/>Gallik Asit</b>                | -            | -             | 200              |               |
| <b>Folin reaktifi<br/>(1:10)</b>               | 1000         | 1000          | 1000             | 1000          |
| Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon           |              |               |                  |               |
| <b>%7,5<br/>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>   | 800          | 800           | 800              | 800           |
| Oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat inkübasyon |              |               |                  |               |
| 760 nm'de spektrofotometrik ölçüm              |              |               |                  |               |

#### 2.2.3.2 Total Flavonoid Tayini

Bitki ekstralarında total flavanoid içeriğin belirlenmesi Quettier'in (2000) kullandığı spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği oluşturmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/mL) metanolde hazırlanan kuersetin standart çözeltisi kullanıldı. Total flavanoid içerik, kuersetin standart grafiği lineer regresyon formülasyonu ile hesaplandı. Bitki ekstraları 3 farklı oranda seyreltilerek deneyler 3 kere tekrarlandı.

Çizelge 2.6 Total flavanoid içeriğinin belirlenmesi.

|                                            | <b>Test<br/>(µL)</b> | <b>Kör 1<br/>(µL)</b> | <b>Standart<br/>( µL)</b> | <b>Kör 2<br/>(µL)</b> |
|--------------------------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>Örnek</b>                               | 100                  |                       | -                         | -                     |
| <b>Metanol</b>                             | -                    | 100                   |                           | 100                   |
| <b>Standart<br/>Kuersetin</b>              | -                    | -                     | 100                       | -                     |
| <b>%2 AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O</b> | 100                  | 100                   | 100                       | 100                   |
| Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon      |                      |                       |                           |                       |
| 405 nm’de spektrofotometrik ölçüm          |                      |                       |                           |                       |

### 2.2.3.3 Total Antosiyanin Tayini

Bitki ekstrelerinde total antosiyanin içeriğinin belirlenmesi P’erez ve arkadaşlarının (2014) kullandığı siyanidin-3-glikozid ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirildi. Antosiyaninlerin farklı pH değerlerindeki davranışına bağlı olarak pH 1’de okzanyum form (renkli) , pH 4,5’te hemikal form (renksiz) gözlenmesine dayalı olarak iki farklı dalga boyunda ölçümler alındı. Bitki ekstreleri 3 farklı oranda seyreltilerek deneyler 3 kere tekrarlandı. Hesaplamalar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak yapıldı.

Çizelge 2.7 Total antosiyanin içeriğinin belirlenmesi.

|                                                                      | <b>Test<br/>(mL)</b> | <b>Kör<br/>(mL)</b> |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Örnek</b>                                                         | 0,5                  | -                   |
| <b>Tampon</b><br>25 mM KCl (pH 1.0)<br>0,4 M sodyum asetat ( pH 4,5) | 2                    | 2                   |
| <b>Ekstraksiyon ortamı</b><br>Metanol/Etanol/Su                      | -                    | 0,5                 |
| Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyon                    |                      |                     |
| 520 nm ve 700nm’de spektrofotometrik ölçüm                           |                      |                     |

$$\text{Antosiyanin Konsantrasyonu (mg/L)} = (A \times MA \times SF \times 1000) / (\epsilon \times L)$$

A: Absorbans

$$A = (A_{520} - A_{700})_{(pH\ 1)} - (A_{520} - A_{700})_{(pH\ 4,5)}$$

MA: Molekül ağırlığı (Siyanidin-3-glikozid için 449 g/mol)

SF: Örneğin seyreltme faktörü

$\epsilon$ : Ekstinksiyon katsayısı (Siyanidin-3-glikozid için 26,900 L/mol.cm)

L: Işık yolu (cm)

1000: gram-miligram çevirimi

#### 2.2.4 Antioksidan Etkinliğin Belirlenmesi

Bitki ekstralarında antioksidan etkinliğin incelenmesi DPPH radikal giderim yöntemine göre gerçekleştirildi. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), oksidasyon sonucu oluşan serbest radikaldır ve bu radikalın giderimi esasına göre antioksidan etkinlik belirlendi (Pavithra and Vadivukkarasi, 2015). Bitki ekstraları 3 farklı oranda seyreltilerek deneyler 3 kere tekrarlandı. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanıldı.

Çizelge 2.8 Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.

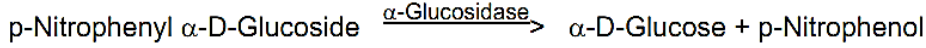
|                                                   | <b>Kontrol</b><br>( $\mu$ L) | <b>Kör 1</b><br>( $\mu$ L) | <b>Örnek</b><br>( $\mu$ L) | <b>Kör 2</b><br>( $\mu$ L) |
|---------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Metanol</b>                                    | 100                          | 200                        | -                          | 100                        |
| <b>DPPH*</b>                                      | 100                          | -                          | 100                        | -                          |
| <b>Örnek</b>                                      |                              |                            | 100                        | 100                        |
| Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyon |                              |                            |                            |                            |
| 517'nm de spektrofotometrik ölçüm                 |                              |                            |                            |                            |

\*0,2 mM DPPH (metanolde) hazırlandı.

% Antioksidan Etkinlik =  $[(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}) / (A_{\text{Kontrol}})] \times 100$  formülü kullanılarak antioksidan etkinlik belirlendi. Antioksidan etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile EC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda etkinlik deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % Etkinlik olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % Etkinlik eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile EC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50'sine etki eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 2.2.5 $\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonunun Belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin  $\alpha$ -Glukozidaz inhibisyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aktivite ölçümlerinde p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glukozid substrat olarak kullanıldı. Yöntem  $\alpha$ -Glukozidaz ile p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glukozid'in hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitrofenol'ün 405 nm'de absorpsiyonunun mikropilaya okuyucu ile spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanır (Zhang et al., 2014).



**Substrat Çözeltisi** : 2 mM p-nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozid çözeltisi , 15 mg p-nitrofenil- $\alpha$ -glukopiranozidin 25 mL 50 mM pH:6,8 Sodyum Fosfat Tamponu içerisinde çözülmesi ile hazırlandı.

**Standart Çözeltisi**: 10 mM p-nitrofenol ( standartlar; 10-100 nmol)

**Enzim**; *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -Glukozidazı

Çizelge 2.9  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi.

|                                           | <b>Kontrol</b><br>( $\mu$ L) | <b>Kör 1</b><br>( $\mu$ L) | <b>İnhibitör Test</b><br>( $\mu$ L) | <b>Kör 2</b><br>( $\mu$ L) |
|-------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| <b>Tampon</b><br>50 mM pH:6,8 Na/Fosfat   | 125                          | 200                        | 115                                 | 190                        |
| <b>Enzim</b>                              | 50                           | 50                         | 50                                  | 50                         |
| <b>Bitki Ekstresi*</b>                    | -                            | -                          | 10                                  | 10                         |
| 10 dakika, karanlıkta 37 °C'de inkübasyon |                              |                            |                                     |                            |
| <b>Substrat</b>                           | 75                           | -                          | 75                                  | -                          |
| 10 dakika, karanlıkta 37 °C'de inkübasyon |                              |                            |                                     |                            |
| 405 nm'de spektrofotometrik ölçüm         |                              |                            |                                     |                            |

\*Hesaplamalarda kıyaslama yapabilmek için her bir bitki ekstrelerinin fenolik bileşik içeriği dikkate alındı.

$$\text{Enzimin Spesifik Aktivitesi} = [(\mu\text{mol p-Nitrofenol/dak})]/\text{mg protein}$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}})/(A_{\text{Kontrol}})] * 100$$

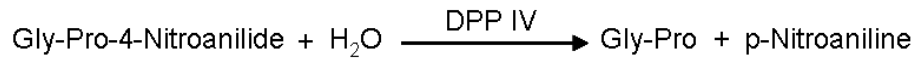
İnhibisyon etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda inhibisyon deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % İnhibisyon olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % İnhibisyon eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile IC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50'sini inhibe eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak akarboz kullanıldı.

### 2.2.6 DPP-4 İnhibisyonunun Belirlenmesi

Bütçenin kısıtlı olması nedeni ile DPP-4 enzimi ticari olarak temin edilememiştir. Bu nedenle inhibisyon çalışmalarında kullanmak üzere enzim preparatı tarafımızdan hazırlandı. DPP-4 yaygın olarak bir çok doku ve organda lokalize olan bir enzimdir. Bu çalışmada en fazla bulunduğu organ olarak böbrek kullanıldı. Bu amaçla kesim sırasında temin edilen organlar serum fizyolojik ile yıkama sonrası tartılarak sıvı azotta donduruldu. Böbrekten ham enzim ekstraktı hazırlamak için sırasıyla, sıvı azotta doku örnekleri öğütüldü (freze-thaw) ve 50 mM Tris HCl pH 8.0 içerisine alındı. Homojenat 10 000 g'de 20 dakika, 4°C de santrifüjlendi. Süpernatantta DPP-4 enzim aktivitesi ve protein tayini yapılarak inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere porsiyonlanarak -20°C'de depolandı.

#### *Enzim Aktivite Tayini*

DPP-4 aktivite ölçümlerinde Gly-Pro-p-nitroanilid substrat olarak kullanıldı. Yöntem Dipeptidil peptidaz 4 ile Gly-Pro-p-nitroanilid'in hidroliz reaksiyonu sonucu açığa çıkan p-nitroanilin'in 405 nm'de absorpsiyonunun mikropilaka okuyucu ile spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanır.



Enzim aktivitesi (1 unite): 0.1 M Tris/HCl pH 8.0 varlığında 37°C de Gly-Pro-4-nitroanilid den dakikada oluşan 1 µmol p-nitroanilin olarak ifade edilir.(1 Unite= µmol/dakika)

Böbrekten elde edilen enzim ekstraktında DPP-4 enzim aktivite tayinleri 3 tekrarlı olarak aşağıdaki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Tampon: 0.1 M Tris/HCl pH 8.0

Substrat: Gly-Pro-p-nitroanilid; 1mM(Tampon içinde hazırlanmış)

Enzim: Böbrekten hazırlanan enzim preparatı

Standart: p-nitroanilin(50 - 250 µmol/ml)

- 10 µl her bir standart, enzim preparatı (farklı seyrelmelerde) ve Tampon (kör) mikro plaka kuyucuklarına pipetlendi.
- 90 µl Tampon ve 100 µl substrat (kör dâhil) ilave edildi.(Toplam hacim 200 µl)
- 37°C de 15 dakika mikroparka okuyucu içinde inkübasyon sonrası 405 nm’de absorbanslar okundu.
- Standartlar ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı.

İnhibitörsüz koşullarda enzim aktivite ölçümleri kıyaslama amacı ile her deney seti için en az 3 tekrarlı çalışıldı.

#### *DPP-4 İnhibitör Aktivitelerinin Belirlenmesi*

Bitki ekstraları ve enzimin 37°C de ön inkübasyonları sonrasında optimum koşullarda aktivitelerinin ölçülerek aktivitelerdeki düşüşün belirlenmesi ile gerçekleştirildi. Bu bağlamda bitki ekstraları fenolik bileşik konsantrasyonları temel alınarak değişen fenol konsantrasyonlarında inhibisyon taraması yapıldı. DPP-4’ün spesifik inhibitörü olan Diprotein A (Ile-Pro-Ile) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar kontrol aktivitelerle kıyaslanarak ve her bir fraksiyon için İnhibitor aktiviteleri belirlendi. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülasyona göre hesaplandı.

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

İnhibisyon etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda inhibisyon deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % İnhibisyon olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % İnhibisyon eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile IC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50’sini inhibe eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 2.2.7 $\alpha$ -Amilaz İnhibisyonunun Belirlenmesi

$\alpha$ -Amilaz inhibitör aktivitesi modifiye Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (I/KI) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemin prensibi, hidrolizlenmeyen nişastanın KI/I (5 mM KI/ 5mM I) reaktifi ile oluşturduğu rengin belirlenmesine dayanır (Xiao et al., 2006). Nişasta,  $\alpha$ -amilaz tarafından parçalandıkça ortamda KI/I reaktifi ile oluşturduğu mavi renk açılmaktadır.

Çizelge 2.10  $\alpha$ -Amilaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi

|                                             | Kontrol<br>( $\mu$ L) | Kör 1<br>( $\mu$ L) | İnhibitörlü<br>( $\mu$ L) | Kör 2<br>( $\mu$ L) |
|---------------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>0,1 M Na-Fosfat<br/>Tamponu (pH 7,4)</b> | 40                    | 80                  | -                         | 40                  |
| <b><math>\alpha</math>-Amilaz</b>           | 40                    | -                   | 40                        | -                   |
| <b>Nişasta (%0.07)</b>                      | 40                    | 40                  | 40                        | 40                  |
| <b>Bitki Ekstresi</b>                       | -                     | -                   | 40                        | 40                  |
| 5 dakika, karanlıkta 37 °C'de inkübasyon    |                       |                     |                           |                     |
| <b>1 M HCl</b>                              | 20                    | 20                  | 20                        | 20                  |
| <b>KI/I (5 mM KI/ 5 mM I)</b>               | 100                   | 100                 | 100                       | 100                 |
| 620 nm'de spektrofotometrik ölçüm           |                       |                     |                           |                     |

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}})/(A_{\text{Kontrol}})] * 100$$

İnhibisyon etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda inhibisyon deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % İnhibisyon olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % İnhibisyon eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile IC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50'sini inhibe eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 2.2.8 Lipoksigenaz İnhibisyonunun Belirlenmesi

Lipoksigenaz enzimi aktivitesinin belirlenmesinde Hayes ve arkadaşlarının (1995) geliştirdiği modifiye FOX (Ferröz oksidasyon-Ksilenol oranj) yöntemi ile belirlendi. Yöntem; Fe<sup>2+</sup>'nin Fe<sup>3+</sup>'ye yükseltgenmesi sonucu ksilenol oranj (XO) ile oluşturduğu kompleksin spektrofotometrik olarak 550 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

Lipoksigenaz (1 mg/mL) , 50 mM, pH 7.4 Tris-HCl

FOX reaktifinin hazırlanışı : 8 mg ksilenol oranj, 8 mg FeSO<sub>4</sub> 136 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9:1 metanol su karışımı içinde çözülerek hazırlanır (2 mM ksilenol oranj; XO ve 8 mM amonyum demir (II) sülfat hekza hidrat; FAS)

Substrat: 5 µL linoleik asit 100 µL Tween 20 içinde çözülür 50 mM pH 7,4 Tris-HCl tamponuyla hacim 10 mL'ye tamamlanır.

