



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***DIANTHUS CALOCEPHALUS*'UN ENZİM
İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE
ÇALIŞMA**

Hamiyet ÜNÜVAR

YÜKSEK LİSANS

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ÖNAYI

Hamiyet ÜNÜVAR tarafından hazırlanan “*DIANTHUS CALOCEPHALUS*’UN ENZİM İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA” adlı tez çalışması 22/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Danışman

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

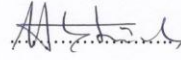
Üye

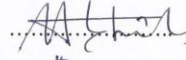
Doç. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Üye

Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

İmza



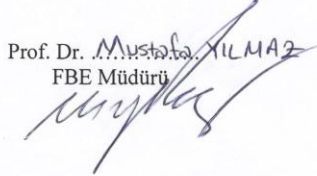






Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü



Bu tez çalışması BAP tarafından 17201025 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Hamiyet ÜNÖVAR

22/06/2017



ÖZET

YÜKSEK LİSANS

***DIANTHUS CALOCEPHALUS*'UN ENZİM İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Hamiyet ÜNÜVAR

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2017, 48 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Doç. Dr. Gökalg Özmen GÜLER

Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

Dianthus cinsi Türkiye’de 67 tür tarafından temsil edilmektedir. *Dianthus* türleri gastrointestinal bozukluk, yara ve öksürük tedavisinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *D. calocephalus*’un ekstraksiyon verimi, fitokimyasal profili ve enzim inhibitör aktivitesi üzerine üç farklı çözücü (etil asetat, metanol ve su) ve metodun (maserasyon, sokslet ve ultrasonikasyon) etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Özütlere inhibitör aktiviteleri kolinesteraz (AChE ve BChE), α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaza karşı test edildi. En yüksek özüt verimi sokslet ekstraksiyon metodundan elde edildi. Bütün ekstraksiyon metodlarında, metanol özütü en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğe sahiptir. Su özütü en düşük AChE inhibitör aktivitesi gösterdi. Sonuçlar etil asetat özütünün yüksek tirozinaz ve α -amilaz aktivite sergilediğini göstermiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, *D. calocephalus* kozmetik ve farmasötik endüstrilerde doğal kaynak olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Dianthus*, ekstraksiyon metodları, enzim inhibitör aktivitesi, doğal ürünler.

ABSTRACT

MS THESIS

A STUDY ON ENZYME INHIBITION PROPERTIES of *DIANTHUS CALOCEPHALUS*

Hamiyet UNUVAR

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

Advisor: Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

2017, 48 Pages

Jury

**Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
Assoc. Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER
Assoc. Prof. Dr. Gökhan ZENGİN**

Dianthus genus is represented by 67 species in Turkey. *Dianthus* species are widely used for treating gastro-intestinal disorder, wound, and cough. This work aimed to evaluate the effects of three various solvents (ethyl acetate, methanol, and water) and three different extraction methods (maceration, soxhlet, and ultrasonication-assisted) on extraction yield, phytochemical profile and enzyme inhibitory activity of *Dianthus calocephalus*. The inhibitory activities of extracts were tested against cholinesterase's (AChE and BChE), α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase. The highest extract yields were obtained from soxhlet extraction method. In all extraction methods, methanol extract had the highest total phenolic and flavonoid content. The water extract demonstrated the lowest AChE inhibitory activity. The results showed that ethyl acetate extract exhibited the higher tyrosinase and α -amylase inhibitory activity. According to our results, *D. calocephalus* can be used as natural source in cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: *Dianthus*, extraction methods, enzyme inhibitory activity, natural products.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarına başladığım andan itibaren yardım ve desteklerini esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK' e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım yoğun çalışmalar yaptığı halde benden desteğini esirgemeyen tez çalışmamı bitirebilmemde büyük emeği olan ve hakkını ödeyemeyeceğim değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gökhan ZENGİN' e en içten dileklerle teşekkür ederim. Tez konumda çalıştığım bitkinin teşhisinde yardımlarını esirgemeyen Iğdır Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat Aydın ŞANDA' ya teşekkür ederim. Çalışmalarımın tüm aşamalarında ilgi ve desteklerini gördüğüm her sorunumda yanımda ve yardımcı olan laboratuvarımızın olmazsa olmaz kıymetli doktora öğrencileri Şengül UYSAL ve Ramazan CEYLAN' a teşekkürü borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarını birlikte yürüttüğüm lisans aynı zamanda yüksek lisans arkadaşım Alime ÇİFTÇİ' ye teşekkür ederim. Ayrıca bugünlere gelmemde emeği olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Hamiyet ÜNÜVAR
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Enzimler.....	4
2.1.1. Enzimlerin yapısı	4
2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması	5
2.1.3. Enzimlerin aktivitesi	5
2.1.4. Enzimlerin inhibisyonu	7
2.2. Kolinesteraz İnhibitörleri	9
2.3. Diabet ve ilişkili enzimler	11
2.4. Tirozinaz enzimi	13
2.5. Caryophyllaceae Familyası ve <i>Dianthus</i> Cinsi	15
2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Bitki Materyali ve Bitkisel Özütlelerin Hazırlanması	20
3.1.1. Sokslet.....	20
3.1.2. Maserasyon	22
3.1.3. Ultrasonikasyon	22
3.2. Fenolik içeriğin belirlenmesi	23
3.2.1. Toplam fenolik madde tayini	23
3.2.2. Toplam flavonoid madde tayini	23
3.3. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler	24
3.3.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitesi (AChE ve BChE)	24
3.3.2. Amilaz inhibisyon aktivitesi	24
3.3.3. Glukozidaz inhibisyon aktivitesi	24
3.3.4. Tirozinaz inhibisyon aktivitesi.....	25
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. <i>Dianthus calocephalus</i> özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri	26
4.2. Kolinesteraz (AChE ve BChE) inhibitör aktivite	30
4.3. Antidiabetik aktivite (α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibitör aktivite)	34
4.4. Tirozinaz inhibitör aktivite	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40

5.1. Sonuçlar	40
5.2. neriler	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	48



1. GİRİŞ

İnsanlığın var oluşundan günümüze kadar geçen sürede bitkiler hayatın devamı için vazgeçilmez unsurlardan birini oluşturmuştur. Yüzyıllardır süren insan ve bitki ilişkisi günümüzde de tüm dünyanın kabul ettiği önemli bir araştırma konusudur. Eski uygarlıkların tıbbi bitkiler hakkındaki bilgileri; yaşadıkları devirlerden kalma kitabeler ve arkeolojik kazılardan anlaşılmaktadır. Tıbbi bitkilerin kullanımını hakkındaki ilk yazılı kaynaklar Sümerlerden kalan ve yaklaşık MÖ 3000 yıllarına dayanan çivi yazısı tabletlerinde görülmektedir. Bu tabletlerde sözü edilen yaklaşık 250 bitkiden bir kısmının isimlerinin karşılığı arkeolojik, linguistik, botanik ve bitki coğrafyası araştırmalarına dayanılarak yapılsa da önemli bir kısmı hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Günümüzdeki modern tıbbın temeli eski uygarlıkların deneyimlerinden köken almıştır ve geçen çağlar boyunca teknolojinin gelişmesiyle birlikte günümüzdeki şeklini almıştır. Özellikle 20. Yüzyılın sonlarından itibaren hastalıkların tedavisinde bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması ve doğal ürünlere olan talebin artması bitkilerin kullanım oranlarını her geçen gün daha da arttırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada yaklaşık 4 milyar insanın (dünya nüfusunun %80'i) sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel tedavi yöntemleriyle gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir. Ayrıca gelişmiş ülkelerdeki reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır (Farnsworth ve ark., 1985).

Enzimlerin insanlar tarafından endüstriyel alanlardaki kullanımı çok eski zamanlara kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, yoğurt, şarap, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde kullanılmıştır. Örneğin incir bitkisinden elde edilen sıvı ile süttten peynir yapıldığı bildirilmiştir. Günümüzde de tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok alanda enzimler kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu yerlerden birisi de ilaç endüstrisi olmuştur. Yaşamsal fonksiyonların gerçekleşmesini sağlayan enzimlerin eksikliği veya herhangi bir mutasyona uğraması, canlılığı olumsuz yönde etkilemektedir.

Enzim inhibitörleri, enzimlere bağlanan ve onların aktivitelerini düşüren moleküllerdir. Pek çok ilaç, enzim aktivitesinin bloke edilmesini sağlayan enzim inhibitörlerinden oluşmaktadır. Bu nedenle enzim inhibitörlerinin keşfi biyokimya ve farmakoloji alanında aktif bir araştırma konusu olmuştur (Segel ve Segel, 1976).