Çizelge 2.11 Lipoksigenaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi.

|                                             | <b>Kontrol<br/>(µL)</b> | <b>Kör<br/>(µL)</b> | <b>İnhibitörlü Test<br/>(µL)</b> | <b>Kör<br/>(µL)</b> |
|---------------------------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>Enzim</b>                                | 50                      | -                   | 50 µL                            | -                   |
| <b>50 mM, Tris-HCl<br/>Tamponu (pH 7.4)</b> | 800                     | 850                 | 750                              | 800                 |
| <b>Bitki Ekstresi</b>                       | -                       | -                   | 50                               | 50                  |
| 2 dakika, karanlıkta 37 °C'de inkübasyon    |                         |                     |                                  |                     |
| <b>Metanol:su (9:1)</b>                     | 25                      | 25                  | 25                               | 25                  |
| <b>Substrat</b>                             | 50                      | 50                  | 50                               | 50                  |
| 10 dakika, karanlıkta 37 °C'de inkübasyon   |                         |                     |                                  |                     |
| <b>XO (2 mM)</b>                            | 50                      | 50                  | 50                               | 50                  |
| <b>FAS (8 mM)</b>                           | 25                      | 25                  | 25                               | 25                  |
| 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyon        |                         |                     |                                  |                     |
| 560nm'de spektrofotometrik ölçüm            |                         |                     |                                  |                     |

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}})/(A_{\text{Kontrol}})] * 100$$

İnhibisyon etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda inhibisyon deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % İnhibisyon olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % İnhibisyon eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile IC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50'sini inhibe eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 2.2.9 Deglikasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Deglikasyon etkinliklerinin incelenmesi amacı ile öncelikle deglikasyonun en iyi izlenebileceği *in vitro* glikasyon modeli kullanıldı (McPherson et al., 1988). Bu bağlamda oluşturulan model farklı ekstraksiyon ortamı ile hazırlanan bitki preparatlarının her biri 100 mM potasyum fosfat (pH:7.4) tamponunda çözülerek Glukoz-BSA *in vitro* glikasyon sisteminde [10 mg/mL BSA ve 500 mM D-glukoz içeren 100 mM potasyum fosfat (pH:7.4 ; %0,02 sodyum azid)] 90°C’de 90 dakika inkübasyon sonrasında spektrofotometrik ölçüm (405nm) alındı. Kontrol olarak bitki ekstraktı içermeyen glikasyon ortamı kullanıldı. Glikasyonun inhibisyonu aşığıdaki formülasyona göre hesaplandı.

Çizelge 2.12 Glikasyon inhibisyonunun belirlenmesi (*in vitro*).

|                                     | Kontrol<br>(mL) | Kör 1<br>(mL) | İnhibitörlü Test<br>(mL) | Kör 2<br>(mL) |
|-------------------------------------|-----------------|---------------|--------------------------|---------------|
| BSA (10 mg/mL)                      | 1               | 1             | 1                        | 1             |
| Glukoz (500 mM)                     | 1               | -             | 1                        | -             |
| Bitki ekstresi                      | -               | -             | 0,1                      | 0,1           |
| 100 mM K/fosfat<br>(pH:7.4) Tamponu | 1               | 2             | 0,9                      | 1,9           |
| 90 dakika, 90 °C’de inkübasyon      |                 |               |                          |               |
| 405 nm’de spektrofotometrik ölçüm   |                 |               |                          |               |

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}})/(A_{\text{Kontrol}})] * 100$$

İnhibisyon etkinliği belirlenen örneklerin değişen konsantrasyonlarında yapılan deneyleri ile IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu amaçla en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda inhibisyon deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % İnhibisyon olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % İnhibisyon eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile IC<sub>50</sub> değeri; biyolojik aktivitenin % 50’sini inhibe eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 2.2.10 Metal Şelatlama Etkinliğinin Belirlenmesi

Bitki ekstrelerinin metal şelatlama etkinliği, müreksitin  $\text{Cu}^{2+}$  ile verdiği kompleksin renk şiddetinin ölçümüne dayalı yöntem ile belirlendi (Ruiz-Roca et al., 2008). Ortam pH'sını dengelemek için 10 mM KCl içeren, 10 mM pH 5 Hidroksilamin-HCl tamponu kullanıldı. 0,25mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (tamponda) ve 1mM TMM (müreksit) (suda) hazırlandı. Bakır (II) sülfat çözeltisi 10 mM KCl içeren 30 mM hidroksilamin hidroklorür tamponunda (pH 5.0) hazırlandı. Bakır şelatasyon aktivitesine bakılacak bitki ekstreleri fenol içeriklerine göre farklı oranlarda seyreltilerek 50  $\mu\text{L}$  örnek üzerine 50  $\mu\text{L}$  bakır çözeltisi (0,25 mM) ve 25  $\mu\text{L}$  müreksit (1 mM) ilave edildi (Kontrol grubuna ise sadece bakır çözeltisi eklendi). 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası Lambda 35 UV/Vis spektrometrede 462 nm ve 530 nm de ölçüm alındı. Absorbans 462/530 oranı metal şelatasyon aktivitesini göstermektedir. Bu oran ne kadar düşükse metal şelatasyon aktivitesi o kadar fazladır. 0,025-0,125 mM aralığında bakır (II) sülfat çözeltisi ile oluşturulan kalibrasyon eğri ve katsayılar yardımı ile seyrelme faktörleri de göz önüne alınarak serbest bakır konsantrasyonları belirlendi. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

$$\% \text{ Şelatasyon (Bağlı Metal): } \left( 1 - \frac{ABS_{530}^{462} \text{örnek} - ABS_{530}^{462} \text{kör}}{ABS_{530}^{462} \text{Kontrol}} \right) \times 100$$

$\text{EC}_{50}$  değerlerinin belirlenmesi amacı ile en az 5 farklı örnek (fenol) konsantrasyonunda etkinlik deneyleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Kontrole kıyasla % Etkinlik olarak sonuçlar değerlendirildi. Elde edilen % Etkinlik eğrileri lineer regresyon formülasyonları ile  $\text{EC}_{50}$  değeri; biyolojik aktivitenin % 50'sine etki eden ekstre fenol konsantrasyonu olarak hesaplandı.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fenolik maddeler günümüzde esansiyel olmayan aynı zamanda besin değeri de olmayan bileşikler olarak düşünülmektedir. Ancak insan sağlığı üzerine etkileri bulunduğu da bilinmektedir. Flavonoidlerin en önemli biyolojik özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin birçoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavanoid radikallerinin stabilitesini ve böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir.

Bu bağlamda bu çalışma kapsamında *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), *Hypericum* sp. (Sarı kantaron), *Calendula* sp. (Aynı sefa) ve *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) bitki ekstrelerinde hiperglisemi ve diyabetik komplikasyonların engellenmesinde etkin olabilecek fenolik yapıda bileşiklerin incelenmesi ve karakterizasyonu hedeflendi. Bu amaçla bitki ekstrelerinin farklı ortamlarda hazırlanması, fitokimyasal testleri, fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi ve diyabet ile ilgili çeşitli biyolojik etkinliklerinin incelenmesi çalışma kapsamında tutuldu.

#### 3.1 Bitki Ekstrelerinin Eldesi

Fenolik bileşiklerin karakteristik özelliklerine göre çözünürlükleri değişeceğinden çoğunlukla tek bir ekstraksiyon ortamı ile ortamdaki tüm etkin fenolikleri elde etmek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle gerek en etkili ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi gerekse farklı biyolojik etki gösterebilen fenoliklerin elde edilebilmesi amacıyla farklı koşullarda ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi (Şekil 3.1) ve ekstraksiyon verimleri hesaplandı (Çizelge 3.1). Bitki ekstrelerinin ekstraksiyon verimleri her bir bitkideki çözünen bileşenlerin belirli bir hacminin kurutulması sonrası elde edilen miktarın bitki çıkış miktarı ile oranlanması ile hesaplandı.



Şekil 3.1 Elde edilen bitki ekstraktları sırasıyla; hibiskus (metanolik, etanolik, demleme ekstraktları), sarı kantaron (metanolik, etanolik, demleme ekstraktları), aynı sefa (metanolik, etanolik ekstraktları), karayemiş (metanolik, etanolik ekstraktları).

Çizelge 3.1 Bitki ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri.

| Bitki                | Ekstre    | Ekstraksiyon verimi % |
|----------------------|-----------|-----------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik | 30                    |
|                      | Etanolik  | 50                    |
|                      | Demleme   | 50                    |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik | 20                    |
|                      | Etanolik  | 30                    |
|                      | Demleme   | 40                    |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik | 40                    |
|                      | Etanolik  | 50                    |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik | 40                    |
|                      | Etanolik  | 50                    |

Tüm bitkiler genel olarak değerlendirildiğinde metanolde hazırlanan ekstraktların verimlerinin etanol ve/veya demleme yolu ile suda hazırlananlara kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi. Diğer yandan sarı kantaron dışındaki tüm bitkilerin ise verimlerinin benzer (%40-50) oldukları görülmektedir. Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ve karakterizasyonu ile yapılan çalışmalar incelendiğinde; farklı ekstraksiyon verimleri rapor edilmiştir (Dhanani et al., 2017; Tian et al., 2017; Yasir et al., 2015; Esmaeili et al., 2015). Genel olarak Hibiskus, Sarı kantaron ve Aynı sefa bitkilerinin ekstraksiyonunda çoğunlukla metanol/etanol çözgen sistemlerinin kullanıldığı dikkat çekmektedir. Literatürde Hibiskus ve Aynı sefa bitkilerinin, bu çözgen sistemlerinde hazırlanmış ekstraktlarında, ekstraksiyon verimleri verilmemiş olup, elde edilen verim sonuçları

ile karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, Hibiskus'un su ile ekstresi hazırlanan bir çalışmada ekstraksiyon verimi % 28,3 olarak bulunmuştur (Alarcon-Alonso et al., 2012). Farklı yörelerden elde edilen Sarı kantaron'un etanol ile hazırlanan ekstrelerinde, ekstraksiyon verimleri % 19,82 ile % 26,36 aralığında verilmiştir (Marrelli et al., 2014). Bu çalışmada hazırlanan Sarı kantaron etanolik ekstresinde ise ekstraksiyon veriminin literatür verilerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Diğer yandan olan Karayemiş ile yapılan çalışmalar sınırlı olup bu çalışma kapsamında taze meyveler kullanıldığından herhangi bir kıyaslama yapılamadı. Bu bağlamda hibiskus, sarı kantaron, aynı sefa ve karayemiş ekstrelerinin genel olarak ekstraksiyon verimlerinin yüksek olduğu gözlemlendi.

### 3.2 Fitokimyasal Testler (Kalitatif)

Fitokimya (Yunancada: phyton: bitki; chemia: dönüşme) ya da başka bir deyişle bitki kimyası, doğal organik ürün kimyası ve bitki biyokimyası arasında bir yerde, belirli disiplinlerle birlikte son yıllarda gelişmiştir. Bitkiler tarafından üretilen organik maddelerin biyosentezinin, metabolizmasının ve biyolojik fonksiyonlarının, kimyasal yapılarıyla ele alınması fitokimyanın konusu içindedir. Bitkilerin ikincil metabolik faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, sadece besin olarak tüketildikleri zaman insan sağlığı için yararlı etkilerde bulunan biyoaktif bileşiklere bitki kimyasalları (fitokimyasallar) denir. Bitkilerin kendilerine özgü renk, koku ve tatlarının oluşmasında biyolojik aktif maddeler olan fitokimyasallar etkili bir role sahiptir. Fonksiyonel gıda özelliği gösteren fitokimyasallar; alkaloidler, karotenoidler, flavonoidler, polifenoller, fitosteroller, fitoestrogenler, indoller ve tanninler, sülfidler gibi pek çok şekilde gruplandırılabilir.

Bu çalışma kapsamında hazırlanan bitki ekstrelerinin fitokimyasal içerikleri kalitatif olarak Bölüm 2.2.2 de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Kalitatif fitokimyasal testler genel olarak irdelendiğinde tarama yapılan tüm bitkilerin fenolik bileşik içeriğinin olduğu ve hepsinin de flavonoidler açısından zengin olduğu söylenebilir. Ancak bunlar arasında özellikle Sarı kantaron'un ve Hibiskus'un farklı çözgen sisteminde hazırlanan tüm ekstrelerin fitokimyasal içeriğinin çeşitlilik açısından en zengin oldukları söylenebilir (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2 Karayemiş ve Hibiskus'un fitokimyasal analizleri.

| Test        | Karayemiş      |                | Hibiskus       |                |                              |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|
|             | MeOH<br>(% 80) | EtOH<br>(% 70) | MeOH<br>(% 70) | EtOH<br>(% 50) | dH <sub>2</sub> O<br>Demleme |
| Tanen 1     | +              | +              | +              | +              | +                            |
| Tanen 2     | +              | +              | +++            | +++            | +                            |
| Alkaloid    | -              | -              | -              | -              | -                            |
| Antosiyanin | -              | -              | ++             | ++             | ++                           |
| Kumarin     | -              | -              | ++             | ++             | ++                           |
| Karbohidrat | -              | -              | ++             | ++             | +                            |
| Fenol       | +              | +              | +              | +              | +                            |
| Amino asit  | -              | -              | +              | +              | +                            |
| Glikozid    | -              | -              | ++             | ++             | +                            |
| Fitosterol  | -              | -              | +              | +              | -                            |
| Flavonoid   | ++             | ++             | ++             | ++             | ++                           |

Çizelge 3.3 Aynı safa ve Sarı Kantaron'un fitokimyasal analizleri

| Test        | Aynı Safa      |                | Sarı Kantaron  |                |                              |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------|
|             | MeOH<br>(% 70) | EtOH<br>(% 50) | MeOH<br>(% 70) | EtOH<br>(% 50) | dH <sub>2</sub> O<br>Demleme |
| Tanen 1     | -              | -              | +++            | +++            | ++                           |
| Tanen 2     | ++             | ++             | +++            | +++            | +                            |
| Alkaloid    | -              | -              | ++             | ++             | +                            |
| Antosiyanin | -              | -              | +              | +              | -                            |
| Kumarin     | +              | +              | +++            | +++            | +++                          |
| Karbohidrat | -              | -              | +++            | +++            | ++                           |
| Fenol       | +              | +              | +++            | +++            | +++                          |
| Amino asit  | -              | -              | -              | -              | -                            |
| Glikozid    | -              | -              | +++            | +++            | +                            |
| Fitosterol  | +              | +              | ++             | +++            | ++                           |
| Flavonoid   | ++             | ++             | +++            | +++            | +++                          |

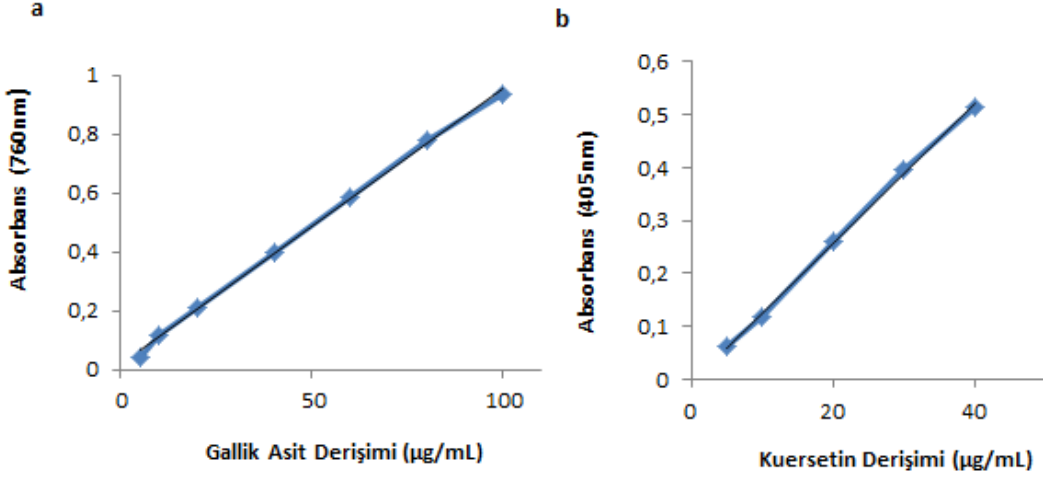
Günümüze değin bitkiler ile yapılan birçok çalışmada bitkilerin çeşitli özelliklerine ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak fitokimyasal içeriklerinin değiştikleri belirtilmektedir (Ekayanti et al., 2013; Senguttuvan et al., 2014; Ramamurthy and Sathiyadevi, 2017; Vaghasiya et al., 2011). Hibiskus, Sarı kantaron ve Aynı sefa fitokimyasal içeriklerine bakıldığında genel olarak; flavonoid, karbohidrat, amino asit ve uçucu yağ açısından zengin oldukları görülmektedir (Bhaskar et al., 2011; Dastagir et al., 2016; Muley et al., 2009). Ayrıca, Hibiskus'ta antosiyanin içerik; Sarı kantaron'da tanenler; Aynı sefa'da terpenoidler ve kumarin gözlemlendiği de rapor edilmiştir. Bu bağlamda elde edilen kalitatif fitokimyasal sonuçlar ile literatürdeki bu verilerin benzerlik gösterdiği gözlemlendi. Karayemiş ile yapılan çalışmalar sınırlı olup kantitatif total fenol, flavonoid ve antosiyanin içeriğinin belirlendiği bir çalışma (Celep et al., 2012), karetenoidlerin ve bazı vitaminlerin incelendiği bir çalışma (Sanches-Silva et al., 2013) ve bir de minerallerin ve kantitatif total fenol içeriğinin belirlendiği bir çalışma (Kolaylı et al., 2003) bulunmaktadır. Bunun dışında kalitatif fitokimyasal içerik hakkında herhangi bir veri olmaması sebebiyle kıyaslama yapılamadı.