Alzheimer hastalığı; serebral korteks ve hippokampusta yaygın olarak nöron ve sinaps kaybı ve ilerleyici bilişsel gerileme ile karakterize edilen en yaygın görülen nörodejenaratif hastalıklardan biridir (Katzman, 1986). Günümüzde 65 yaş üstü her 8 kişiden birinin Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir (Association, 2011; Hebert ve ark., 2013). Alzheimer hastalığının patolojisi oldukça karmaşıktır ve bu nedenle de pek çok hipotez öne sürülmüştür. Bu hipotezlerden en yaygın olanları; kolinerjik nöron sistemlerinde işlev bozukluğu, β -amiloid ($A\beta$) protein tabakaları, oksidatif stres, tau protein hiperfosforilasyonu, ve metal dyshomeostasis dir (Wang ve ark., 2016). Kolinerjik hipoteze göre; Alzheimer hastalığı ile ilişkili bilişsel ve bellek bozukluklarına merkezi sinir sistemindeki asetilkolin düzeyinin azalması neden olmaktadır (Holzgrabe ve ark., 2007). Bu nedenle Alzheimer hastalığının tedavisindeki temel yaklaşım, asetilkolinesteraz inhibitörleri ile tedavi ederek beyin asetilkolin düzeylerini arttırmaya odaklanmıştır. Günümüzde, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan sadece beş ilaç vardır ve bu ilaçlardan üçünü ise AChE inhibitörleri oluşturmaktadır (donapezil, galatamin ve rivastigmin) (Zemek ve ark., 2014). Bu ilaçların; hafif, orta veya şiddetli Alzheimer hastalarında bilişsel ve bellek fonksiyonları iyileştirmesi gösterilmiş olsa da etkinlikleri sınırlıdır ve pek çok yan etkiye sahiptir (Martins ve Ferreira, 2017).

Diabetes mellitus, artan mortalite ve karmaşık komplikasyonları nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Uluslararası Diabet Federasyonuna göre; Diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserden sonra en ölümcül üçüncü hastalıktır ve tüm Dünya'da insan sağlığını tehdit etmektedir (Atlas, 2015). Dünya Sağlık örgütünün son istatistiki verilerine göre; Diabetes mellitus, 2012'de doğrudan 1,5 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur. 2014 yılında Dünya çapında yaklaşık 422 milyon diabet hastası vardı (yaklaşık her 11 kişiden 1'inde) ve bu sayı 1980 yılındakinden 14 kat daha fazladır (WHO., 1998). Bu sayısının gelişmekte olan eğilimler göz önüne alındığında 2030'a kadar 600 milyona ulaşması beklenmektedir (Kokil ve ark., 2015). Günümüze kadar bu hastalığın tedavisi için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyonu diabet tedavisinde önemli bir tedavi stratejisidir. Diyetle alınan karbohidratlar pankreatik α -amilaz ve intestinal α -glukozidaz gibi temel hidroliz edici enzimler tarafından glukoz da dahil olmak üzere monosakkaritlere hidrolize edilir. α -amilaz, α -1,4 glikozidik bağlarını hidroliz eder ve daha küçük oligosakkaritler ve disakkaritleri üretirken, α -glukozidaz disakkaritleri monosakkaritlere hidroliz eder. Dolayısıyla α -amilaz ve α -glukozidaz aktivitelerini

inhibe etmek yoluyla kan glukoz seviyesini kontrol altına almak etkili bir yaklaşımdır. Bu amaçla oral diabetik ilaçlarda akarboz, vigliboz gibi enzim inhibitörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu inhibitörlerin ishal başta olmak üzere gastrointestinal sistem üzerine pek çok yan etkilere sahiptir (Chakrabarti ve Rajagopalan, 2002). Bu bağlamda diabet tedavisinde daha güvenli doğal inhibitörlerin belirlenmesi ve bu kullanımlarının aydınlatılması birey ve toplum sağlığı açısından önemli bir konudur.

Tirozinaz bakır içeren bir enzim olup melanin sentezinde anahtar rol oynar. Melanin, cilt kanseri gibi önemli patolojik koşullara neden olabilecek zararlı ultraviyole radyasyona karşı korumadan sorumludur. Bununla birlikte, melaninin fazla birikmesiyle hiperpigmentasyon sonucu oluşan lekeler ciltte problemler yaratabilir ve çeşitli deri hastalıkları oluşturabilir. Melanin sentezi melanositler içinde, tirozinin, tirozinaz enzimi aracılığı ile önce dihidroksifenilalanin (DOPA)'e, sonra DOPA-kinon'a ve ondan da siyah-kahverengi veren ömelanin ve sarı-kırmızı rengi veren feomelanin'e dönüşmesiyle oluşur. Bu işlevi ile tirozinaz deri ve saç renginin oluşmasında görev alır. Tirozinaz enzimi ayrıca fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek meyve ve sebzelerde koyulaşmaya sebep olur (Cánovas ve ark., 1982; Rodríguez-López ve ark., 1991; Cooksey ve ark., 1997). Bu açıdan tirozinaz gıda endüstrisi içinde büyük öneme sahiptir. Tirozinaz aktivitesini inhibe etmek amacıyla başta kojik asit olmak üzere birçok sentetik inhibitör geliştirilmiş olmasına rağmen bunların uzun periyotta toksik etkilerinin bulunması bu inhibitörleri şüpheli hale getirmiş ve bunların yerine doğal inhibitörlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları ilgi odağı haline getirmiştir (Tocco ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında; *Dianthus calocephalus* (Caryophyllaceae) türünün farklı çözücü ve farklı ekstraksiyon metodları ile enzim inhibitör özellikleri ilk defa belirlenerek, halk hekimliğinde de kullanılan *Dianthus* türlerinin bilimsel bir temele oturtulması sağlanacaktır. Böylelikle ele geçen veriler; gıda, kozmetik, farmasötik ve nutrasötik endüstrileri için değerli olabilecektir. Sonuç olarak, bu verilerin ülke ekonomisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler, spesifik biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridir. Enzimlerin mükemmel özgünlüğü, yaşamı sürdürmek için gerekli olan birçok farklı metabolik aktiviteler arasında uyumlu bir etkileşim yaratmak için yüksek eşgüdüm sağlayan çok önemli bir biyolojik fenomendir (Nelson ve ark., 2008).

2.1.1. Enzimlerin yapısı

Protein yapısında olan her bir enzimin aminoasit dizilimi kendine özgü olarak şekillenmiştir. Enzimlerin proteinden oluşmuş kısmına apoenzim denir ve bu kısım enzimin hangi substrata etki edeceğini belirler. Birçok enzim optimum aktivite gösterebilmesi için protein dışı inorganik bir molekül ya da organik bir bileşiğe ihtiyaç duyar. İnorganik bir molekül; Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} ve K^+ vb. gibi metal iyonları ise kofaktör adını alır. Organik bileşik; tiamin, niyasin, riboflavin vb. gibi vitaminlerden oluşmuş ve apoenzimle çok sıkı birleşmeyip ayrılıyor ise koenzim ismini alır. Apoenzim ile kofaktör veya koenzimin birlikte oluşturduğu gruba ise tam enzim anlamına gelen holoenzim denir.

Enzimlerin Özellikleri

- 1- Enzimler genellikle spesifiktirler. Yani her enzim belli bir reaksiyon katalizler.
- 2- Enzimler genellikle çift yönlü çalışırlar.
- 3- Enzimler reaksiyondan etkilenmezler, girdikleri gibi çıkarlar. Bu yüzden tekrar tekrar kullanılırlar.
- 4- Enzimler etkinliklerini maddenin dış yüzeyinden başlatırlar.
- 5- Enzimler hem hücre içi hem de hücre dışında da etkilidir.
- 6- Enzimler genellikle takım halinde çalışırlar.
- 7- Her enzim belli bir koenzim ile çalışır. Ancak koenzimler farklı enzimler ile çalışabilir.
- 8- Etki ettiği maddenin sonuna 'az' eki getirilir.
- 9- Her hücrede tepkime çeşiti kadar enzim çeşiti vardır (Nelson ve ark., 2008).

2.1.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler etki ettiği reaksiyonun çeşidine göre sınıflandırılırlar. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler altı büyük sınıfa ayrılırlar ve her sınıfında katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları da vardır. Bu gruplar:

1-Oksidoredüktazlar: Bu sınıfa dâhil olan enzimler indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonlarını katalize ederler.

2-Transferazlar: Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine transfer katalizini sağlarlar.

3-Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler. Esterazlar, glikozidazlar, peptidazlar gibi enzimler bu gruba dâhildir.

4-Liyazlar: Bu enzimler, C-C, C-O, C-N, C-S arasındaki bağları oksidasyon veya hidrolizden başka yollarla bağları yıkarlar veya bir çift bağ oluştururlar.

5-İzomerazlar: Bu enzimler bir molekül içinde geometrik veya yapısal değişiklikleri katalize ederler. İzomerizmin tipine göre; rasemazlar, epimerazlar, mutazlar olarak da isimlendirilirler.

6-Ligazlar (Sentetazlar): Enerjice zengin bir bağın hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler (Nelson ve ark., 2008).

2.1.3. Enzimlerin aktivitesi

Enzim aktivitesi; enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisi ile optimal koşullarla belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür (Nelson ve ark., 2008). Enzim aktivitesine çeşitli faktörler etki etmektedir:

Sıcaklık: Enzimler protein yapılı moleküller olduğundan proteinleri etkileyen sıcaklık değişimlerine duyarlıdırlar. Her enzimin en fazla aktivite gösterdiği bir sıcaklık derecesi vardır. Buna optimum sıcaklık denir. Bu değer pek çok canlıda 30 – 40 °C arasındadır (İnsanda 37°C). Sıcaklık derecesi optimum değerinin altına düştüğünde veya üstüne çıktığında enzimatik reaksiyon hızı azalır. Yüksek sıcaklıkta (genellikle 55 – 60°C de) enzimlerin yapısı bozulur.

pH derecesi: Enzimler pH değişimlerine karşı çok duyarlıdır. Enzimlerin büyük çoğunluğu optimum olarak nötre yakın pH'larda çalışırken bazıları farklılık gösterebilir. Örneğin midede proteinleri sindiren pepsin enzimi pH = 2'de, yani oldukça asidik bir ortamda en iyi çalışır. Buna karşılık pankreastan ince bağırsağa salgılanan ve yine protein sindiriminde görev alan tripsin enzimi pH = 8,5'ta, yani bazik ortamda etkilidir. Kuvvetli asit ve bazlar enzimlerin yapısını bozar.