### 3.3 Fenolik Bileşiklerin Tayini (Kantitatif)

Fenolik bileşikler, bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bunun yanı sıra fenolik bileşikler çeşitli biyolojik etkinliklere de sahiptirler. Sağlık alanında çeşitli semptomların önlenmesinde veya tedavisinde kullanılma potansiyelleri bulunmaları nedeni ile sıklıkla çalışılan konular arasındadır. Bu çalışmada fenolik bileşiklerce zengin oldukları öngörülen Hibiskus, Sarı kantaron, Aynı sefa ve Karayemiş ekstraktlarının kantitatif olarak Bölüm 2.2.3' te belirtildiği şekilde total fenol, total flavonoid ve total antosiyanin içerikleri belirlendi. Çalışma kapsamında bitki ekstraktlarının biyolojik etkinliklerinin incelenmesi hedeflendiğinden etken konsantrasyonların hesaplanmasında ve karşılaştırmalı deneylerde bitki total fenolik içerikleri temel olarak alındı.

Total fenol içeriğinin belirlenmesi için referans olarak gallik asit, total flavonoid içeriğinin belirlenmesi için ise kuersetin kullanıldı. Bu bileşiklerin artan derişimleri ile kalibrasyonlar hazırlandı. Kalibrasyon eğrilerinden (Şekil 3.4) elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile total fenol ve total flavonoid içerikler

belirlendi. Total antosiyanin içerik ise pH değişim metodu ile siyanidin-3-glikozid ölçümüne dayalı olarak belirlendi.



Şekil 3.2 a) Total fenol tayini için hazırlanan kalibrasyon grafiği  $y = 0,0094x + 0,0187$  ( $R^2=0,9983$ ), b) Total flavonoid tayini için hazırlanan kalibrasyon grafiği ;  $y = 0,0132x - 0,008$  ( $R^2=0,9988$ )

Total fenol ve flavanoid konsantrasyonları, kalibrasyon grafikleri lineer regresyon formülasyonları kullanılarak sırasıyla; Gallik Asit Eşdeğeri (µg GAE/mL) ve Kuersetin Eşdeğeri (µg QE/mL) cinsinden hesaplandı. Total antosiyanin konsantrasyonu ise  $(A \times MA \times SF \times 1000) / (\epsilon \times L)$  formülasyonu ile mg/L olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar, her bitki ekstresi için gram ekstre başına miligram GAE / QE / Siyanidin 3-glikozid olarak verildi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 irdelendiğinde Sarı kantaronun metanolik ve etanolik ekstrelerinin en yüksek fenol, flavonoid ve kayda değer ölçüde antosiyanin içerdiği görülmektedir. Diğer yandan Hibiskusun metanolik ekstresinin özellikle antosiyaninler açısından çok zengin olduğu görülmektedir. Karayemiş ise taze meyve kütlesine bağlı olarak çalışılan diğer bitkilere kıyasla en az total fenol ve diğer fenolikleri içermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda mg fenol başına antosiyanin ve flavonoid açısından değerlendirildiğinde ise Hibiskus metanolik ekstresinin antosiyanin ve Sarı kantaron'un ise flavonoidce zengin olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar çalışma kapsamında tutulan biyolojik aktivitelerin değerlendirilmesinde etkinin hangi tip fenolik bileşikten gelebileceğini yorumlamak açısından yararlı olacaktır.

Çizelge 3.4 Bitki ekstralarının total fenol, total flavonoid ve total antosiyanin içerikleri.

| Bitki            | Ekstre    | Total fenol<br>(mg GAE/g ekstre) | Total flavonoid<br>(mg QE/<br>g ekstre) | Total antosiyanin<br>(mg Siyanidin-3-<br>glikozid/<br>g ekstre) |
|------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Hibiskus         | Metanolik | 53,6 ± 0,1                       | 4,4 ± 0,7                               | 2,394 ± 0,059                                                   |
|                  | Etanolik  | 27,9 ± 0,5                       | 1,5 ± 0,1                               | 0,914 ± 0,005                                                   |
|                  | Demleme   | 27,4 ± 0,3                       | 1,5 ± 0,1                               | 0,679 ± 0,017                                                   |
| Sarı<br>Kantaron | Metanolik | 548,6 ± 12,9                     | 138,0 ± 4,0                             | 0,787 ± 0,073                                                   |
|                  | Etanolik  | 342,2 ± 8,1                      | 79,7 ± 1,9                              | 0,376 ± 0,033                                                   |
|                  | Demleme   | 18,2 ± 0                         | 4,2 ± 0,3                               | 0,005 ± 0,003                                                   |
| Aynı Sefa        | Metanolik | 19,7 ± 0,6                       | 9,0 ± 0,3                               | 0,008 ± 0,005                                                   |
|                  | Etanolik  | 18,5 ± 0,2                       | 5,3 ± 0,3                               | 0,007 ± 0,005                                                   |
| Karayemiş        | Metanolik | 3 ± 0,2                          | 0,2 ± 0                                 | 0,002 ± 0,001                                                   |
|                  | Etanolik  | 3 ± 0,2                          | 0,2 ± 0                                 | 0,002 ± 0                                                       |

Farklı ülkelerden tedarik edilerek metanolik ekstraları hazırlanan Hibiskus ile yapılan farklı bir çalışmada total fenolik içerik,  $18,98 \pm 2.7$  mg fenol/g ekstre ile  $29,9 \pm 0.5$  mg fenol/g ekstre aralığında bulunmuştur (Zhen et al., 2016). Bu çalışmada ise Hibiskus metanolik ekstresinde total fenol içerik daha yüksek gözlemlendi ( $53,6 \pm 0,1$  mg fenol/g ekstre). Hibiskus'un 2 farklı türü ile yapılan başka bir çalışmada ise; hem metanolik hem de demleme ekstraları hazırlanmış, total fenol içerikleri  $1044 \pm 100$  mg/100 g ekstre,  $1226 \pm 518$  mg/100 g ekstre,  $1578 \pm 213$  mg/100 g ekstre ve  $1975 \pm 269$  mg/100 g ekstre olarak bulunmuştur. Bu değerler gram ekstre başına düşünüldüğünde, bu çalışmada elde edilen sonuçlardan düşük olduğu gözlemlendi. Diğer yandan total flavonoid içeriğin türe bağlı olarak  $580 \pm 50$  mg/100 g ekstre ile  $4257 \pm 102$  mg/100g ekstre aralığında farklı olduğu; antosiyanin içeriğin ise sadece bir türde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Morales-Luna et al., 2018).

Farklı yörelerden elde edilen Sarı kantaron bitkilerinin etanolik ekstreleri ile yapılan bir çalışmada total fenolik içerik;  $27,87 \pm 1,34$  mg fenol/g ekstre ile  $41,77 \pm 0,29$  mg fenol/g ekstre aralığında bulunmuştur (Marrelli et al., 2014). Sarı kantaron metanolik ekstresi ile yapılan başka bir çalışmada ise; total fenol içerik  $15,3 \pm 0,3$  mg fenol/100g örnek, total flavonoid içerik  $8,5 \pm 0,1$  mg flavonoid/100g örnek olarak bulunmuştur. (PharmaGnose, 2015). Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında; elde edilen Sarı kantaron metanolik ve etanolik ekstrelerinde hem fenolik içerik hem de flavonoid içerik yüksektir.

Etanol ile hazırlanan Aynı sefa ekstresi ile yapılan bir çalışmada total fenol içerik  $313.40 \pm 6.52$  mg fenol/g ekstre; total flavonoid içerik de  $76.66 \pm 23.24$  mg flavonoid/g ekstre olarak verilmiştir (Babae et al., 2013). Bu çalışmada elde edilen Aynı sefa metanolik ve etanolik ekstrelerinin total fenol ve total flavonoid içeriklerinin (Çizelge 3.4) daha düşük olduğu gözlemlendi. Farklı bitkilerin metanolik ekstrelerinde total antosiyanin içeriğinin incelendiği bir çalışmada ise Aynı sefa antosiyanin içerik  $0,47 \pm 0,1$  mg antosiyanin/100g olarak verilmiştir (Benvenuti et al., 2015). Bu değer gram ekstrede değerlendirildiğinde, Çizelge 3.4'te verilen Aynı sefa metanolik ve etanolik ekstrelerinin antosiyanin içerik değerlerinden daha düşük olduğu gözlemlendi.

Karayemiş ile yapılan çalışmalar sınırlı olup İstanbul'da bir bölgeden elde edilen Karayemiş ile yapılan bir çalışmada total fenol, total flavonoid ve antosiyanin içeriklerin hepsinin bir arada incelendiği bir çalışma bulunmaktadır (Celep et al., 2012). Bu çalışmada Karayemiş metanolik ekstresinde; total fenol içerik  $23,64 \pm 0,84$  mg fenol/g ekstre, total flavonoid içerik  $16,87 \pm 0,38$  mg flavonoid/g ekstre olarak bulunmuştur. Bu değerlerin, Çizelge 3.4'te verilen Karayemiş metanolik ve etanolik ekstrelerinin total fenol ve total flavonoid içerik değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi. Yukarıda verilen referans çalışmada, antosiyanin içerik  $342 \pm 16,3$  mg epigallokateşingallat eşdeğeri/ g ekstre olarak verildiğinden dolayı karşılaştırma yapılamadı. Trabzon yöresinden elde edilen Karayemiş ile yapılan başka bir çalışmada ise etanol, aseton ve su ile ekstreler hazırlanmış ve sadece su ile hazırlanan ekstrede total fenol içerik belirlenip  $10,4 \pm 2,3$  mg fenol/100 g ekstre olarak bulunmuştur (Kolaylı et al., 2003). Bu tez çalışmasında da Karayemiş meyvesi Trabzon yöresinden elde edildi ve metanol/etanol ekstreleri hazırlandı. Bu ekstrelerin total fenol içerikleri, gram ekstrede  $3 \pm 0,2$  mg fenol olarak bulundu. Verilen referans çalışma ile kıyaslandığında total fenolik içeriğinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.

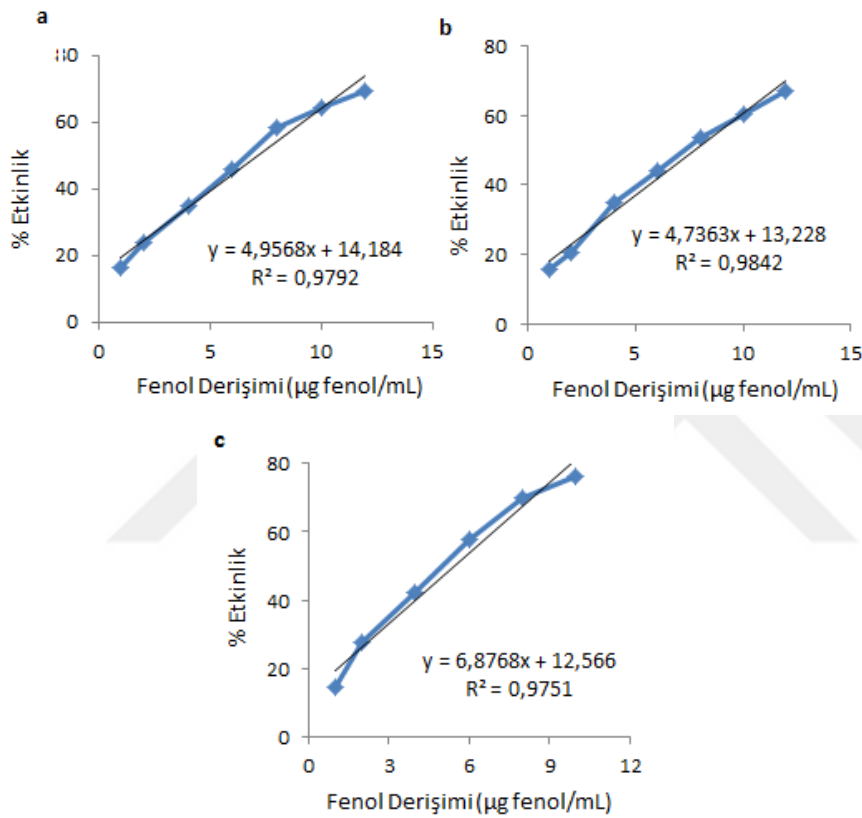
Farklı bitkilerin farklı çözen sistemleri ile elde edilen ekstralarında total fenol, total flavonoid ve antosiyanin içeriklerinin incelendiği bir çok çalışma bulunmaktadır (Chandel et al., 2012; Iqbal et al., 2015; Kaftanoğlu, 2013). Bitki kaynaklı fenolik bileşiklerin incelendiği literatür, genel olarak değerlendirildiğinde ise bu çalışmada elde edilen bitki ekstralarının total fenol ve total flavonoid içerik bakımından zengin olduğu söylenebilir.

Fenolik bileşikler ile birçok farklı kaynaktan çıkılan tüm çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde her bir bitkinin elde edildiği yöre, tür, bitkinin toplanma zamanı, depolama zamanı ve koşulları vb. parametrelerin bitki fenolik madde miktarı ve çeşitliliği açısından farklanma gösterdiğinin dikkate alınması gerektiği açıktır. Ayrıca bitkilerin ekstraksiyon koşulları (çözenler ve oranları, ekstraksiyon süresi, sıcaklığı, ışığa maruziyet vb.), elde edilen bitki ekstralarının ekstraksiyon verimlerinde ve fenolik içeriğinde farklanmalar oluşumuna sebep olmaktadır.