Enzim yoğunluğu: Eğer pH ve sıcaklık uygunsuzsa yeterli miktarda substrat bulunan bir ortamda, enzim yoğunluğu arttıkça reaksiyon hızı da artar. Sınırlı miktarda substrat bulunan bir ortamda, enzim yoğunluğu artırılırsa reaksiyon bir süre devam eder ve sonra durur. Bunun sebebi ortamda enzimin etkileyeceği substratın kalmamasıdır.

Substrat yoğunluğu: Enzim miktarı sabit tutulup substrat yoğunluğu artırılırsa, reaksiyon hızı en yüksek noktaya ulaştıktan sonra sabit kalır. Bunun nedeni enzimlerin bir süre sonra substrata doymuş hale gelmeleri ve hiç boş kalmaksızın çalışmalarıdır. Yani enzimlerin hepsi bir substrata bağlı durumda bulunurlar ve birini bıraktıklarında diğerine bağlanırlar. Sonuçta daha fazla substrat eklense bile reaksiyon hızı artmaz.

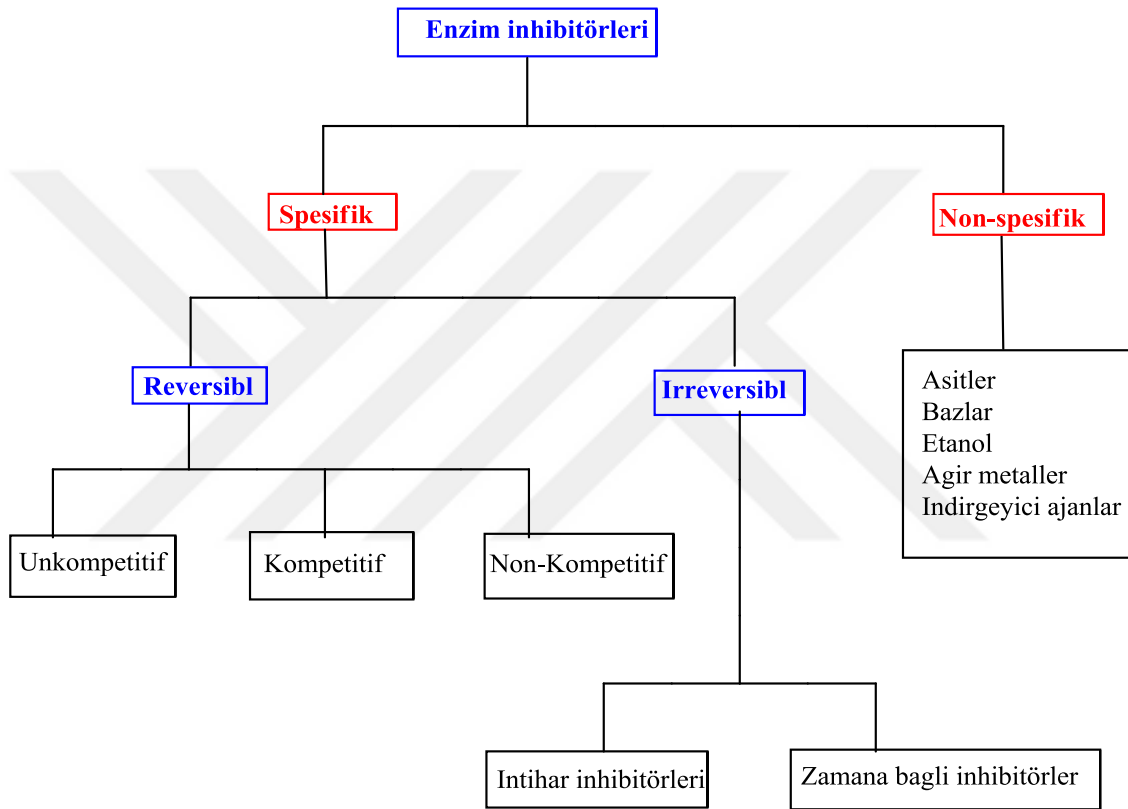
Substrat yüzeyi: Enzimler etkilerini substratın dış yüzeyinden başlayarak gerçekleştirdikleri için, substrat yüzeyi arttıkça reaksiyon hızı da artar. Substratın küçük parçalara bölünmesi, toplam yüzeyi artıracağından enzimin etkinliğinde de artışa yol açacaktır. Bu yüzden kıyılmış et aynı miktar parça etten daha kolay sindirilir.

Su: Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içinde gösterirler. Çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir. Bu nedenle su miktarı enzim etkinliğinde önemlidir. Genellikle su miktarı % 15'in altında olduğu zaman enzimler işlev göstermezler.

Aktivatör ve inhibitör maddeler: Enzimlerin etkinliğini artıran maddelere aktivatör denir. Bazı aktivatörler enzimin substratı ile birleşmesini kolaylaştırırken, bazıları enzimin aktif merkezini daha da aktif hale getirerek enzim etkinliğini artırır. Aktivatörlere örnek olarak klor ve magnezyum gibi bazı iyonlar verilebilir. Enzim etkinliğini yavaşlatan veya engelleyen maddelere inhibitör denir. Bazı inhibitörler enzimin aktif merkezine bağlanarak bazıları da aktif merkezi bozarak enzim etkinliğini durdururlar. Kurşun, civa, bakır gibi ağır metaller inhibitör maddelere örnek olarak verilebilir. Bir diğer inhibitör madde olan siyanür solunumda görev yapan bir enzimin etkinliğini durdurarak zehirlenmeye neden olmaktadır (Nelson ve ark., 2008).

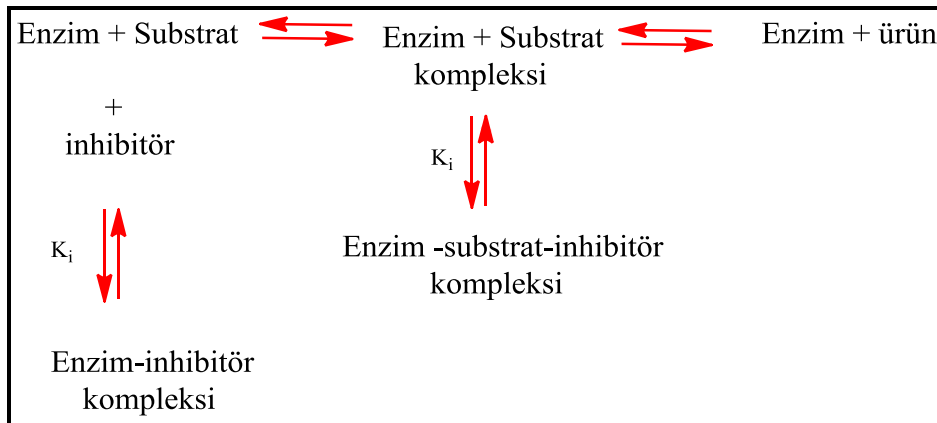
2.1.4. Enzimlerin inhibisyonu

Enzim inhibisyonu; enzim ile etkileşim türüne bağlı olarak inhibitör maddenin bağlanması ya reversibl ya da irreversibl olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.1). İrreversibl inhibisyonda genellikle inhibitör madde, enzim ile kimyasal bir reaksiyona girerek yapı değişimine neden olur ve bu durum geri döndürülemez. Reversibl inhibisyonda ise, inhibitör madde; enzime ya da enzim-substrat kompleksine kovalent bağ oluşumu dışında farklı etkileşimlerle bağlanır ve böylelikle uygun koşullarda inhibisyon geri döndürülebilir.



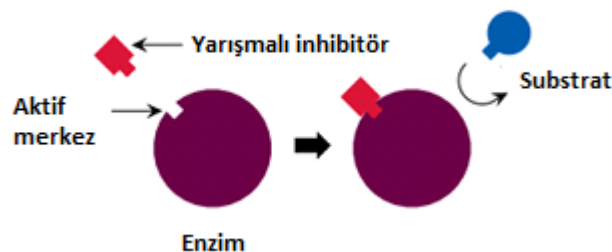
Şekil 2.1. Enzim inhibitörlerinin sınıflandırılması

Reversibl inhibitörler; kompetitif, unkompetitif ve nonkompetitif inhibitörler olarak sınıflandırılabilirler. Reversibl inhibisyonda inhibitörler; hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerle enzime bağlanırlar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Reversibl enzim inhibisyonu

Kompetitif inhibisyonda; inhibitör genellikle doğal substrat ile yapısal benzerliğe sahiptir ve aktif bölgeye erişim için substrat ile rekabet eder (Şekil 2.3). İnhibitör aktif bölgeye bir afiniteye sahiptir ve eğer substrattan daha sıkı bir şekilde bağlanırsa etkili bir kompetitif inhibitördür. Aksine, eğer daha az kuvvetle bağlandığı takdirde zayıf bir inhibitör olarak düşünülebilir. Kompetitif inhibisyonda; inhibitör enzim-substrat kompleksine değil, sadece serbest enzime bağlanabilir. Bu nedenle bir reaksiyon içindeki substrat konsantrasyonunun arttırılmasıyla inhibisyon aşılabılır.