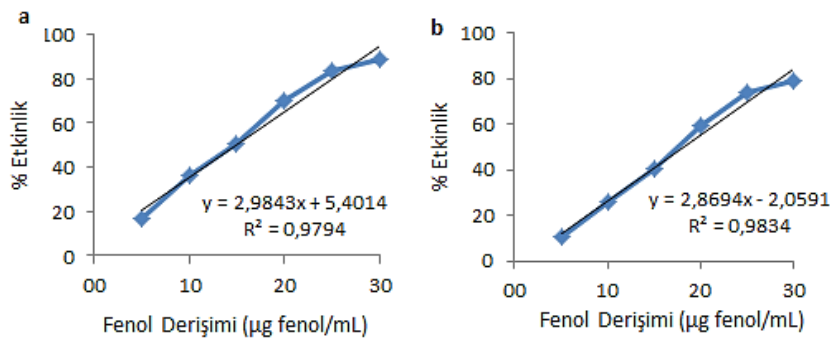
### 3.4 Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Etkinliği ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri yaşamsal faaliyetler sırasında endojen ve çeşitli çevresel faktörlerin etkisi ile meydana gelmektedir. Serbest radikaller nötralize edilmediklerinde vücutta çeşitli mekanizmalar üzerinden birçok ciddi patofizyolojik olaylara neden olabilirler. Oksidatif stres, oksidatif lezyonlara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açabilen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin (çoğunlukla serbest radikallerin) aşırı üretimiyle tetiklenir. İnsanlarda çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, nörodejeneratif süreçler (Alzheimer ve Parkinson vb.), hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları (kistik fibroz ve astım), Down sendromu ve kanser gibi birçok multifaktoriyel hastalıkların oluşumunda oksidatif stresin etkisinin olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese karşı, gerek korunma gerekse tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi bu nedenle gereklidir. Doğal antioksidanların çoğu bitkisel kaynaklı olup antioksidan aktivite gösteren özellikle polifenolik bileşikler üzerine yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Polifenolik bileşikler antioksidan etkinlikleri açısından çok değerli olmakla birlikte kullanım dozları ayarlanamadığında bazı yan sağlık problemlerine neden olmaları açısından tartışılmaktadır. Bu çalışmada; elde edilen bitki ekstraları ile *in vitro* antioksidan kapasite belirleme alışmaları DPPH radikal giderim yöntemi ile gerçekleştirildi.

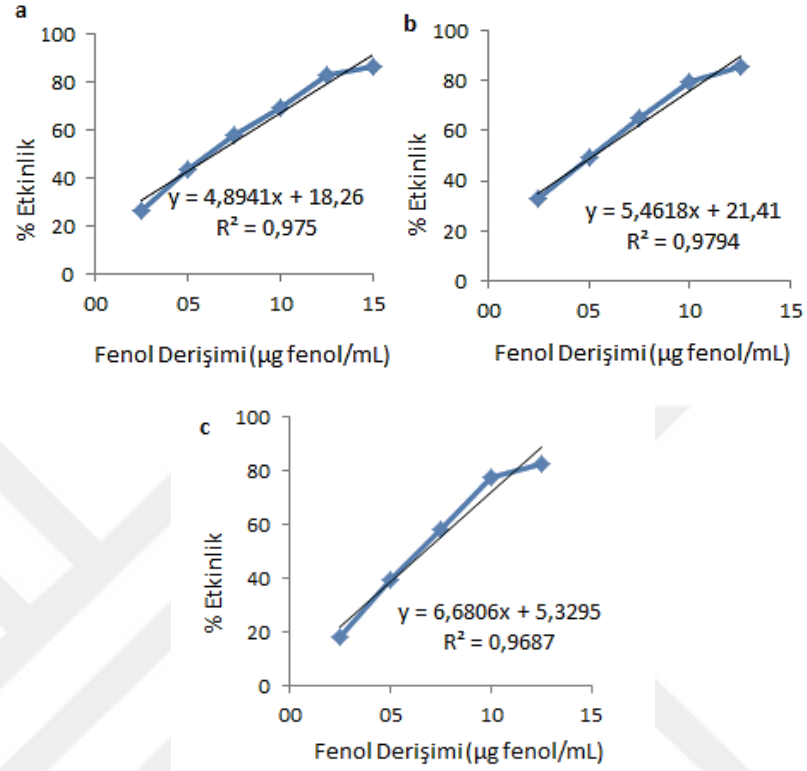
Tüm bitkilerin antioksidan etkinliği olduğu belirlendi ve öncelikle fenol konsantrasyonuna bağlı antioksidan kapasite değişimini incelemek amacı ile her bir bitki ekstresinin artan fenol konsantrasyonunda antioksidan etkinliği ölçüldü. Hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % kapasite hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan Askorbik asit için de benzer deneyler gerçekleştirildi (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve 3.7).



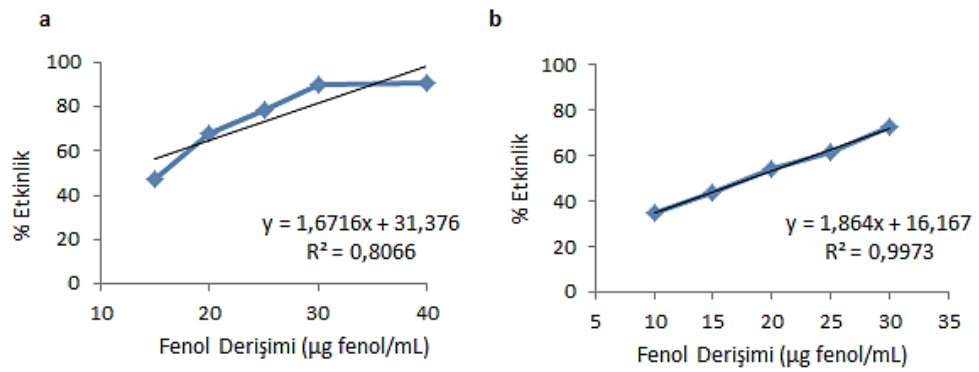
Şekil 3.3 Hibiskus ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları a) Hibiskus metanolik ekstresi, b) Hibiskus etanolik ekstresi, c) Hibiskus demleme ekstresi.



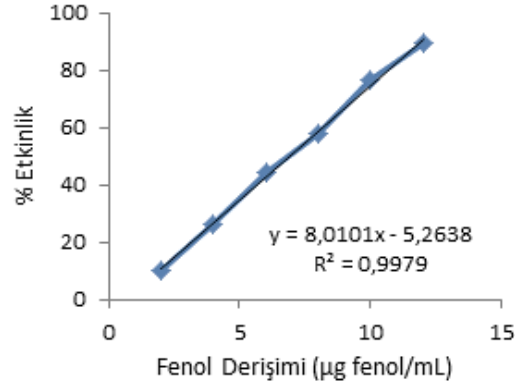
Şekil 3.4 Aynı sefa ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları a) Aynı sefa metanolik ekstresi, b) Aynı sefa etanolik ekstresi.



Şekil 3.5 Sarı kantaron ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları a) Sarı kantaron metanolik ekstresi, b) Sarı kantaron etanolik ekstresi, c) Sarı kantaron demleme ekstresi.



Şekil 3.6 Karayemiş ekstreleri antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonları a) Karayemiş metanolik ekstresi, b) Karayemiş etanolik ekstresi.



Şekil 3.7 Askorbik asit'in antioksidan % etkinlik eğrileri ve lineer regresyonu

EC<sub>50</sub> değerleri ise µg fenol / mL cinsinden etkinlik eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı EC<sub>50</sub> değerlerinin hesabında kullanılan lineer regresyon formülasyonunda, x; EC<sub>50</sub> değerini, y ise µg/mL fenol konsantrasyonu cinsinden % 50'yi ifade etmektedir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Bitki ekstrelerinin antioksidan etkinlikleri (EC<sub>50</sub> değerleri).

| Bitki                | Ekstre                            | EC <sub>50</sub><br>(µg fenol/mL) | Lineer Regresyon     | R <sup>2</sup> |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik                         | 7,1 ± 0,2                         | y = 4,9568x + 14,184 | 0,9792         |
|                      | Etanolik                          | 7,8 ± 0,6                         | y = 4,7363x + 13,228 | 0,9842         |
|                      | Demleme                           | 5,7 ± 0,1                         | y = 6,8768x + 12,566 | 0,9751         |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik                         | 6,3 ± 0,4                         | y = 4,8941x + 18,26  | 0,9750         |
|                      | Etanolik                          | 4,4 ± 0,4                         | y = 5,4618x + 21,41  | 0,9794         |
|                      | Demleme                           | 6,7 ± 0,4                         | y = 6,6806x + 5,3295 | 0,9687         |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik                         | 14,3 ± 0,5                        | y = 2,9843x + 5,4014 | 0,9794         |
|                      | Etanolik                          | 16,7 ± 1,0                        | y = 2,8694x - 2,0591 | 0,9834         |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik                         | 11,6 ± 1,6                        | y = 1,6716x + 31,376 | 0,8066         |
|                      | Etanolik                          | 18,1 ± 0,8                        | y = 1,864x + 16,167  | 0,9973         |
| <b>Kontrol</b>       | <b>Askorbik asit<br/>(µg /mL)</b> | 6,9 ± 0,0                         | y = 8,0101x - 5,2638 | 0,9979         |

Sonuçlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; Hibiskus demleme ekstresinin ( $5,7 \pm 0,1 \mu\text{g fenol / mL}$ ) ve Sarı kantaronun tüm ekstralarının (metanolik;  $6,3 \pm 0,4 \mu\text{g fenol / mL}$ , etanolik;  $4,4 \pm 0,4 \mu\text{g fenol / mL}$ , demleme;  $6,7 \pm 0,4 \mu\text{g fenol/mL}$ )  $\text{EC}_{50}$  değerleri pozitif kontrolden (askorbik asit;  $6,9 \mu\text{g/mL}$ ) daha düşük olduğu, yani iyi bir antioksidan olduğu bilinen askorbik asitten daha etkin antioksidan kapasite gösterdikleri gözlemlendi.

Daha önce yapılan çalışmalarda farklı bölgelerden elde edilen Hibiskus metanolik ekstralarının DPPH radikal giderim yöntemiyle antioksidan etkinlikleri belirlenmiş ve  $\text{EC}_{50}$  değerleri  $154,65 \mu\text{g fenol/mL}$  ile  $247,44 \mu\text{g fenol/mL}$  aralığında bulunmuştur (Wang et al., 2014). Bu bağlamda bu çalışma kapsamında hazırlanan Hibiskus ekstralarının antioksidan kapasitelerinin gerek pozitif kontrol gerekse rapor edilen çalışma sonuçlarına kıyasla daha iyi olduğu görülmektedir.

Sarı kantaron metanolik ekstresi ile antioksidan etkinlik belirlenen bir çalışmada, DPPH radikal giderim  $\text{EC}_{50}$  değeri  $14,43 \pm 0,01 \mu\text{g fenol/mL}$  olarak verilmiştir (Menichini et al., 2013) ve Çizelge 3.5'te verilen Sarı kantaron ekstralarının antioksidan etkinliklerinin ise Hibiskus bitkisi gibi daha etkin oldukları belirlendi.

Aynı sefa'nın çeşitli çözümlerle hazırlan ekstralarında antioksidan etkinliğin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmalarda DPPH radikal giderim için  $\text{EC}_{50}$  değerleri ekstre derişimi " $\mu\text{g/mL}$ " olarak verildiği için, elde edilen sonuçlarla kıyaslama yapılamadı (Butnariu and Coradini, 2012; Chakraborty, 2009; Preethi et al., 2008).

Karayemiş ile yapılan çalışmalar sınırlı olup, antioksidan etkinliğin belirlendiği tek bir çalışma bulunmaktadır (Kolaylı et al., 2003). Trabzon yöresinden elde edilen Karayemiş ile hazırlanan ekstrenin DPPH radikal giderim  $\text{EC}_{50}$  değeri  $28,6 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$  olarak verildiği için karşılaştırma yapılamadı.

Sonuçlar Çizelge 3.4 ile birlikte değerlendirildiğinde ise genel olarak fenolik içeriğin özellikle flavonoidlerin zengin olduğu bitki ekstralarının daha iyi radikal giderim etkisine sahip olduğu gözlemlendi. Ancak sonuçların teyit edilmesi için bitki ekstresinde var olan etkin maddelerin saflştırılması ve yapılarının belirlenmesi gerekliliği açıktır.

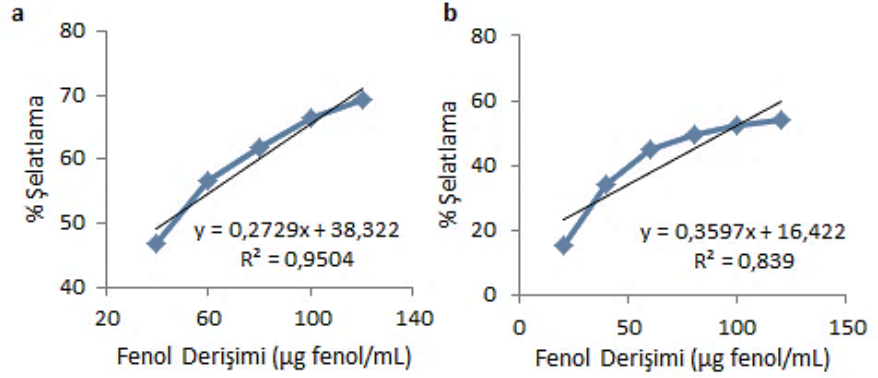
### 3.5 Metal Şelatlama Kapasitesi ve EC<sub>50</sub> Değerleri

Geçiş metalleri; oksidan hasarını dolaylı yoldan hızlandırmaktadırlar. Demir ve bakır iyonları *in vivo* koşullarda bazı az reaktif bileşiklerin çok kısa sürede daha reaktif şekillerine dönüşmelerini sağlayabilirler. Bu yüzden organizmada taşıyıcı protein ve depo proteinlerine bağlı halde tutulurlar (örn; Hemoglobin, transferrin). Metal şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler serbest metali bağlayarak etkisizleştirirler ve böylece serbest radikal oluşumunu inhibe ederler. Bu nedenle metal şelatlama özelliği antioksidan aktiviteyi belirlemede önemli rol oynamaktadır. Bir başka deyişle, şelatlama ajanları redoks potansiyelini indirgeyerek metal iyonlarının oksidasyonunu stabilize edebilirler. Bu nedenle şelatlama ajanları ikincil antioksidanlardır. Serbest demir (Fe) ve bakır (Cu) iyonları, memeli dokularında en fazla redoks-aktif metallerdir. Hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle doku hasarına neden olabilirler. Demir veya bakır katalize redoks reaksiyonları, diyabetik komplikasyonlarda rol oynayabilir. Bu nedenle bu metallerin şelatlanarak ortamdaki aktifliklerinin azaltılması hedeflenir. Bu çalışmada, doğal kaynak olarak eşit miktarda fenol içeren çeşitli bitki ekstralarının % metal şelatlama etkinlikleri incelendi (Çizelge 3.6) ve yüksek metal şelatlama etkinliği gösteren ekstraların EC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.