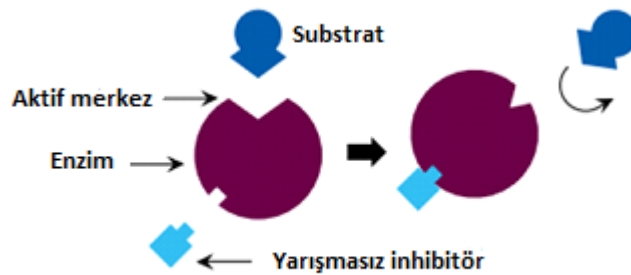


Şekil 2.3. Kompetitif inhibisyon

Nonkompetitif inhibitörler yalnızca enzim-substrat kompleksine bağlanırlar. Nonkompetitif inhibisyon, kompetitif inhibisyondan farklılıklara sahiptir. İnhibitör enzimini aktif bölgesine bağlanmaz ve substrata benzemek zorunda değildir.

Nonkompetitif inhibisyonda, inhibitörün bağlanması enzim aktivitesini düşürür, fakat substratın bağlanmasını etkilemez (Şekil 2.4). Dolayısıyla inhibisyonun derecesi sadece inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır. Bu inhibitörler, substrat bağlanma bölgesi dışındaki bölgelere non-kovalent olarak bağlanır. İnhibitörün bağlanması, substrat için bağlanma durumunu etkilemez. Dolayısıyla, substratın ve inhibitörün bağlanması

birbirinden bağımsızdır ve inhibisyon, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla önlenemez.



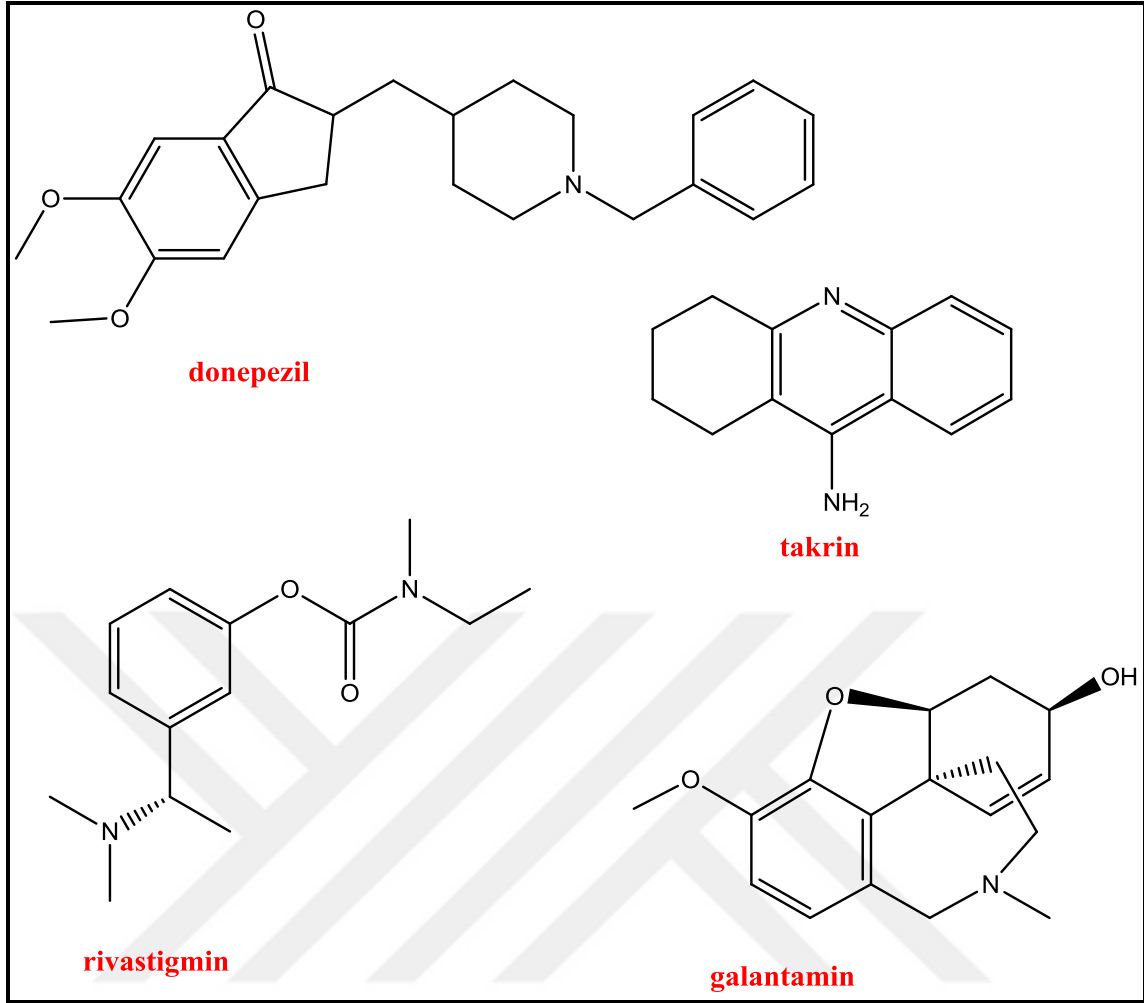
Şekil 2.4. Nonkompetitif inhibisyon

İrreversibl inhibitörler, doğada nonkompetitifirler. Bunlar, asitler ve alkaliler gibi spesifik olmayan protein denatüre edici ajanlar ve holoenzim sisteminin spesifik komponentlerine saldıran ajanları içerir. Spesifik inhibitörler: koenzim inhibitörleri, spesifik iyon kofaktör inhibitörleri, prostetik grup inhibitörleri, apoenzim inhibitörleri ve reaksiyonun fizyolojik modülatörleri (enzimlerin katalitik bölgelerini denatüre eden pH ve sıcaklık gibi) olarak sınıflandırılabilir. Çoğu irreversible inhibitörler enzim üzerindeki fonksiyonel gruplarla etkileşime girer ve enzim aktivitesini yok eder (Strelow ve ark., 2012).

2.2. Kolinesteraz İnhibitörleri

Yaşlılarda bunamanın en yaygın sebebi Alzheimer hastalığıdır. Alzheimer hastalığı kronik ilerleyici bir hastalık olup öğrenme kapasitesi ve hafızadaki bozuklukları ile karakterizedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde mevcut Alzheimer hastalığının yaygınlığı 1.1 ile 4.8 milyon arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Brookmeyer ve ark., 1998). β -amiloid plakların Alzheimer patolojisinde ana elemanlar olduğu ve bunların sinaptik transmisyonu engellediği bulunmuştur. Kolinerjik transmisyondaki bu nöronal bozulma öğrenme, hafıza, davranış, duygu ve sosyal işlevlerle ilişkili beyin bölgelerinde gözlenmiştir (Katzman, 1986). Çeşitli araştırmacılar tarafından bu bulgular sonraki yıllarda desteklenmiştir. Bu bulgular ışığında kolinesteraz inhibitörleri ve doğrudan kolinerjik agonistler gibi Alzheimer hastalığının

tedavisi için ilaçlar geliştirilmiştir. Asetilkolin (ACh) kolinerjik nöronlarda oluşan bir nörotransmitterdir. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütilkolinesteraz (BChE) enzimlerinin ikisinde ACh parçalama kabiliyetine sahiptir. AChE ve BChE vücudun çeşitli dokularında farklı şekilde dağılmıştır. AChE (EC 3.1.1.7) yüksek seviyelerde beyinde bulunurken düşük miktarda iskelet kası, eritrositler, lenfositler ve trombositlerde bulunmaktadır. BChE (EC 3.1.1.8) temelde glial hücrelerde bulunur ve ayrıca plazma ve karaciğerde de bulunmaktadır (Thompson ve ark., 2004). Kolinesteraz inhibitörleri bu enzimlerin faaliyetlerini inhibe eder ve sinaptik bölgedeki asetilkolin seviyesini arttırmaktadır. Asetilkolin eksikliği Alzheimer hastalığının ilerlemesinde tetikleyici temel faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Yoo ve Park, 2012). Bu yüzden kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli bir konumdadır. Donepezil, takrin, galatamin ve rivastigmin gibi kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının semptomlarının tedavisi için kullanılmaktadır (Thompson ve ark., 2004) (Şekil 2.5). Fakat bu inhibitörlerin hepatotoksisite ve gastrointestinal komplikasyonlar gibi yan etkileri rapor edilmiştir. Aslında diğer organlara veya diğer biyokimyasal süreçlere zarar vermeden sadece beyindeki asetilkolini inhibe eden ilaçların geliştirilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Roseiro ve ark., 2012). Bu bağlamda yan etkileri minimuma indirilmiş enzim inhibitörlerinin dizayn edilmesi ve keşfedilmesi son zamanların en ilgi çekici konularından biridir. Bu noktadan hareketle çok sayıda tıbbi bitkinin bilişsel bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıkları tedavi etme potansiyeli araştırılmaktadır.



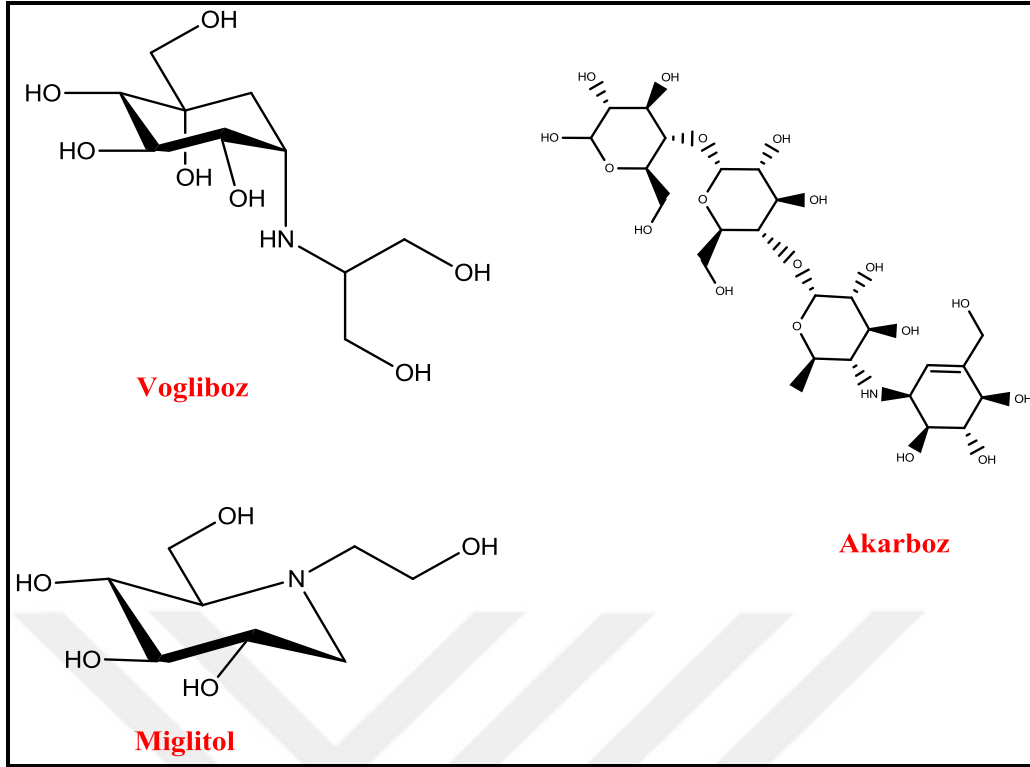
Şekil 2.5. Bazı sentetik kolinesteraz inhibitörleri

2.3. Diabet ve ilişkili enzimler

Diabet ve obezite tüm Dünya’da geniş kitleleri etkileyen en ciddi sağlık problemlerinden biridir (Touger-Decker ve Van Loveren, 2003; Van de Laar ve ark., 2005). Son çalışmalara göre 2030 yılına kadar yetişkin nüfusta yaklaşık 438 milyon insanın (% 7.8) diabet hastası olacağı tahmin edilmektedir (Ramachandran ve ark., 2010). Diabet insülin sekresyonu, insülin eksikliği veya her ikisinin etkisi sonucu ortaya çıkan karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasını etkileyen metabolik bir bozukluktur (Yanovski ve Yanovski, 2002). Tip 2 diyabet en yaygın tipi olup retinopati, nefropati, nöropati, mikroanjyopati ve artmış kardiovasküler hastalık riski gibi kronik komplikasyonlara sebep olmaktadır (Alberti ve Zimmet, 1998; Cheng ve Fantus, 2005; Van de Laar ve ark., 2005; Crônicas, 2007). Diabet tedavisi için terapötik stratejiler

insülin talebinin azaltılması, endojen insülin sekresyonunun uyarılması, hedef dokularda insülin ve disakkaritlerin yıkımının engellenmesi ve klinikte yaygın olarak kullanılan ilaçların kan şekeri seviyesini düşürmeyi amaçlamaktadır (Chakrabarti ve Rajagopalan, 2002; Inzucchi, 2002; Funke ve Melzig, 2006). Tip 2 diabet tedavisinde kan glukoz seviyesinin azaltılması amaçlanmaktadır. Bu bağlamda karbohidrat metabolizmasından sorumlu olan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu önemli bir yaklaşımdır (Göke ve Herrmann-Rinke, 1998; He, 1998; Inzucchi, 2002; Van de Laar ve ark., 2005). α -amilaz (1,4 glukoz-4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), pankreasın yaklaşık %5-6 ve tükürük bezlerinin en önemli sindirim enzimlerinden birisidir. Bu enzim mikroorganizmalarda, bitkilerde ve yüksek organizmalarda karbohidrat metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kandra, 2003; Whitcomb ve Lowe, 2007). α -glukozidaz (EC 3.2.1.20) ikinci enzimdir ve karbohidrat sindirim sürecinin son adımını katalize ederek glukozu vermektedir (Tundis ve ark., 2010). α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu postprandial kan glukoz seviyesinin kontrolünde etkili olabilir. Bu yüzden postprandial hiperglisemin yönetilmesinde önemli bir strateji α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonudur (Krentz ve Bailey, 2005).

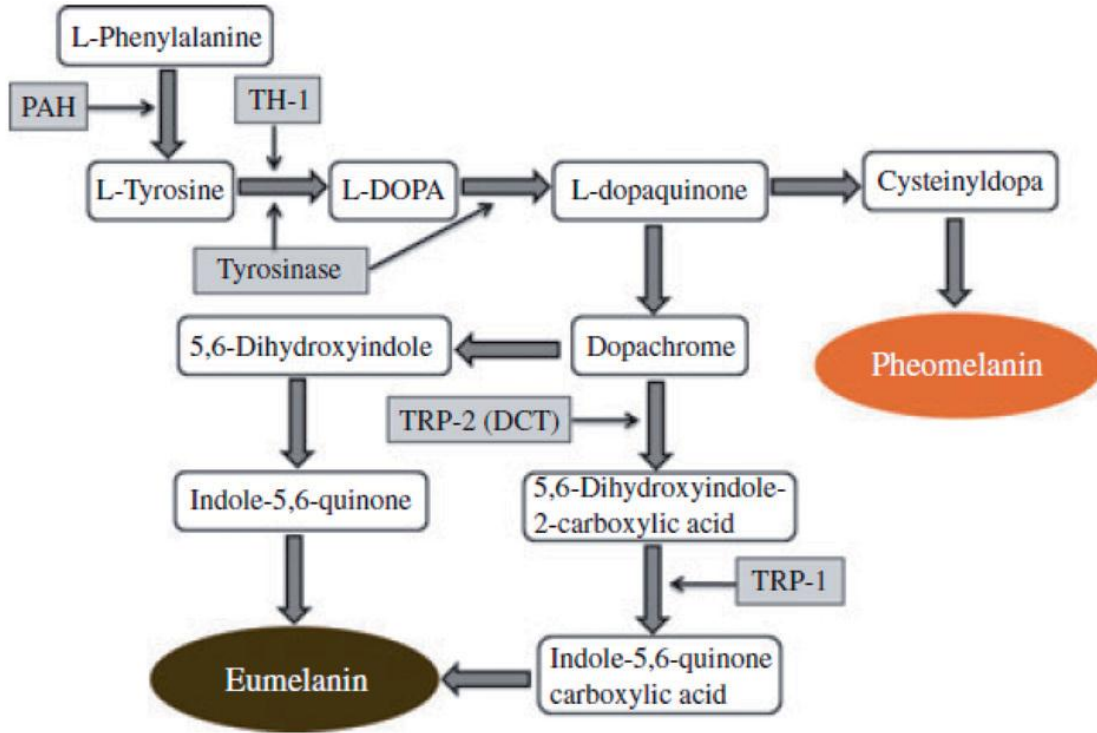
Bu amaçla oral antidiabetik ilaçlarda akarboz, miglitol ve vogliboz gibi inhibitörler kullanılarak karbohidratların parçalanmasını ve emilimini yavaşlatarak kan glukoz düzeyinin yükselmesi engellenmektedir (Cheng ve Fantus, 2005; Van de Laar ve ark., 2005) (Şekil 2.6). Akarboz gibi bu inhibitörler ishal, karın ağrısı ve şişkinlik gibi gastrointestinal problemlere sebep olmaktadır. Bu durumda daha az yan etkiye sahip ve daha güvenli doğal inhibitörlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Birçok çalışmada, α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri bitkisel kaynaklardan elde edilmiştir (Bernfeld, 1955; Mosca ve ark., 2008). Teknolojinin hızla gelişmesi ile antidiabetik doğal ürünler üzerine çalışmalar artarak devam etmektedir (Espinoza-Fonseca, 2006).



Şekil 2.6. Bazı antidiabetik bileşikler

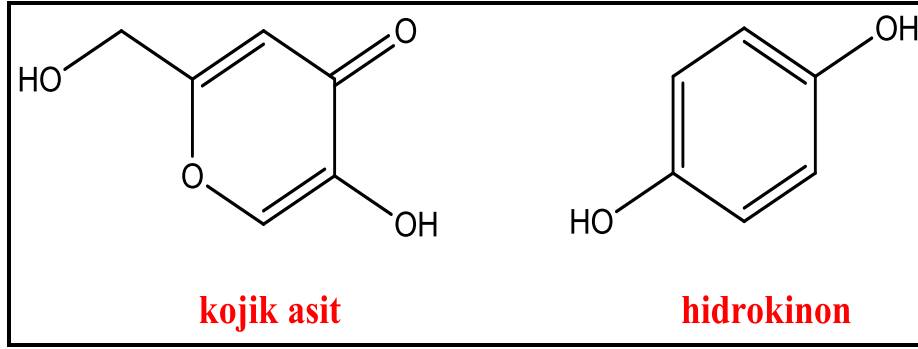
2.4. Tirozinaz enzimi

Pigmentin ana unsuru olan melanin, melanozomda melanogenez adı verilen karmaşık bir süreçle melanosit aracılığıyla üretilmektedir (Slominski ve ark., 2004; Gilchrest, 2011; Slominski ve ark., 2012). Melanosit endokrin, bağışıklık, inflamatuvar ve merkezi sinir sistemi ile etkileşime girer ve onun aktivitesi ayrıca ultraviyole ışınlar ve kimyasallar gibi dış faktörler tarafından düzenlenmektedir (Lin ve Fisher, 2007). Melanin cilt, saç ve göz renginin temel belirleyicisidir ve kimyasalları, toksik ilaçları süpürmede ve zararlı ultraviyole ışınlardan koruma gibi önemli görevlere sahiptir (Lee ve ark., 2013). Fakat cildin belirli bölgelerinde anormal melanin birikmesi estetik problemlere sebep olmaktadır. Melaninin iki ana tipi vardır; birincisi kırmızı/sarı feomelanin, ikincisi kahverengi/siyah ömelanindir. Bu iki tip melanin hem renk hem de şekil ve boyut bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu melanin tiplerinin sentezi ve melanogenezde rol alan enzimler Şekil 2.7’de verilmiştir (Videira ve ark., 2013).