Çizelge 3.6 Bitki ekstralarının metal şelatlama (%) kapasiteleri(Radikal oluşumunun İnhibisyonu)

| Bitki                | Ekstre<br>( 10 µg fenol) | Metal Şelatlama<br>( % ) |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik                | 6,6                      |
|                      | Etanolik                 | -                        |
|                      | Demleme                  | -                        |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik                | 2,1                      |
|                      | Etanolik                 | 2,5                      |
|                      | Demleme                  | -                        |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik                | 10,1                     |
|                      | Etanolik                 | 25,7                     |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik                | 23,0                     |
|                      | Etanolik                 | 23,1                     |

Düşük fenol miktarlarında yüksek şelatlama kapasitesi gözlenen Aynı sefa ve Karayemiş ekstrelerinin  $EC_{50}$  değerlerinin belirlenmesi amacı ile herbir bitki ekstresinin artan fenol konsantrasyonunda metal şelatlama etkinliği ölçüldü. Hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % kapasite hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.8 a) Aynı sefa etanolik ekstresinin metal şelatlama % etkinlik eğrisi ve lineer regresyonu b) Karayemiş etanolik ekstresinin metal şelatlama % etkinlik eğrisi ve lineer regresyonu

$EC_{50}$  değerleri ise  $\mu\text{g fenol} / \text{mL}$  cinsinden etkinlik eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı  $EC_{50}$  değerlerinin hesabında kullanılan lineer regresyon formülasyonunda, x;  $EC_{50}$  değerini, y ise  $\mu\text{g/mL}$  fenol konsantrasyonu cinsinden % 50'yi ifade etmektedir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Aynı sefa ve Karayemiş etanolik ekstrelerinin metal şelatlama  $EC_{50}$  değerleri.

| Bitki     | Ekstre   | ( $EC_{50}$ )<br>( $\mu\text{g fenol/mL}$ ) | Lineer Regresyon       | $R^2$  |
|-----------|----------|---------------------------------------------|------------------------|--------|
| Aynı Sefa | Etanolik | $42,3 \pm 6,3$                              | $y = 0,2729x + 38,322$ | 0,9504 |
| Karayemiş | Etanolik | $93,3 \pm 0,9$                              | $y = 0,3597x + 16,422$ | 0,839  |

Aynı sefa etanolik ekstresinin  $EC_{50}$  değeri, Karayemiş etanolik ekstresine göre daha düşük olduğundan dolayı göreceli olarak daha yüksek metal şelatlama kapasitesine sahip olduğu düşünüldü. Literatürde Aynı sefa ile metal şelatlama etkinliğinin incelendiği sadece bir çalışma bulunmakta olup (Joshani and Rawal, 2012) Aynı sefa ekstresinin demir metal şelatlama etkinliği gözlenmiştir, bu

çalışmada ise bakır şelatlama etkisi bakıldı. Karayemiş için de; metanolik ekstresi ile yapılan bir metal şelatlama çalışması bulunmaktadır; fakat bu çalışmada da demir metal şelatlama etkinliği değerlendirilmiştir ve sonuç olarak demir metal şelatlama etkinliği gözlenmemiştir (Celep et al., 2012). Ancak; farklı bitkiler ile yapılan metal şelatlama etkinliği belirleme çalışmaları literatürde mevcuttur. Örneğin; *Mucuna pruriens* (Kadife fasülye)'nin çeşitli çözenlerle elde edilen ekstreleri ile yapılan bir çalışmada, demir şelatlama IC<sub>50</sub> değerleri 220-1030 µg/mL aralığında bulunmuştur (Kumar et al., 2010). Bu değerlerin, Aynı sefa ve Karayemiş için bulunan değerlere göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Metal şelatlama veya radikal oluşumunun inhibisyonu antioksidan etkiye yardımcı bir parametredir. Yaklaşım olarak antioksidan etkinin iyi olduğu bitkilerin benzer şekilde yüksek metal şelatlama etkinliği göstermesi beklenir. Ancak incelenen bitki ekstrelerinde fenolik içeriği en düşük konsantrasyondaki bitki ekstrelerinin daha etkin oldukları bu çalışma kapsamında gözlemlendi. Bu ise şelatlamada etkin olabilecek bileşik karakteristiğinin farklı olması olarak düşünüldü. Ancak sonuçların teyit edilmesi için bitki ekstresinde var olan etkin maddelerin saflştırılması ve yapılarının belirlenmesi gerekliliği açıktır.

### 3.6 α-Glukozidaz İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerleri

α-Glukozidaz enzimleri ince barsağın yüzeyinde bulunurlar ve kompleks karbohidratların parçalanmasından sorumludurlar. Bu enzimin inhibisyonu ile kan akışına glukozun katılımının yavaşlatılması hedeflenir. α-Glukozidaz enzim inhibitörleri, karbohidrat emilimini geciktirmeleri ile tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan önemli yaklaşımlardan biridir.

α-Glukozidaz inhibisyonun belirlenmesi amacıyla aktivite ölçümlerinde enzimin sentetik bir substratı olan p-nitrophenyl-α-D-glukozid kullanıldı. Yöntem enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan p-Nitrofenol'ün oluşturduğu rengin ölçümüne dayalı olup hazırlanan p-Nitrofenol ile kalibrasyon grafiği ( $y=0,0105x$ ,  $R^2=1$ ) yardımı ile enzim aktivitesi ve bitki ekstrelerinin inhibitör aktiviteleri hesaplandı.

Bu bağlamda öncelikle laboratuvarımızda hazırlanan α-Glukozidaz enziminin (*Saccharomyces cerevisiae*) spesifik aktivitesi  $40,3 \pm 1,8$  U/mg protein olarak bulundu.

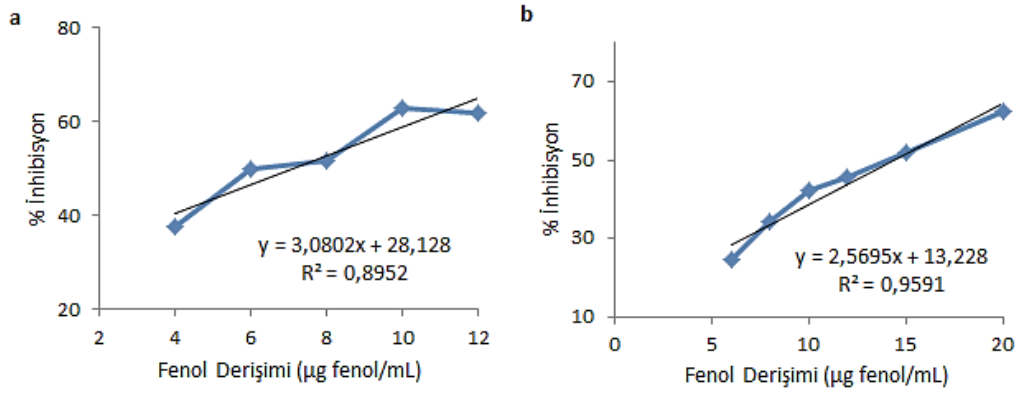
$\alpha$ -Glukozidaz inhibisyonunun incelenmesi amacıyla; bitki ekstralarının her birinin reaksiyon ortamındaki fenol konsantrasyonu sabit olacak şekilde deneysetleri hazırlanarak enzim inhibisyonu incelendi. (Çizelge 3.8) ve yüksek enzim inhibisyonu gösteren ekstraların  $IC_{50}$  değerlerini belirlendi.

Çizelge 3.8 Bitki ekstralarının  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon etkinlikleri

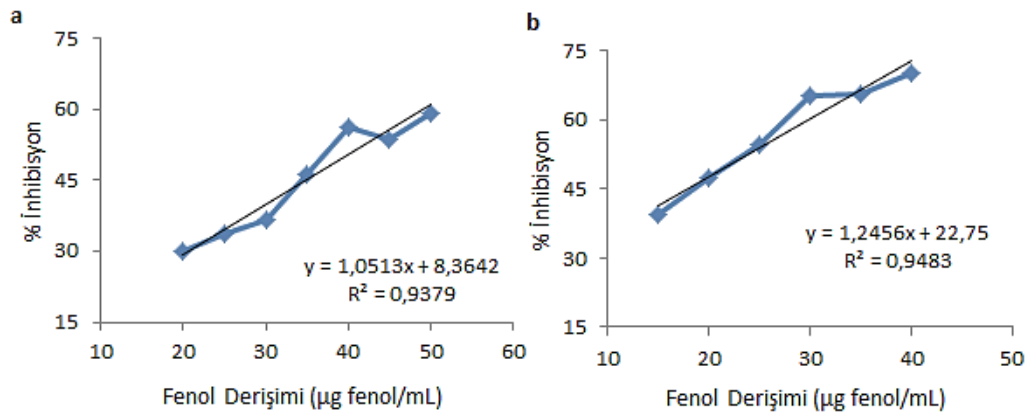
| Bitki                | Ekstre<br>( 8 $\mu$ g fenol) | $\alpha$ -glukozidaz<br>İnhibisyonu<br>( % ) |
|----------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik                    | 13,9                                         |
|                      | Etanolik                     | 20,2                                         |
|                      | Demleme                      | 17,5                                         |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik                    | 33,5                                         |
|                      | Etanolik                     | 50,0                                         |
|                      | Demleme                      | 44,1                                         |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik                    | 8,7                                          |
|                      | Etanolik                     | 11,2                                         |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik                    | 32,0                                         |
|                      | Etanolik                     | 53,0                                         |

Çizelge 3.8 den de açıkça görüldüğü gibi her bir ekstreten reaksiyon ortamının eşit miktarda fenol içerecek şekilde ilave edilmesine rağmen bitki ekstralarının enzim inhibisyon oranlarının farklı olması gerek tür gerekse değişik ekstraksiyon koşullarında fenolik bileşik çeşitliliği olarak açıklanabilir.

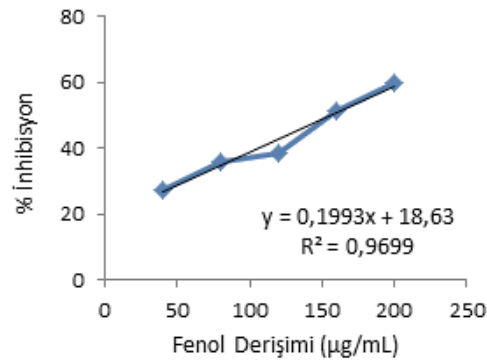
$\alpha$ -Glukozidaz enzim inhibisyonunda konsantrasyona bağlı inhibitör (bitki ekstresi;fenol) etkisini incelemek amacı ile en iyi  $\alpha$ -Glukozidaz inhibitor aktivitesi gösteren Sarı Kantaron (etanolik, demleme) ve Karayemiş (metanolik,etanolik) ekstralarını artan fenol konsantrasyonunda içeren ortamda  $\alpha$ -Glukozidaz aktivitesi ölçüldü. Hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % İnhibisyon değerleri hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.9 ve 3.10). Pozitif kontrol olarak kullanılan Akorboz için de benzer deneyler gerçekleştirildi (Şekil 3.11).  $IC_{50}$  değerleri ise % İnhibisyon eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı (Çizelge 3.9).



Şekil 3.9 Sarı kantaron ekstrelerinin % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları; a) Sarı kantaron etanolik ekstresi, b) Sarı kantaron demleme ekstresi.



Şekil 3.10 Karayemiş ekstrelerinin % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları, a) Karayemiş metanolik ekstresi, b) Karayemiş etanolik ekstresi.



Şekil 3.11 Akarbozun % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu

Çizelge 3.9 Sarı kantaron ve Karayemiş ekstrelerinin,  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu;IC<sub>50</sub> değerleri.

| Bitki         | Ekstre                    | (IC <sub>50</sub> )*<br>( $\mu$ g fenol/mL) | Lineer Regresyon     | R <sup>2</sup> |
|---------------|---------------------------|---------------------------------------------|----------------------|----------------|
| Sarı Kantaron | Etanolik                  | 7,1 $\pm$ 0,3                               | y = 3,0802x + 28,128 | 0,8952         |
|               | Demleme                   | 14,3 $\pm$ 0,8                              | y = 2,5695x + 13,228 | 0,9591         |
| Karayemiş     | Metanolik                 | 39,5 $\pm$ 1,8                              | y = 1,0513x + 8,3642 | 0,9379         |
|               | Etanolik                  | 21,9 $\pm$ 0,6                              | y = 1,2456x + 22,75  | 0,9483         |
| Kontrol       | Akarboz<br>( $\mu$ g /mL) | 157,4 $\pm$ 2,0                             | y = 0,1993x + 18,63  | 0,9699         |

\*  $\alpha$ -glukozidaz aktivitesinin % 50'sini inhibe eden fenol konsantrasyonu

Sonuçlar irdelendiğinde tüm bitki ekstrelerinin kıyaslama amacı ile kullanılan ve glikozid yapıda, ilaç olarak kullanılan iyi bir  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörü olduğu bilinen akarbozdan daha iyi bir IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu gözlenmektedir. Ancak burada kullanılan akarboz tablet olarak alınıp çözülerek hazırlandığı için etken madde gerikazanımının düşük olabileceği ve bundan dolayı yüksek bir IC<sub>50</sub> değeri bulunmuş olabileceği düşünüldü. Saf etken madde kullanılmadığından dolayı ekstre IC<sub>50</sub> değerleri ile karşılaştırma yapılamadı.

Günümüze değin yapılan birçok çalışmada bitki ekstrelerinde  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonuna yönelik çalışmalar mevcuttur ancak bunlarda bizim çalışma kapsamımızda tutulan bitkiler için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmamıştır. Diğer yandan Yaban mersini yapraklarının ekstreleri ile yapılan bir çalışmadaki (Bljajic et al., 2017) IC<sub>50</sub> değerleri 2,53  $\pm$  0,21 mg/mL, 0,29  $\pm$  0,02 mg/mL ekstre konsantrasyonu cinsinden verilmiştir. Bu çalışma ekstre konsantrasyonu cinsinden verildiğinden çalışılan bitki ekstreleri ile kıyaslanamadı. Ancak bitki ekstreleri IC<sub>50</sub> değerlerinin Akarboz için belirlenen IC<sub>50</sub> değerinden kayda değer ölçüde düşük olması çalışma kapsamında elde edilen bu ekstrelerin potansiyel  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörü içermesi açısından önemlidir.

### 3.7 DPP-4 İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

İnkretin hormonlar, pankreas beta hücrelerinden glukoz ile uyarılan insulin salgılanmasını artırır. Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insulinotropik polipeptid (GIP) en önemli iki inkretin hormonlardır. İnkretinler hızlı bir şekilde dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) enzimi tarafından yıkılırlar. Tip 2

diyabet açısından bakıldığında DPP 4; glukagon benzeri peptid (GLP-1 ve 2) ve glukoz bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP) gibi inkretin hormonların inaktivasyonundan sorumludur. İnkretinler insülin salımını stimüle edici ve kan glukoz kontrolünü düzenleyici etkilere sahiptirler. Bu nedenle Dipeptidil peptidaz 4 inhibisyonu ile inkretinlerin degradasyonunun engellenmesi ile glisemik kontrolün sağlanması mümkün olabilecektir. Bu yaklaşımla son yıllarda araştırmacılar DPP-4 inhibitörü olabilecek bileşenler ve bunların antidiyabetik olarak kullanımına yoğunlaşmışlardır.

DPP-4 inhibisyonun belirlenmesi amacıyla aktivite ölçümlerinde enzimin sentetik bir substratı olan Gly-Pro-p-nitroanilid kullanıldı. Yöntem enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan p-Nitrofenol'ün oluşturduğu rengin ölçümüne dayalı olup hazırlanan p-Nitrofenol ile kalibrasyon grafiği ( $y=0,0278x + 0,0058$ ,  $R^2=0,9998$ ) yardımı ile enzim aktivitesi ve bitki ekstratlarının inhibitör aktiviteleri hesaplandı. Bu bağlamda öncelikle laboratuvarımızda hazırlanan DPP-4 enzim preparatının (*Böbrek*) spesifik aktivitesi  $15,5 \pm 0,4$  U/mg protein olarak bulundu.

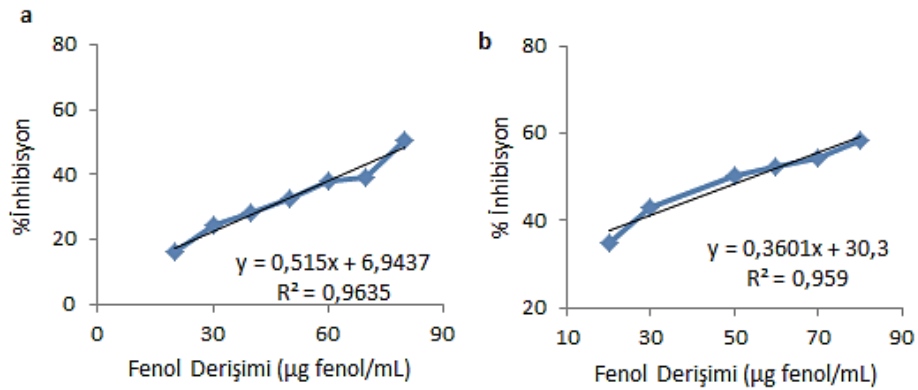
Tüm ekstratlerde DPP-4 inhibisyonunun incelenmesi amacıyla; bitki ekstratlarının her birinin reaksiyon ortamındaki fenol konsantrasyonu sabit olacak şekilde deney setleri hazırlanarak enzim inhibisyonu incelendi. (Çizelge 3.10) ve yüksek enzim inhibisyonu gösteren ekstratların  $IC_{50}$  değerleri belirlendi.