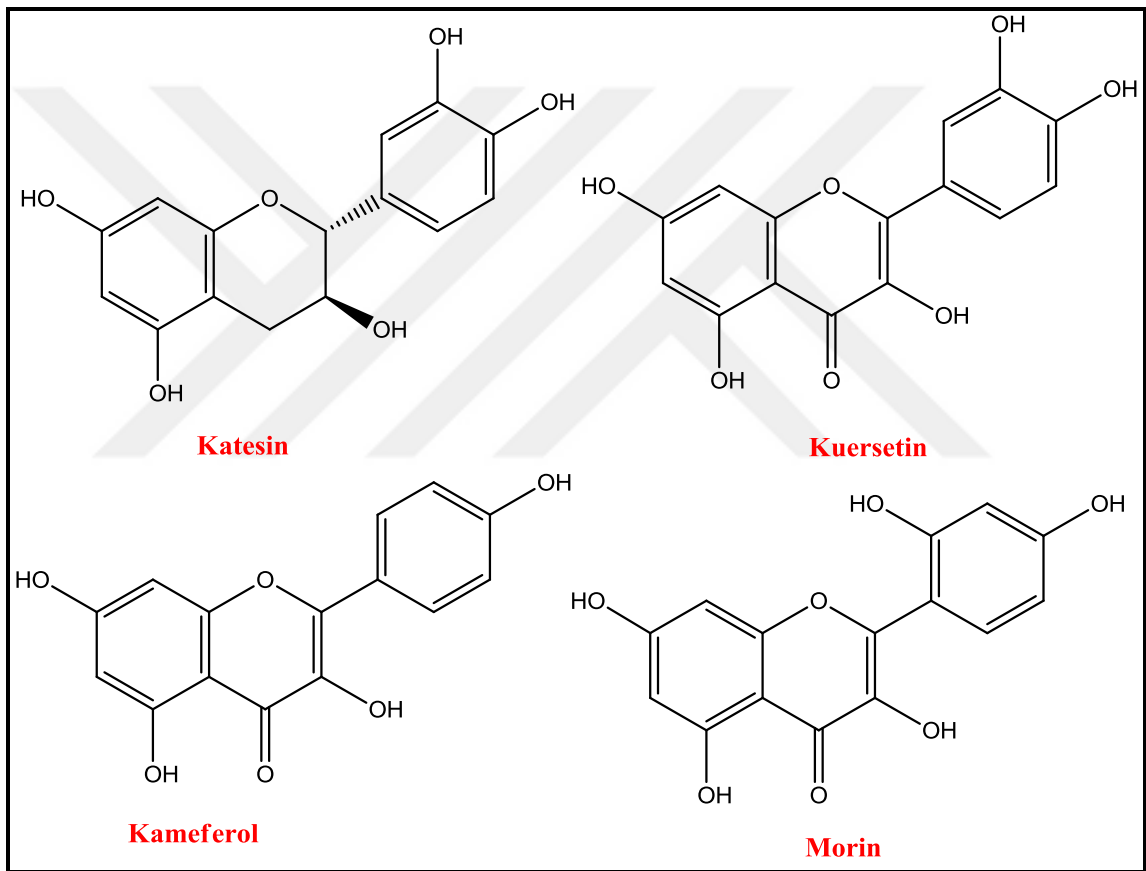


Şekil 2.7. İki tip melanin sentezi ve fonksiyonlarının gösterimi (Gillbro ve Olsson, 2011)

Tirozinaz melanin sentezinde ilk iki adımı katalize etmektedir. (Stratford ve ark., 2013). Sentetik ve doğal kaynaklardan anti-melanogenez ajan olarak bilinen çoğunlukla tirozinaz inhibitörleridir. Bu konu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Kim ve Uyama, 2005; Chang, 2009; 2012; Loizzo ve ark., 2012; Thomas ve Kim, 2013). Tirozinaz ilk kez Bourquelot ve Bertrand (1895) tarafından mantardan izole edilmiştir. Tirozinaz (EC 1.14.18.1) bakır içeren çok fonksiyonlu bir enzimdir ve melanin biyosentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzden tirozinaz inhibitörleri melanin hiperpigmentasyonu ile ilişkili dermatolojik bozuklukların tedavisinde, kozmetikte ve güneş yanığı sonrası depigmentasyonda kullanılmaktadır (Chang, 2009). Günümüzde hidrokinon ve kojik asit gibi sentetik anti-tirozinaz inhibitörleri deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.8). Fakat bu sentetik inhibitörlerin çeşitli yan etkilerinin olmasından dolayı minimum yan etkiye sahip doğal anti-tirozinaz inhibitörlerin keşfi ilgi odağı haline gelmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.8. Sentetik tirozinaz inhibitörleri



Şekil 2.9. Antitirozinaz aktiviteye sahip bazı flavonoidler (Lee ve ark., 2016)

2.5. Caryophyllaceae Familyası ve *Dianthus* Cinsi

Ülkemiz iklim ve toprak yapısındaki çeşitlilik sebebiyle dünyanın en zengin biyoçeşitliliğine sahip ülkelerinden biridir. “Karanfilgiller” olarak bilinen Caryophyllaceae familyası üyeleri dünyada 88 cinse ait 2000 kadar tür ile temsil edilmektedir. Caryophyllaceae ailesine ait türler tek yıllık veya çok yıllık bitkiler olup

farklı iklim tiplerinde yetişmektedir. Familya üyelerinin büyük bölümü Akdeniz bölgesi, Avrupa ve Asya kıtalarında yayılış göstermektedir. Günümüzde bu familyanın *Dianthus caryophyllus*, *D. chinensis* gibi pek çok türü süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Bittrich, 1993). Bazı türler ise halk hekimliğinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Mansouri, 1999). *Dianthus* cinsi Caryophyllaceae familyasının önemli üyelerinden birisidir. “Dianthus” kelimesi Yunanca kökenli olup dios (tanrı) ve anthos (çiçek) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur ve ilk defa Yunanlı botanikçi Theophrastus tarafından kullanılmıştır. *Dianthus* cinsi dünya üzerinde 300’e yakın, Türkiye’de ise 67 tür ile temsil edilir (Bittrich, 1993). Bu cins ülkemizde başta Ege ve Akdeniz bölgelerinde olmak üzere tüm Anadolu’da yayılış göstermektedir. Literatür taraması yapıldığında *Dianthus* cinsine ait çeşitli türlerin çok eski çağlardan beri geleneksel halk tedavisinde kullanıldığı görülmüştür (Tablo 2.1). İran’da çeşitli *Dianthus* türleri antiseptik, ateş düşürücü, ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Çin’de *D. superbus* iltihap ve çıban gibi cilt problemleri ve kanser tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Hikino ve ark., 1984; Mansouri, 1999; Bonjar, 2004).

Tablo 2.1. Bazı *Diathus* türlerinin tıbbi özellikleri

Bitki ismi	Kullanılan kısım	Tıbbi özellikleri	Kaynak
<i>Dianthus anatolicus</i> Boiss	Bitkinin tamamı	Antipiretik ve tonik olarak	(Hooper ve ark., 1937; Pullaiah, 2006)
<i>Dianthus basuticus</i> Burt Dav	Kök kısmı	Kanın temizlenmesinde	(Moteetee ve Van Wyk, 2011)
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Çiçek tomurcukları	Yaraların, boğaz enfeksiyonlarının ve gastrointestinal bozuklukların tedavisinde	(Al-Rawi ve Chakravarty, 1988; Mohammed ve Al-Bayati, 2009)
<i>Dianthus chinensis</i> L.	Bitkinin tamamı	Öksürük tedavisinde, diüretik ve adet hızlandırıcı olarak	(Bown, 1995; WHO., 1998)
<i>Dianthus superbus</i> L.	Bitkinin tamamı	Astım tedavisinde ve idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde anti-inflammatuar ajan olarak	(López-Expósito ve ark., 2011; Shin ve ark., 2012)

2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bitkilerin tıbbi özelliklerinin ortaya çıkarılmasında yapılacak olan analizler için en önemli ilk aşamadır. Bitki materyalleri içerisindeki biyoaktif bileşenlerin kalitatif ve kantitatif çalışmaları çoğunlukla doğru ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmesine dayanmaktadır (Smith, 2003; Sasidharan ve ark., 2011) Ekstraksiyon proseslerini etkileyen en yaygın faktörler; bitki parçasının matriks özellikleri, çözücü, sıcaklık ve zamandır (Hernández ve ark., 2009). Bitki materyallerinin ekstraksiyonu çeşitli ekstraksiyon prosedürleri ile yapılabilir. Son 50 yıl boyunca, sentetik ve organik kimyasalların kullanımının azalması ile ekstraktlardan daha iyi verim elde edilebilen ve çevre dostu olan geleneksel olmayan yöntemler geliştirilmiştir. Bitki materyallerinden biyoaktif bileşenlerin seçiciliğini ve verimini arttıran ultrasonik ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyon gibi pek çok metod geliştirilmiştir (Kaufmann ve Christen, 2002; Gaur ve ark., 2007; Wang ve ark., 2008; Ghafoor ve ark., 2011). Aynı zamanda, soxhlet gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri de, yeni geliştirilen metodların başarısını karşılaştırmak için referans yöntemlerden biri olarak düşünülmektedir. Geleneksel olmayan yöntemlerin incelendiği pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda, farmasötikal, nutrasötikal ve gıda katkı maddeleri gibi pek çok sektörde geleneksel olmayan ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımının önemi vurgulanmakla beraber eksik yönleri de belirtilmiştir (Jennings ve Rapp, 1983; Szumski ve Buszewski, 2002; Smith, 2003; Wang ve Weller, 2006). Geleneksel ve geleneksel olmayan bazı ekstraksiyon metodlarının karşılaştırılması Tablo 2.2'de verilmiştir.