Çizelge 3.10 Bitki ekstratlarının DPP-4 enzim inhibisyonu

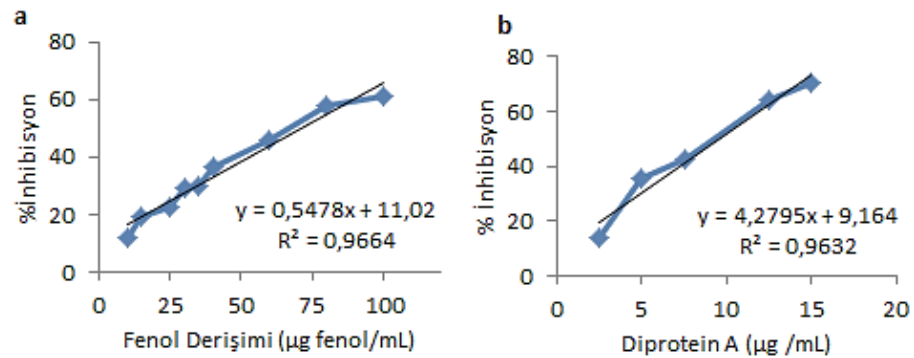
| Bitki                | Ekstre<br>(10 µg fenol) | DPP-4 İnhibisyonu<br>(%) |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik               | -                        |
|                      | Etanolik                | -                        |
|                      | Demleme                 | -                        |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik               | -                        |
|                      | Etanolik                | 27                       |
|                      | Demleme                 | -                        |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik               | -                        |
|                      | Etanolik                | -                        |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik               | 9                        |
|                      | Etanolik                | 25                       |

Çizelge 3.9 dan görüldüğü gibi her bir ekstreden reaksiyon ortamının eşit miktarda fenol içerecek şekilde ilave edilmesine rağmen bitki ekstraktlarının sadece üçünde enzim inhibisyonu saptandı. Burada özellikle Sarı kantaron ve Karayemiş'in etanolik ekstraktlarında kayda değer bir inhibisyon olduğu gözlemlendi.

DPP-4 enzim inhibisyonunda konsantrasyona bağlı inhibitör (bitki ekstresi;fenol) etkisini incelemek amacı ile DPP-4 inhibitor aktivitesi gösteren Sarı Kantaron (etanolik) ve Karayemiş (metanolik,etanolik) ekstraktlarını artan fenol konsantrasyonunda içeren ortamda DPP-4 aktivitesi ölçüldü. Hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % İnhibisyon değerleri hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.12 ve 3.13). Pozitif kontrol olarak kullanılan Diprotein A için de benzer deneyler gerçekleştirildi (Şekil 3.13). IC<sub>50</sub> değerleri ise % İnhibisyon eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı (Çizelge 3.11).



Şekil 3.12 Karayemiş ekstraktlarının % inhibisyon eğrileri ve lineer regresyonları, a) Karayemiş metanolik ekstresi, b) Karayemiş etanolik ekstresi.



Şekil 3.13 a) Sarı kantaron etanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu, b) Diprotein A'nın % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu.

Çizelge 3.11 Sarı kantaron ve Karayemiş ekstrelerinin, DPP-4 inhibisyonu;IC<sub>50</sub> değerleri.

| Bitki                | Ekstre                         | (IC <sub>50</sub> )*<br>(µg fenol/mL) | Lineer Regresyon    | R <sup>2</sup> |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|----------------|
| <b>Sarı Kantaron</b> | Etanolik                       | 69,0 ± 2,2                            | y = 0,5478x + 11,02 | 0,9664         |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik                      | 83,7 ± 1,3                            | y = 0,515x + 6,9437 | 0,9635         |
|                      | Etanolik                       | 54,1 ± 2,0                            | y = 0,3601x + 30,3  | 0,959          |
| <b>Kontrol</b>       | <b>Diprotein A</b><br>(µg /mL) | 9,5 ± 0,1                             | y = 4,2795x + 9,164 | 0,9632         |

\*DPP-4 aktivitesinin % 50'sini inhibe eden fenol konsantrasyonu

Literatürde Sarı kantaron ve Karayemiş ekstrelerinin DPP-4 inhibisyonuna yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, farklı bitki ekstreleri ile gerçekleştirilen DPP-4 inhibisyonuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda IC<sub>50</sub> değerleri “µg/mL” olarak verildiğinden karşılaştırma yapılamadı (Oliveira et al. 2017; Saleem et al., 2014). Sarı kantaron ve Karayemiş ekstrelerinin, kıyaslama amacı ile kullanılan ve peptid yapıda spesifik bir DPP-4 inhibitörü olduğu bilinen Diprotein A'dan daha yüksek IC<sub>50</sub> değerlerine sahip oldukları gözlenmektedir. Hazırlanan bitki ekstreleri kompleks bir karışım olduğundan gerçek bir değerlendirme yapabilmek için ekstrelerden etken maddelerin saflaştırılıp yapısının analizlenmesi ve saf bileşen ile deneylerin tekrarlanması ile daha doğru sonuçlara ulaşılabileceği açıktır.

### 3.8 α-Amilaz İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

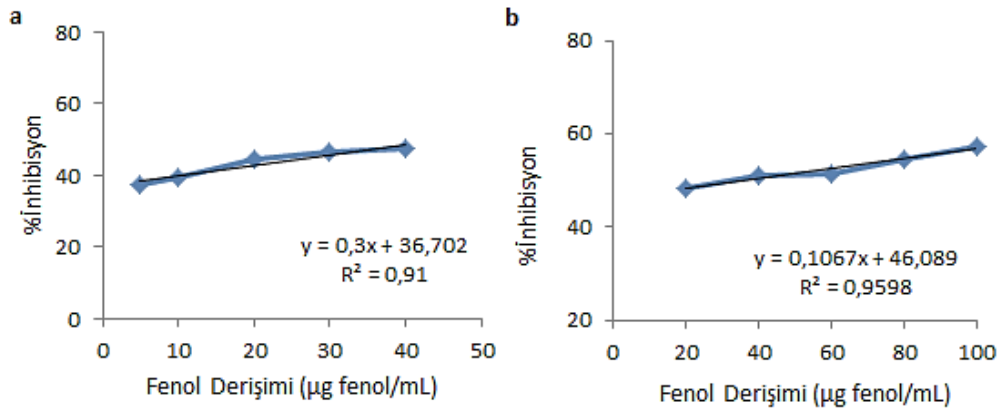
α-Amilaz, pankreas ve tükürük bezinin belirgin bir salgı ürünüdür. Kompleks karbohidratların, oligosakkaritlere ve disakkaritlere hidrolizindeki ilk aşamadan sorumludur. Mevcut α-amilaz inhibitörleri, birçok yan etkilere sahiptir. Bu nedenle, α-amilaz inhibisyonu için daha az yan etkiye sahip alternatif tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Tip 2 diyabet tedavisindeki yaklaşımlardan bir diğeri olan α-Amilaz inhibisyonunun incelenmesi amacıyla; bitki ekstrelerinin her birinin reaksiyon ortamındaki fenol konsantrasyonu sabit olacak şekilde deney setleri hazırlanarak enzim inhibisyonu incelendi. (Çizelge 3.12) ve yüksek enzim inhibisyonu gösteren ekstrelerin IC<sub>50</sub> değerlerini belirlendi.

Çizelge 3.12 Bitki ekstralarının  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyonu

| Bitki                | Ekstre<br>(10 $\mu$ g fenol) | $\alpha$ -Amilaz<br>İnhibisyonu (%) |
|----------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik                    | 40                                  |
|                      | Etanolik                     | 29                                  |
|                      | Demleme                      | -                                   |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik                    | 32                                  |
|                      | Etanolik                     | 21                                  |
|                      | Demleme                      | 3                                   |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik                    | 37                                  |
|                      | Etanolik                     | 34                                  |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik                    | 35                                  |
|                      | Etanolik                     | 32                                  |

Çizelge 3.12 den de görüldüğü gibi Hibiskus ve Sarı kantaron demleme ekstraları dışındaki ekstralarının tümünde benzer oranlarda inhibisyon gözlemlendi.  $\alpha$ -Amilaz enzim inhibisyonunda konsantrasyona bağlı inhibitör (bitki ekstresi;fenol) etkisini incelemek amacı ile tüm bitkilerin metanolik ekstraları seçildi ve artan fenol konsantrasyonunda içeren ortamda  $\alpha$ -Amilaz aktivitesi ölçüldü. Hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % İnhibisyon değerleri hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. IC<sub>50</sub> değerleri ise % İnhibisyon eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı (Şekil 3.14 ve Çizelge 3.13). Hibiskus ve karayemiş ekstraları dışında diğer bitki ekstralarında, lineer inhibisyon gözlenmediği için IC<sub>50</sub> değeri hesaplanamadı.



Şekil 3.14 a) Hibiskus metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu  
b) Karayemiş metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu

Çizelge 3.13 Hibiskus ve Karayemiş ekstrelerinin,  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyonu;  $IC_{50}$  değerleri.

| Bitki     | Ekstre    | ( $IC_{50}$ )*<br>( $\mu\text{g fenol/mL}$ ) | Lineer Regresyon       | $R^2$  |
|-----------|-----------|----------------------------------------------|------------------------|--------|
| Hibiskus  | Metanolik | $48,3 \pm 5,3$                               | $y = 0,3x + 36,702$    | 0,9100 |
| Karayemiş | Metanolik | $37,9 \pm 1,6$                               | $y = 0,1067x + 46,089$ | 0,9598 |

\*  $\alpha$ -Amilaz aktivitesinin % 50'sini inhibe eden fenol konsantrasyonu

Demeleme yöntemiyle hazırlanan Hibiskus ekstresi ile  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunun incelendiği bir çalışmada, Hibiskus ekstresinin inhibisyon göstermediği rapor edilmiştir (Ifie et al., 2016). Benzer şekilde hazırlanan iki farklı Hibiskus türünün ekstreleri ile  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunun incelendiği başka bir çalışmada ise  $IC_{50}$  değerleri ekstre miktarı üzerinden belirlenmiş olup  $187,9 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$  ve  $90,5 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$  olarak rapor edilmiştir (Ademiluyi and Oboh, 2013). Bu çalışma kapsamında ise fenolik içerğe göre hesaplamalar yapıldığından kıyaslama yapılamadı. Karayemiş ile günümüze değin yapılan bir çalışma olmadığı gözlemlendi. Ancak, farklı bitkilerle yapılan birçok  $\alpha$ -amilaz inhibisyon çalışması bulunmaktadır. Örneğin; Sinameki ile yapılan bir çalışmada  $IC_{50}$  değeri  $123,95 \mu\text{g fenol/mL}$  bulunmuştur (Thilagam et al., 2013).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu ekstrelerin ileri düzeyde yapılacak çalışmalar ile değerlendirilmesi gerektiği düşünüldü.

### 3.9 Lipoksigenaz Enzim İnhibisyonunun ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

İnflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser, astım, alerji, eklem hastalıkları, deri hastalıkları, sindirim bozuklukları, demans ve Alzheimer gibi kronik hastalıkların oluşmasında rol oynadığı ve bu hastalıklara eşlik ettikleri bilinmektedir. Bu nedenle aşırı inflamasyonun önlenmesinde tedavide önemli yeri olan yan etkileri minimuma indirilmiş antiinflamatuvar etkili yeni bileşiklerin tasarlanıp geliştirilmesi birçok araştırmanın konusudur. Bu bağlamda ilaç hedefi olarak inflamasyon mekanizmasında etkin olan birçok mekanizma üzerinden çalışabilecek ilaç hedefleri üzerine çalışılmaktadır. Ancak bunlardan özellikle siklooksigenazlar ve lipoksigenazların spesifik inhibitörlerinin veya bunların dual inhibitörlerinin bulunması üzerine bir çok çalışma mevcuttur. Bitkisel kaynaklı etkin inhibitörlerinin çalışılması bilimsel yönden araştırılarak negatif ya da pozitif yönlerinin tespiti, kimyasal ilaçlarla farklılıklarının belirlenmesinde bir ışık tutacaktır.

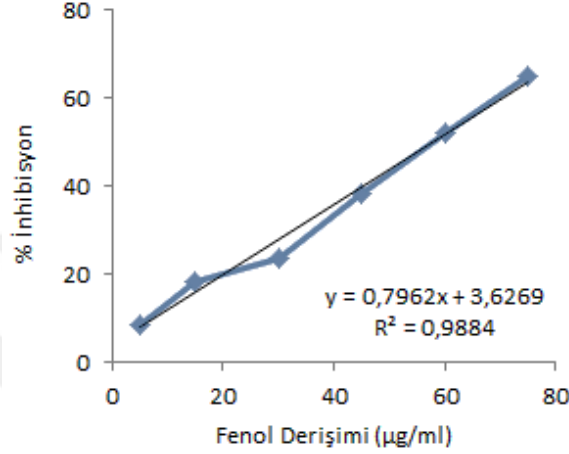
Lipoksigenaz inhibisyonunun incelenmesinde literatür bilgileri de göz önüne alınarak bitkilerin sadece metanolik ekstreleri değerlendirmeye tabi tutuldu. Bu amaçla metanolik ekstrelerin reaksiyon ortamındaki fenol konsantrasyonu sabit olacak şekilde deney setleri hazırlanarak enzim inhibisyonu incelendi. (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 Tüm bitkilerin metanolik ekstrelerinin belirli fenol derişimlerinde gösterdiği lipoksigenaz enzim inhibisyonu yüzdeleri.

| Bitki         | Ekstre<br>(20 µg fenol) | Lipoksigenaz<br>İnhibisyonu<br>(%) |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|
| Hibiskus      | Metanolik               | 21                                 |
| Sarı Kantaron | Metanolik               | 47                                 |
| Aynı Sefa     | Metanolik               | 23                                 |
| Karayemiş     | Metanolik               | 28                                 |

Lipoksigenaz enzim inhibisyonunda konsantrasyona bağlı inhibitör (bitki ekstresi;fenol) etkisini incelemek amacı ile artan fenol derişimlerinde metanolik ekstreleri içeren ortamda lipoksigenaz aktivitesi ölçüldü. Ancak; Hibiskus

metanolik ekstresinin dışında diğer ekstrelerde fenol derişimlerinin artması ile lipoksigenaz inhibisyonunda herhangi bir değişim gözlenmedi. Bu nedenle sadece Hibiskus metanolik ekstresi ile hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % İnhibisyon değerleri hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.15). IC<sub>50</sub> değerleri ise % İnhibisyon eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı (Çizelge 3.15).



Şekil 3.15 Hibiskus metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu

Çizelge 3.15 Hibiskus metanolik ekstresinin lipoksigenaz inhibisyonu; IC<sub>50</sub> değeri.

| Bitki    | Ekstre    | (IC <sub>50</sub> )*<br>(µg fenol/mL) | Lineer Regresyon     | R <sup>2</sup> |
|----------|-----------|---------------------------------------|----------------------|----------------|
| Hibiskus | Metanolik | 58,3 ± 2,2                            | y = 0,7962x + 3,6269 | 0,9884         |

\* Lipoksigenaz aktivitesinin % 50'sini inhibe eden fenol konsantrasyonu

Günümüze değin Lipoksigenaz inhibisyonu için bitki ekstreleri ile yapılan çalışmalarda Hibiskus ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak; antosiyanin içeriği yüksek bulunan *Rubus jamaicensis*, *Rubus rosifolius*, *Rubus racemosus*, *Rubus idaeus* ve *Rubus acuminatus* (böğürtlen ve ahududu türleri) hekzan, etil asetat ve metanol ile hazırlanmış ekstreleri ile yapılan bir çalışmada, bu ekstrelerin anti-inflamatuar etkinliği olduğu rapor edilmiştir (Bowen-Forbes et al., 2010). Bu bağlamda bu çalışma kapsamında tutulan diğer bitkilerin ekstrelerine kıyasla, antosiyanin içeriği (Çizelge 3.4) yüksek bulunan Hibiskus metanolik ekstresinin lipoksigenaz inhibisyonu üzerine olan etkisinin, antosiyanin içeriğinden kaynaklanmış olabileceği düşünöldü.

### 3.10 Glikasyon İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

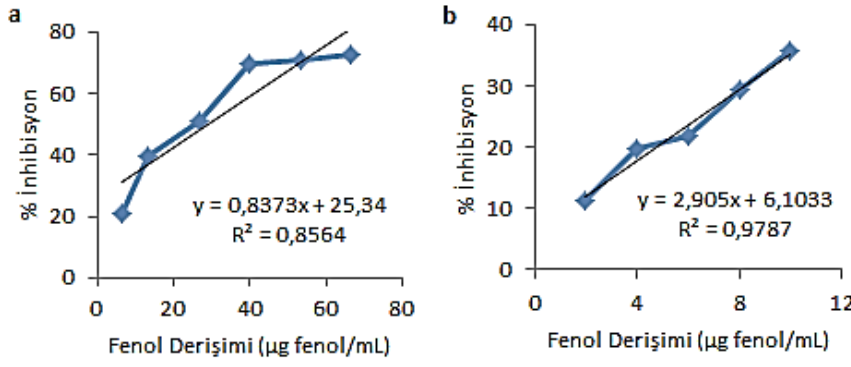
Protein glikasyonu, proteinlerin serbest amino gruplarının, şekerlerin karbonil grupları ile enzimatik olmayan ve kendiliğinden oluşan reaksiyonları ile gerçekleşir. Protein glikasyonu sonucunda oluşan ürünlerin birikmesi ile proteinlerin yapısında değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin; yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar, nöropati, nefropati, retinopati, Alzheimer hastalığı gibi birçok önemli hastalık ile ilişkisi bulunur ve bu nedenle glikasyon inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Protein glikasyonu Schiff bazı oluşumuyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) dönüşmektedir. Glikasyonun inhibisyonu, AGE oluşumunun ve AGE aracılı hasarın farklı adımlarına müdahalede bulunarak gerçekleştirilir.

Diyabetin en yaygın komplikasyonlarından birisi olan protein glikasyonunun inhibisyonunun incelenmesi amacı ile glukoz ve BSA (sığır serum albümin) ile *in vitro* glikasyon ortamı oluşturuldu. Bu ortama bitki ekstraktlarının her birinin reaksiyon ortamındaki fenol konsantrasyonu sabit olacak şekilde deney setleri hazırlanarak AGE oluşumunun inhibisyonu incelendi. (Çizelge 3.16).

Çizelge 3.16 Bitki ekstraktlarının glikasyon inhibisyonu (AGE oluşumu)

| Bitki                | Ekstre<br>(10 µg fenol) | Glikasyon İnhibisyonu<br>(%) |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| <b>Hibiskus</b>      | Metanolik               | 26                           |
|                      | Etanolik                | 22                           |
|                      | Demleme                 | 25                           |
| <b>Sarı Kantaron</b> | Metanolik               | 49                           |
|                      | Etanolik                | 47                           |
|                      | Demleme                 | 45                           |
| <b>Aynı Sefa</b>     | Metanolik               | 19                           |
|                      | Etanolik                | 10                           |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik               | 5                            |
|                      | Etanolik                | 4                            |

AGE oluşumunun inhibisyonunda (deglikasyon) konsantrasyona bağlı inhibitör (bitki ekstresi;fenol) etkisini incelemek amacı ile artan fenol derişimlerinde metanolik ekstreleri içeren ortamda deglikasyon etkinliği ölçüldü. Ancak; Sarı kantaron ve Karayemiş metanolik ekstreleri dışında diğer bitki ekstrelerinde fenol derişimlerinin artması ile glikasyon inhibisyonunda herhangi bir değişim gözlenmedi. Bu nedenle sadece Sarı kantaron ve Karayemiş metanolik ekstreleri ile hazırlanan deney serilerinde kontrole kıyasla % İnhibisyon değerleri hesaplanarak fenol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3.16). IC<sub>50</sub> değerleri ise % İnhibisyon eğrilerinden elde edilen lineer regresyon formülasyonları ile hesaplandı (Çizelge 3.17).



Şekil 3.16 a) Sarı kantaron metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu, b) Karayemiş metanolik ekstresinin % inhibisyon eğrisi ve lineer regresyonu

Çizelge 3.17 Sarı kantaron ve Karayemiş metanolik ekstrelerinin, glikasyon inhibisyonu;IC<sub>50</sub> değerleri.

| Bitki                | Ekstre    | (IC <sub>50</sub> )*<br>(µg fenol/mL) | Lineer Regresyon    | R <sup>2</sup> |
|----------------------|-----------|---------------------------------------|---------------------|----------------|
| <b>Sarı kantaron</b> | Metanolik | 29,4 ± 1,3                            | y = 0,8373x + 25,34 | 0,8564         |
| <b>Karayemiş</b>     | Metanolik | 15,4 ± 2,4                            | y = 2,905x + 6,1033 | 0,9787         |

\* Glikasyonun % 50'sini inhibe eden fenol konsantrasyonu

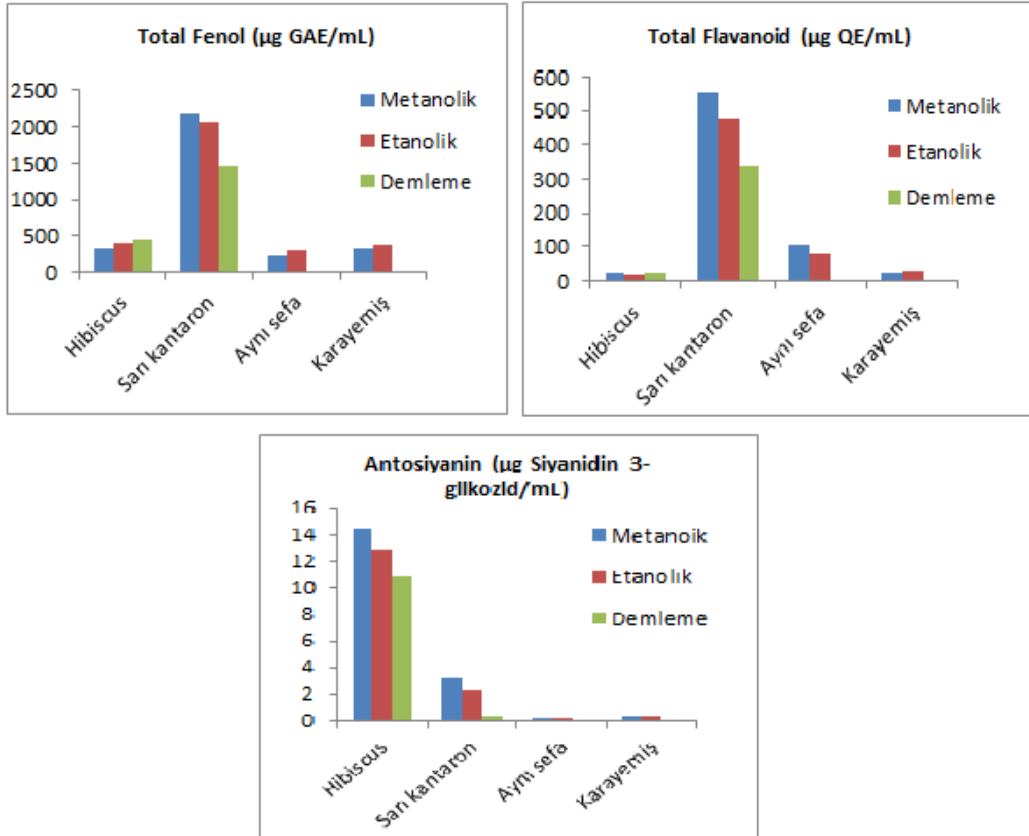
Sarı kantaron'un birden çok çözgen (etil asetat, metanol, bütanol, hekzan, diklorometan, su) ile hazırlanan ekstreleriyle yapılan bir çalışmada deglikasyon etkinlikleri incelenmiş ve ekstrelerin belirli derişimlerinde çeşitli %'lerde inhibisyon gözlenmiştir. Ancak, IC<sub>50</sub> belirleme çalışması yapılmamıştır (Abbas et al., 2013). Konuya ilişkin Karayemiş ile yapılan bir çalışmaya rastlanmadı. Bazı tropikal bitki ekstreleri ile yapılan bir çalışmada ise (Ramkissoo et al., 2013)

etanolik ekstrelerin glikasyon inhibisyonu için ekstre miktarları baz olarak alınan  $IC_{50}$  değerleri 7,7 -24,1 mg/mL olarak verilmiştir. Ancak bunların fenol miktarları ile değerlendirmesi yapılmadığından bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçların değerlendirilmesi yapılamadı.

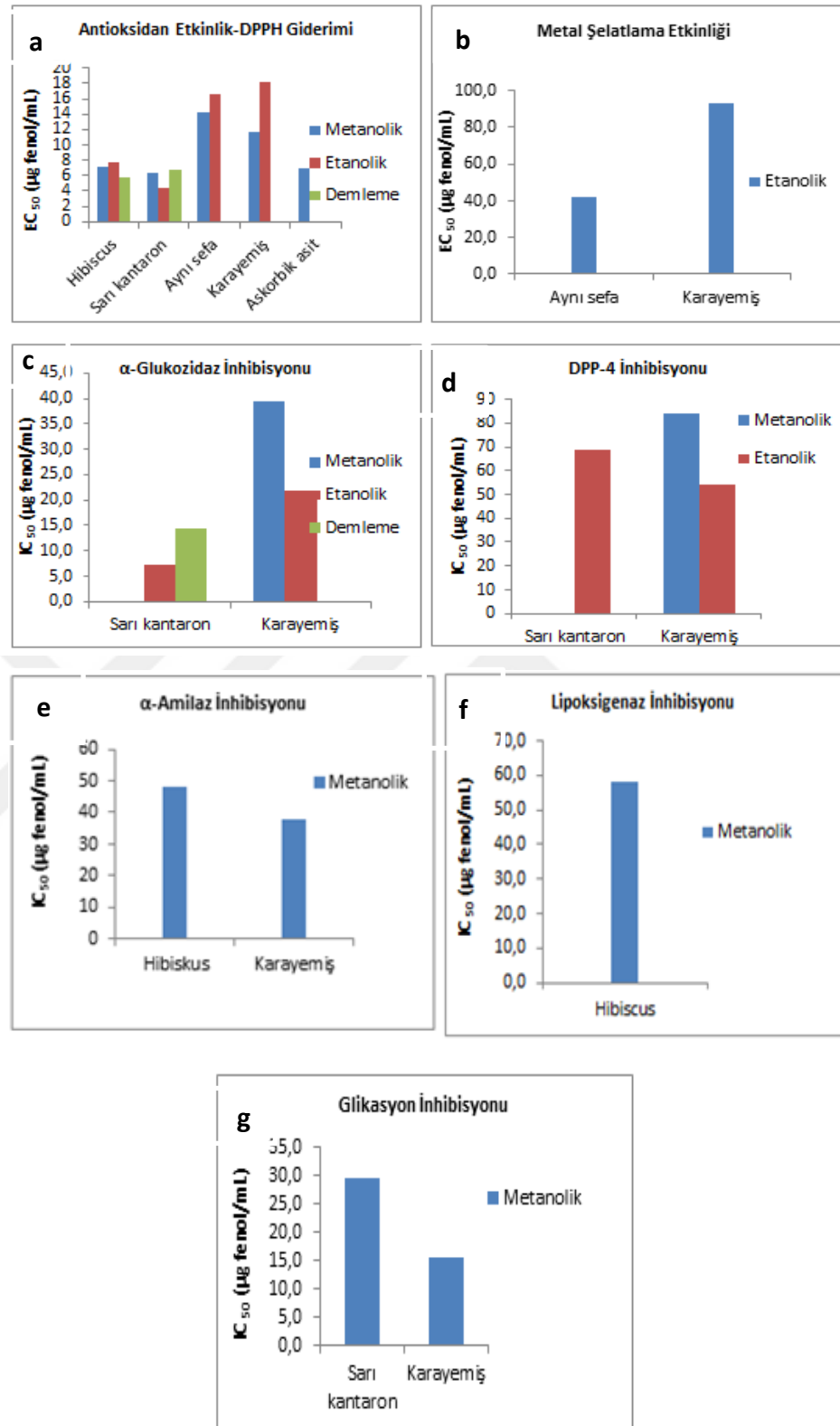


#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME

Günümüzde kullanılan ilaçların çoğunda etken maddeler bitki kaynaklıdır. Doğal kaynakların tercih edilmesindeki en önemli etmen, sentetik maddelerin yan etki içermeleridir. Tip 2 diyabet tedavisinde de bitkisel tedaviler, bitkilerin sentetiklere göre düşük toksisiteye sahip olmaları ve yüksek biyouyumluluk göstermelerinden dolayı yaygındır (Kooti et al., 2016). Bu çalışmada; çeşitli bitkilerin diyabet ve komplikasyonlarının engellenmesinde kullanılabilme kapasitelerinin belirlenmesi hedeflendi. Biyoaktif bileşiklerce zengin olduğu öngörülen *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), *Hypericum* sp. (Sarı kantaron), *Calendula* sp. (Aynı sefa) ve *Prunus laurocerasus* L. (Karayemiş) bitkilerinin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile hazırlanmış ekstrelerinin kalitatif fitokimyasal testleri, kantitatif fenolik bileşik içerikleri ve çeşitli biyolojik etkinlikleri ilgili sonuçlar Şekil 4.1 ve 4.2 de verildi.



Şekil 4.1 Bitki ekstrelerinin kantitatif total fenol, total flavonoid ve antosiyanin içeriklerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.2 Bitki ekstralarının gösterdiği biyolojik etkinliklerin değerlendirilmesi a)Antioksidan etkinlik, b)Metal şelatlama etkinliği, c)α-Glukozidaz inhibisyonu, d)DPP-4 inhibisyonu, e) α-Amilaz inhibisyonu, f) Lipoksigenaz inhibisyonu, g)Glikasyon inhibisyonu.

Ülkemizin Karadeniz Bölgesi'ne karakteristik olarak bol yetişen ve bölge halkı tarafından meyvesi sık tüketilen Karayemiş ile yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sadece total fenolik içerik belirlenmiş ve antioksidan etkinlik incelenmiştir (Celep et al., 2012; Kolaylı et al., 2003). Karayemiş ile yapılan başka bir çalışmada, Karayemiş ekstresi diyabetik sıçanlara verilmiş ve yüksek kan glukoz seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir (Turan et al., 2013).