Bitkisel materyallerden elde edilen biyoaktif bileşikler çeşitli klasik ekstraksiyon yöntemleri (geleneksel ekstraksiyon yöntemleri) ile ekstrakte edilebilir. Bu tekniklerin çoğu; kullanılan farklı çözücülerin ekstraksiyon gücüne, ısıtma veya karıştırma uygulamasına dayanmaktadır. Mevcut klasik tekniklerden en çok kullanılanları ise soxhlet ve maserasyon yöntemleridir.

Soxhlet ekstraktörü ilk kez 1879 yılında Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet tarafından öne sürüldü. Soxhlet aparatı ilk olarak yalnızca yağ ekstraksiyonu için tasarlanmış olsa da, günümüzde sadece bununla sınırlı kalmamıştır. Soxhlet ekstraksiyonu, çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen değerli biyoaktif bileşenlerin çıkarılması için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Alternatif yeni ekstraksiyon

metotlarının karşılaştırılması için de model olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Azmir ve ark., 2013).

Maserasyon ile ekstraksiyon uzun zamandır ev yapımı toniklerin hazırlanmasında kullanılmıştır ve biyoaktif bileşikler elde etmek için popüler bir yol olmuştur. Maserasyon ekstraksiyonu genellikle birkaç aşamadan oluşur. İlk olarak, bitki materyallerinin küçük parçacık halinde öğütülmesi aşaması; çözücü ile doğru orantılı şekilde karıştırılması için yüzey alanı arttırmak için önemlidir. Daha sonra uygun çözücü maserasyon işleminin gerçekleşeceği hazneye eklenir. Sonrasında ise 1-4 gün boyunca sürekli çalkalama işlemine tabii tutularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilir.

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin; daha uzun zamanı, pahalı ve yüksek saflıktaki solvent ihtiyacı, düşük ekstraksiyon seçiciliği gibi başlıca zorlukları vardır (De Castro ve Garcia-Ayuso, 1998). Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin bu zorluklarının üstesinden gelebilmek için, yeni ve umut verici ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Geleneksel olmayan ve en çok umut verici tekniklerden bazıları ultrasonik ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyondur. Bu tekniklerden bazıları, Çevre Koruma Ajansı tarafından belirlenen standartlara uygun oldukları için “yeşil teknikler” adını alır.

Ultrasonik ses dalgaları, insanların işittiklerinin ötesinde özel bir ses dalgası türüdür ve dalga boyu genellikle 20 kHz ile 100 MHz arasındadır. Bu yöntemle yapılan ekstraksiyonda, hücre duvarlarının geçirgenliği artırılarak kavitasyon sağlanır. Bu yöntemin temel faydası katı bitki örneklerde gözlemlenebilir. Çünkü ultrason enerjisi, bitki matrisindeki organik ve inorganik bileşiklerin açığa çıkartılmasını kolaylaştırır (Herrera ve De Castro, 2005). Muhtemel mekanizma, kütle transferlerinin ultrason enerjisiyle yoğunlaştırılması ve hücrelerdeki bitki materyallerinin çözücüye hızla geçmesi esasına dayanır. Ultrasonik ses dalgalarıyla yapılan ekstraksiyon mekanizması; 1-hücre duvarı boyunca difüzyon ve 2-duvarların yıkılması sonrası bitkisel içeriğin durulanması olmak üzere iki ana fiziksel olay içerir (Mason ve ark., 1996). Numunenin nem içeriği, öğütme derecesi, parçacık boyutu ve çözücü etkili bir ekstraksiyon önemli faktörler arasındadır. Ultrasonik ekstraksiyonunun en önemli avantajları; ekstraksiyon zamanının kısalması, daha az enerji kullanımı ve solvent miktarının az olmasıdır (Chemat ve ark., 2008).

Tablo 2.2. Soxhlet, maserasyon ve soniksasyon tekniklerinin karşılaştırılması

	Geleneksel Yöntemler		Geleneksel olmayan Yöntem
	Soxhlet ekstraksiyon	Maserasyon	Soniksasyon
Kullanılan yaygın çözücüler	Metanol, etanol veya alkol-su karışımı	Metanol, etanol veya alkol-su karışımı	Metanol, etanol veya alkol-su karışımı
Sıcaklık (°C)	Kullanılan çözücüye bağlı	Oda sıcaklığı	Isıtılabilir
Basınç uygulaması	Uygulanmaz	Uygulanmaz	Uygulanmaz
Gerekli zaman	3-18 saat	1-4 gün	1 saat
Gerekli çözücü miktarı (ml)	150-200	Örnek büyüklüğüne bağlı	50-100
Referanslar	(Huie, 2002; Zygmunt ve Namiesnik, 2003)	(Woisky ve Salatino, 1998; Cunha ve ark., 2004; Phrompittayarat ve ark., 2007; Sasidharan ve ark., 2011)	(Huie, 2002; Zygmunt ve Namiesnik, 2003)

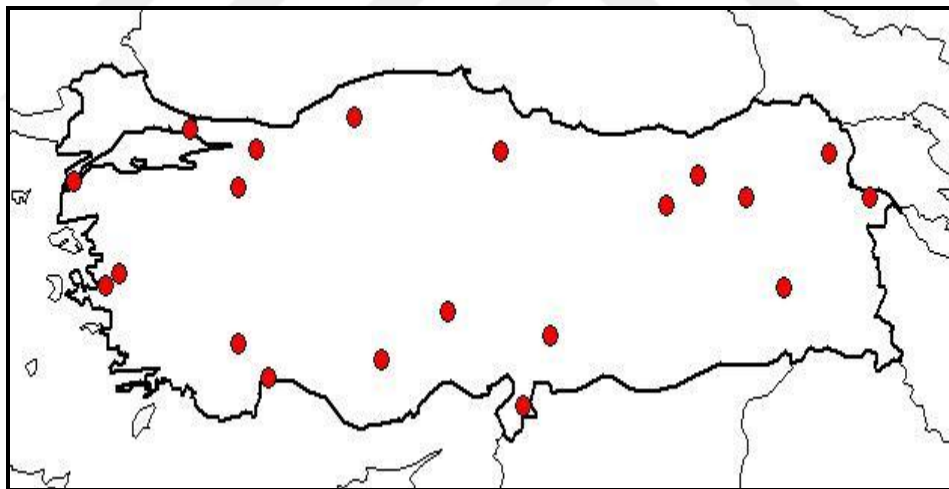
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Bitkisel Özütlelerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan *Dianthus calocephalus* 2015 yılında çiçeklenme döneminde Kayseri Ali Dağı'ndan toplandı. Bitkinin sistematik olarak teşhisi Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından gerçekleştirilmiştir. Türkiye'de yayılışı şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. *D. calocephalus* hakkında genel bilgiler

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ot
Çiçeklenme	Mayıs-Eylül
Habitat	Kumullar, volkanik ve kireçtaşı yamaçlar, step, tarlalar, açık orman arazileri, kayalar
Yükseklik	400-2300
Endemik	Endemik değil
Türkiye dağılımı	Ege, Akdeniz, Orta ve D. Anadolu

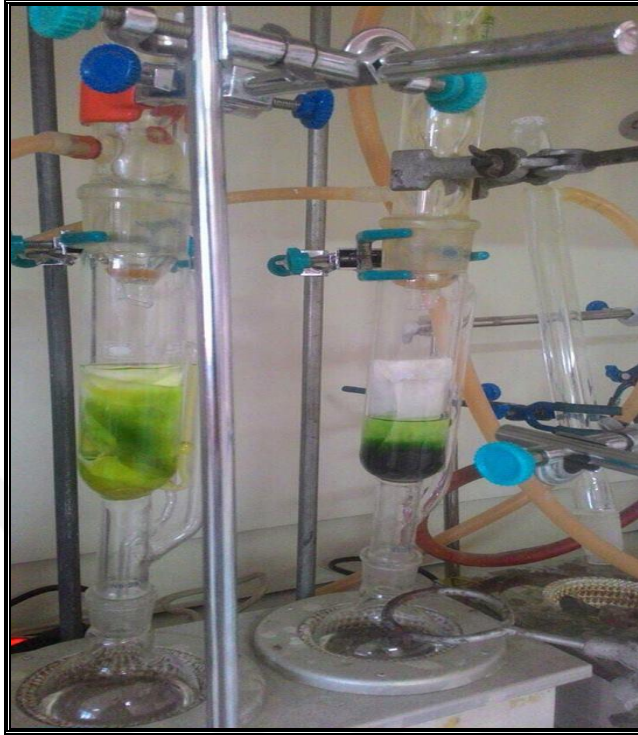


Şekil 3.1. *D. calocephalus* 'un Türkiye'deki yayılışı

3.1.1. Sokslet

Dianthus calocephalus toplanıp gölgede kurutuldu ve daha sonra kurutulmuş biki örneği değirmende iyice toz haline getirildi ve bu toz haline getirilmiş örnekten yaklaşık 5 g tartılıp sokslet aparatında 6-8 saat süreyle etil asetat ve metanol ekstraksiyona tabii tutuldu (Şekil 3.2). Bu süre sonunda ele geçen karışım Whatman kağıdı ile süzülde. Su özütlerinin çıkarılması için ise 10 g öğütölmüş bitki 250 ml su ile

30 dakika kaynatıldı. Bu işlemlerden sonra rotary evaporatorde 40°C'de çözücüler tamamen buharlaştırıldı (Şekil 3.3). Ele geçen kuru özütler analiz edilinceye kadar +4°C'de saklandı.