Sonuç olarak her bitki ekstresinde, diyabet ve komplikasyonları ile ilişkili birden fazla biyolojik etkinlik gözlenmesi nedeni ile diyabet ve komplikasyonlarının önlenmesinde potansiyel ilaç etken maddeleri için kaynak olabilecekleri ancak bu amaca yönelik olarak etken madde saflaştırılması ve yapı tayini, *in vitro* ve *in vivo* kinetik çalışmalar vb. ileri düzeyde çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğu açıktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adegbola, P., Aderibigbe, I., Hamed, W. and Omotayo, T.,** 2017, Antioxidant and anti-inflammatory medicinal plants have potential role in the treatment of cardiovascular disease: a review, *American Journal of Cardiovascular Disease*, 7(2): 19-32.
- Ademiluyi, A.O. and Oboh, G.,** 2013, Aqueous extracts of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities in vitro, *Journal of Medicinal Food*, 16 (1), 88–93.
- Alarcón-Alonso, J., Zamilpa, A., Aguilar, F.A., Herrera-Ruiz, M., Tortoriello, J. and Jimenez-Ferrer, E.,** 2012, Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 139(3):751-6.
- Al-masri, I.M., Mohammad, M.K. and Tahaa, M.O.,** 2009, Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) is one of the mechanisms explaining the hypoglycemic effect of berberine, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24:5, 1061-1066.
- Altan, N., Sepici Dinçel, A ve Koca, C.,** 2006, Diabetes mellitus ve oksidatif stres, *Turkish Journal of Biochemistry*, 31(2); 51–56.
- Awasthi, S. and Saraswathi, N.T.,** 2016, Non-enzymatic glycation mediated structure–function changes in proteins: case of serum albumin, *The Royal Society of Chemistry Advances*, 6, 90739–90753.
- Benvenuti, S., Bortolotti, E. and Maggini, R.,** Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers, 2016, *Scientia Horticulturae*, 199, 170–177.
- Braakhuis, A.J., Campion, P. and Bishop, K.S.,** 2016, Reducing breast cancer recurrence: the role of dietary polyphenolics, *Nutrients*, 8, 547.
- Babae, N., Moslemi, D., Khalilpour, M., Vejdani, F., Moghadamnia, Y., Bijani, A., Baradaran, M., Kazemi, M.T., Khalilpour, A., Pouramir, M. and Moghadamnia, A.A.,** 2013, Antioxidant capacity of calendula officinalis flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21:18.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhaskar, A., Nithya, V. and Vidhya, V.G.**, 2011, Phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the ethanolic extract of *Hibiscus rosa sinensis* L, *Annals of Biological Research*, 2 (5) :653-661.
- Barnes, J., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D.**, 2001, St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) : a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 583-600.
- Basch, E., Bent, S., Foppa, I., Haskmi, S., Kroll, D., Mele, M., Szapary, P., Ulbricht, C., Vora, M. and Yong, S.**, 2009, Marigold (*Calendula officinalis* L.), *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 6:3-4, 135-159.
- Bljajić, K., Petlevski, R., Vujić, L., Čačić, A., Šoštarić, N., Jablan, J., Saraiva de Carvalho, I. and Zovko Končić, M.**, 2017, Chemical composition, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activities of the aqueous and hydroethanolic extracts of *Vaccinium myrtillus* leaves, *Molecules*, 22,703.
- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y. and Nair, M.G.**, 2010, Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 554–560.
- Butnariu, M. and Coradini, C.Z.**, 2012, Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrometry, *Chemistry Central Journal*, 6,35.
- Celep, E., Aydın, A. ve Yesilada, E.**, 2012, A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3329–3335.
- Chandel, M., Sharma, U., Kumar, N., Singh, B. and Kaur, S.**, 2012, Antioxidant activity and identification of bioactive compounds from leaves of *Anthocephalus cadamba* by ultraperformance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(12):977-85.
- Chung, L.Y., Soo, W.K., Chan, K.Y., Mustafa, M.R., Goh, S.H. and Imiyabir, Z.**, 2009, Lipxygenase inhibiting activity of some Malaysian plants, *Pharmaceutical Biology*, 47(12): 1142–1148.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cooper, G.J., Phillips, A.R., Choong, S.Y., Leonard, B.L., Crossman, D.J., Brunton, D.H., Saafi 'L, Dissanayake, A.M., Cowan, B.R., Young, A.A., Occleshaw, C.J., Chan, Y.K., Leahy, F.E., Keogh, G.F., Gamble, G.D., Allen, G.R., Pope, A.J., Boyd, P.D., Poppitt, S.D., Borg, T.K., Doughty, R.N. and Baker, J.R., 2004,** Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation, *Diabetes*, 53(9): 2501-8.
- Dastagir, G., Ahmed, R. and Shereen, S., 2016,** Elemental, nutritional, phytochemical and biological evaluation of *Hypericum perforatum* Linn., *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(2):547-55.
- Deppe, V.M., Bongaerts, J., O'Connell, T., Maurer, K.H. and Meinhardt, F., 2011,** Enzymatic deglycation of Amadori products in bacteria: mechanisms, occurrence and physiological functions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:399–406.
- DeGeeter, M. and Williamson, B., 2014,** Alternative agents in type 1 diabetes in addition to insulin therapy: metformin, alpha-glucosidase inhibitors, pioglitazone, GLP-1 agonists, DPP-IV inhibitors, and SGLT-2 inhibitors, *Journal of Pharmacy Practice*, 29(2): 144-59.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A. and Kumar, S., 2013,** Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*, *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 1193–1199.
- Dündar, Y., 2001,** Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam, *The Medical Journal of Kocatepe*, 2,131-138.
- Ekayanti, M., Sauriasari, R. and Elya, B., 2018,** Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of fraction from white tea ethanolic extract (*Camellia sinensis* (L.) kuntze) ex viv, *Pharmacognosy Journal*, 10(1):190-193.
- Fiume, M.Z., 2001,** Final report on the safety assessment of *Calendula officinalis* extract and *Calendula officinalis*, *International Journal of Toxicology*, 20(Suppl. 2):13–20.
- Greene, D.A., 1986,** Acute and chronic complications of diabetes mellitus in older patients, *The American Journal of Medicine*, 80(5A): 39-53.
- Göksu, U.A. ve Ünal, A., 2017,** Diabetes mellitus tip 2’de inkretin temelli tedaviler, *Kafkas Journal of Medical Sciences*, 7(2): 174–180.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hamamcioğlu, A.C.**, 2017, Diyabette oksidatif stres ve antioksidanların rolü, Turkish Journal of Diabetes and Obesity, 1: 7-13.
- Hammer, K.D.P. and Birt, D.F.**, 2013, Evidence for contributions of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of hypericum perforatum, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54:6, 781-789.
- Ifie, I., Marshall, L.J., Ho, P. and Williamson, G.**, 2016, Hibiscus sabdariffa (Roselle) extracts and wine: Phytochemical profile, phytochemical properties, and carbohydrase inhibition, 2016, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64(24):4921-3.
- Iqbal, E., Salim, K.A. and Lim, L.B.L.**, 2015, Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of Goniolobum velutinum (Airy Shaw) from Brunei Darussalam, Journal of King Saud University –Science, 27, 224–232.
- Joshan, S. and Rawal, S.**, 2013, Comparative evaluation of antioxidant and antihemolytic capacities of plants of Indian origin using multiple antioxidant assays, International Journal of Phytopharmacy, 2 (4),107-115.
- Kerru, N., Singh-Pillay, A., Awolade, P., and Singh, P.**, 2018, Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review, European Journal of Medicinal Chemistry, 152; 436-488.
- Khangholi, S., Majid, F.A., Berwary, N.J., Ahmad, F. and Aziz, R.B.**, 2015, The mechanisms of inhibition of advanced glycation end products formation through polyphenols in hyperglycemic condition, Planta Medica, 82(1-2):32-45.
- Khorasani Esmaili, A, Mat Taha, R., Mohajer, S. and Banisalam, B.**, 2015, Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown Trifolium pratense L. (Red Clover), BioMed Research International, 2015:643285.
- Kolaç,T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G.**, 2017, Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri, İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 5, 1.
- Kolaylı, S., Küçük, M., Duran, C., Candan, F. and Dinçer, B.**, 2003, Chemical and antioxidant properties of Laurocerasus officinalis Roem. (Cherry Laurel) fruit grown in the Black Sea region, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7489-7494.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D. and Asadi-Samani, M.,** 2016, The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review, *Electronic Physician*, 8(1), 1832-42.
- Kumar, D.S., Muthu, A.K., Smith, A.A. and Manavalan, R.,** 2010, In vitro antioxidant activity of various extracts of whole plant of *Mucuna pruriens* (Linn), *International Journal of PharmTech Research*, 2(3), 2063-2070.
- Li, N., Wang, L.J., Jiang, B., Li X.Q., Guo, C.L., Guo. S.J. and Shi, D.Y.,** 2018, Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151:145-157.
- Li, H.A., Jiang, Y., Wong, C.C., Cheng, K.W. and Chen F.,** 2007, Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388:483–488.
- Liu, Z. and Ma, S.,** 2017, Recent advances in synthetic  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, *ChemMedChem*, 12, 819 – 829.
- Oyedemi, S.O., Oyedemi, B.O., Ijeh, I.I., Ohanyerem, P.E., Coopposamy, R.M. and Aiyegoro, O.A.,** 2017, Alpha-amylase inhibition and antioxidative capacity of some antidiabetic plants used by the traditional healers in southeastern Nigeria, *The Scientific World Journal*, 2017: 3592491.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z.,** 2015, Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3): 331-336.
- Pavithra, K. and Vadivukkarasi, S.,** 2015, Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn., *Food Science and Human Wellness*, 4, 42–46.
- P'erez, M.J., Cuello, A.S., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Quispe, C., Schmeda-Hirschmann, G. and Isla, M.I.,** 2014, Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacity, *Food Research International*, 64, 762-771.
- Prachayasittikul, V., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S. and Prachayasittikul, V.,** 2013, 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications, *Drug Design, Development and Therapy*, 7:1157-78.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prodham, F. and Filigheddu, N.**, 2014, Ghrelin gene products in acute and chronic inflammation, *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62: 369–384.
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F. and Trotin, F.**, 2000, Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour, *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2): 35-42.
- Ramamurthy, V. and Sathiyadevi, M.**, 2017, Preliminary phytochemical screening of methanol extract of *Indigofera trita* Linn., *Journal of Molecular Histology & Medical Physiology*, ( 2):1,1000112.
- Ramkissoon, J.S., Mahomoodally, M.F., Ahmed, N. and Subratty, A.H.**, 2013, Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(7), 561-9.
- Rescigno, T., Tecce, M.F. and Capasso, A.**, 2018, Protective and restorative effects of nutrients and phytochemicals, *The Open Biochemistry Journal*, 12, 46-64.
- Ruiz-Roca, B., Navarro, M.P., Seiquer, I.**, 2008, Antioxidant properties and metal chelating activity of glucose-lysine heated mixtures: relationships with mineral absorption across Caco-2 cell monolayers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9056-63.
- Saleem, S., Jafri, L., Haq, I.U., Chang, L.C., Calderwood, D., Green, B., D. and Mirza, B.**, 2014, *Journal of Ethnopharmacology*, 156; 26-32.
- Sanches-Silva, A., Albuquerque, T.G., Finglas, P., Ribeiro, T., Valente, A., Vasilopoulou, E., Trichopoulou, A., Alexieva, I., Boyko, N., Costea, C.E., Hayran, O., Jorjadze, M., Kaprelyants, L., Karpenko, D., D'Antuono, L.F. and Costa, H.S.**, 2013, Carotenoids, vitamins (A, B2, C and E) and total folate of traditional foods from Black Sea Area countries, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(14):3545-57.
- Senguttuvan, J., Paulsamy, S. and Karthika, K.**, 2014, Phytochemical analysis and evaluation of leaf and root parts of the medicinal herb, *Hypochoeris radicata* L. for in vitro antioxidant activities, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 1):S359-67.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seri, A., Khorsand, M., Rezaei, Z., Hamed, A. and Takhshid, M.A.,** 2017, Inhibitory effect of *Bunium persicum* hydroalcoholic extract on glucose-induced albumin glycation, oxidation, and aggregation in vitro, *Iran Journal of Medical Sciences*, 42(4):369-376.
- Thilagam, E., Parimaladevi, B., Kumarappan, C. and Mandal, S.C.,** 2013,  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*, *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 6(1), 24-30.
- Turan, M.I., Turkoglu, M., Dundar, C., Celik, N. and Suleyman, H.,** 2013, Investigating the effect of *Prunus laurocerasus* fruit extract in type II diabetes induced rats, *International Journal of Pharmacology*, 9(6), 373-378.
- Wang, J., Cao, X., Jiang, H., Qi, Y., Chin, K.L. and Yue, Y.,** 2014, Antioxidant activity of leaf extracts from different *Hibiscus sabdariffa* accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS, *Molecules*, 19(12):21226-38.
- Yasir, W., Sultana, B., Nigam, P.S. and Owusu-Apenten,** 2016, Antioxidant and genoprotective activity of selected cucurbitaceae seed extracts and LC-ESIMS/MS identification of phenolic components, *Food Chemistry*, 199;307-313.
- Zhang, J., Zhao, S., Yin, P., Yan, L., Han, J., Shi, L., Zhou, X., Liu, Y. and Ma, C.,** 2014,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of polyphenols from the burs of *Castanea mollissima* Blume, *Molecules*, 19, 8373-8386.
- Zhen, J., Villani, T.S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M.H., Ho, C.T., Simon, J.E. and Wu, Q.,** 2016, Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolics content and anti-inflammatory of *Hibiscus sabdariffa* leaves, *Food Chemistry*, 190:673-680.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gonca ÇETİN  
Adres : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü,  
Biyokimya Anabilim Dalı, 35040 Bornova-İZMİR  
Telefon : +90 545 305 09 74  
e-Posta : goncacetin.ege@gmail.com  
Doğum Tarihi ve Yeri : 08/01/1992, Samsun  
Yabancı Dil : İngilizce

### **Eğitim**

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı (**Yüksek Lisans**)  
Eylül 2015-Ağustos 2018

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye  
Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı (**Lisans**)  
Eylül 2010-Haziran 2015

### **Katıldığı Kurslar, Seminerler ve Eğitimler**

Erzurum Atatürk Üniversitesi, 28.Ulusal Biyokimya Kongresi/Uluslararası Biyokimya Kongresi, 2017

Türk Biyokimya Derneği, II. Türkiye *in vitro* Diyagnostik (IVD) Sempozyumu “BİYOBELİRTEÇLER” (Hastalıkta ve Sağlıkta), 2017

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Gen ve Genom Bilimleri Kursu, 2016

İBG-İzmir, Uluslararası Genomik ve Biyoinformatik Konferansı, 2016

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi SPSS Kursu, 2016

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Bilgi Kaynaklarına Ulaşım Kursu, 2016

HPLC Cihazı Teorik ve Uygulama Eğitimi, 2015

Gaz Kromatografi Cihazı Teorik ve Uygulama Eğitimi, 2015

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü III. Biyogüvenlik Eğitimi, 2014

Ege Üniversitesi, 6. Geleneksel Bilim ve Teknoloji Sempozyumu; Nörodejeneratif Hastalıklar ve Moleküler Mekanizması, 2014

İstanbul Üniversitesi, Uluslararası Katılımlı X. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kış Okulu, 2013

**Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Yayımlanmış Bildiriler**

Çetin, G. and Zihnioğlu, F., Anti-inflammatory effect of *Hibiscus sabdariffa* L. by lipoxygenase inhibition, 28. National Biochemistry Congress/International Biochemistry Congress, 19-23 Eylül 2017, Erzurum/Türkiye (Poster)