Şekil 3.2. Sokslet düzeneği



Şekil 3.3. Rotary evaporator

3.1.2. Maserasyon

Toz haline getirilmiş örnekten her bir çözücü için yaklaşık 5 g tartılıp 200 ml etil asetat, metanol ve su ile inkübatörlü çalkalayıcıda 25 °C de 24 saat karıştırıldı (Şekil 3.4). Bu süre sonunda ele geçen karışım Whatman kağıdı ile süzüldü ve sonra rotary evaporatorde 40°C’de çözücüler tamamen buharlaştırıldı. Ele geçen kuru özütler analiz edilinceye kadar +4°C’de saklandı.



Şekil 3.4. İnkübatörlü çalkalayıcı

3.1.3. Ultrasonikasyon

Toz haline getirilmiş örnekler (2 g) 20 ml çözücü (etil asetat, metanol ve su) ile 30 C° de sonikasyon banyosunda 60 dakika ekstrakte edildi (Şekil 3.5). Bu süre sonunda ele geçen karışım Whatman kağıdı ile süzüldü ve sonra rotary evaporatorde 40°C’de çözücüler tamamen buharlaştırıldı. Ele geçen kuru özütler analiz edilinceye kadar +4°C’de saklandı.



Şekil 3.5. Sonikasyon banyosu

3.2. Fenolik içeriğin belirlenmesi

3.2.1. Toplam fenolik madde tayini

Bitki özütlerin konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bitkisel droglarda 250 µl ayrı deney tüplerine alındı. Daha sonra her bir tüpe 1ml Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilmiş) ilave edildi. Ardından her bir tüpe 750 µl %1'lik Na₂CO₃ çözeltisinden eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbanları ölçüldü. Tüm antioksidan kapasite tayin testlerinde spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1800 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de tekrarlandı. Bitkilerin fenolik madde içeriği gallik asit eş değeri (mg GAE/g) olarak verildi (Slinkard ve Singleton, 1977).

3.2.2. Toplam flavonoid madde tayini

Bitki özütlerdeki toplam flavonoid içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Buna göre %2'lik AlCl₃'ün metanolik çözeltisinden 1 ml alınarak aynı hacimde ve 2 mg/ml konsantrasyondaki bitki ekstraktı ile karıştırıldı. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbanı belirlendi. Aynı işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi.

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

3.3. Enzim İnhibisyonuna Yönelik Testler

3.3.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitesi (AChE ve BChE)

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

3.3.2. Amilaz inhibisyon aktivitesi

α - amilaz inhibitör aktivite Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Zengin ve ark., 2014). Mikrotipladaki kuyucuklara 25 µL örnek çözeltisi (2 mg/ml) ve fosfat tamponunda (pH 6.9, 6 mM sodyum klorür) hazırlanmış 50 µL α - amilaz çözeltisi eklendi ve 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra inkübe edilmiş örneklere % 0.05'lik 50 µL nişasta çözeltisi ilave edildi. Benzer şekilde, α - amilaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Karışım 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. 1 M 25 µL HCl ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve bunu takiben 100 µL iyot-potasyum iyodür çözeltisi eklendi. Örnek ve körlerin absorbansları 630 nm'de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. α - amilaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğeri olarak hesaplandı (mmolAKAE/g).

3.3.3. Glukozidaz inhibisyon aktivitesi

Mikrotipladaki kuyucuklara 50 µL örnek çözeltisi (2 mg/ml), 50 µL glutatyon, fosfat tamponunda çözünmüş 50 µL α - glukozidaz çözeltisi ve 50 µL PNPG (4-p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid) eklenerek 37 °C de 10 dakika inkübe edildi. Benzer

şekilde, α -glukozidaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Reaksiyon 0.2 M 50 μ L sodyum karbonat konularak tamamlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 400 nm'de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri akarboza eşdeğer olarak hesaplandı (mmolAKAE/g) (Palanisamy ve ark., 2011).

3.3.4. Tirozinaz inhibisyon aktivitesi

Tirozinaz inhibitör aktivite L-DOPA 'nın substrat olarak kullanıldığı dopachrome yöntemi ile ölçülmüştür. Mikroplakadaki kuyucuklara 25 μ L örnek çözelti, 40 μ L tirozinaz çözeltisi ve 100 μ L fosfat tamponu (pH 6.8) eklendi. Bu karışım 25 °C 15 dakika bekletildikten sonra 40 μ L L-DOPA konuldu. Benzer şekilde, tirozinaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek çözeltisi eklenerek kör hazırlandı. Örnek ve körlerin absorbansları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 492 nm de okundu. Körlerin absorbansları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi. Tirozinaz inhibitör aktiviteleri kojik asite eşdeğer olarak hesaplandı (mgKAE/g) (Orhan ve ark., 2014).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *Dianthus calocephalus* özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri

Fenolik bileşikler oksidatif stres ile ilişkili hastalıklarda sağlığa faydalı etkilerinden dolayı büyük önem kazanmıştır. Günümüze kadar, bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için etkili tek bir yöntem geliştirmek; geleneksel ekstraksiyon yöntemlerindeki sınırlamalardan dolayı bir sorun olmuştur. Fakat günümüzde fenolik bileşiklerin çeşitli ticari seviyelerde kullanımı bilim insanlarını daha etkili modern ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine yönlendirmiştir (Ameer ve ark., 2017). Son yıllarda geliştirilmiş olan modern ekstraksiyon teknikleri bitki materyallerinden fenoliklerin elde edilmesini optimize etmek için uygulanmaktadır. Çözücü türü ve ekstraksiyon metotları özütlerin etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle çözücü tipi seçimi ve ekstraksiyon metodu bitkilerden özütlerin hazırlanmasında çok önemli bir adımdır. Bu tez çalışmasında *Dianthus calocephalus*'un özüt verimlerini, toplam fenolik ve flavonoid içeriklerin belirlemek için üç farklı solvent (etil asetat, metanol ve su) ve ekstraksiyon metodu (maserasyon, sokslet ve ultrasonikasyon) kullanılmıştır.

Bu çalışmada, ekstraksiyon metodlarının ve farklı çözücülerin özütleme verimleri üzerine etkileri araştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.1 de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, en yüksek verim sokslet metodunda görülmüştür. Tüm metodlarda en düşük verim etil asetat özütlerinde gözlenmiştir. Bu durum çalışılan *D. calocephalus*'un polar bileşiklerden zengin buna karşın apolar bileşikler bakımından fakir olduğunu göstermektedir.

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam fenolik içeriği, metanol (39.35 mgGAE/g) > etil asetat (33.08 mgGAE/g) > su (26.47 mgGAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam fenolik içerik su özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam fenolik içeriği, metanol (40.04 mgGAE/g) > su (33.27 mgGAE/g) > etil asetat (27.95 mgGAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam fenolik içerik etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Ultrasonikasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam fenolik içeriği, metanol (40.25 mgGAE/g) > su (37.55 mgGAE/g) > etil asetat (24.18

mgGAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam fenolik içerik etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam flavonoid içeriği, metanol (42.32 mgRE/g) > etil asetat (19.67 mgRE/g) > su (4.39 mgRE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam flavonoid içerik su özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.3).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam flavonoid içeriği, metanol (42.26 mgRE/g) > su (24.57 mgRE/g) > etil asetat (11.99 mgRE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam flavonoid içerik etil asetat özütünde görülmüştür (Tablo 4.3).

Ultrasonikasyon sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un toplam flavonoid içeriği, metanol (43.14 mgRE/g) > etil asetat (22.12 mgRE/g) > su (3.96 mgRE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en düşük toplam flavonoid içerik su özütünde görülmüştür (Tablo 4.3).

Genel olarak sonuçlara bakıldığında fenolik ve flavonoid içeriğin çözücü ve ekstraksiyon metoduna göre değiştiği görülmüştür (Şekil 4.1 ve 4.2). Üç ekstraksiyon metodu değerlendirildiğinde, metanol özütlerinin daha yüksek miktarda toplam fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Literatür taraması yapıldığında *Dianthus* ile aynı familyadan olan çeşitli bitkilerin fenolik ve flavonoid aktiviteleri çeşitli yazarlar tarafından rapor edilmiştir; *Stellaria media*'nın etanol özütünün toplam fenolik içeriği 2.29 mgGAE/g bitki olarak bulunmuş (Bordoloi ve ark., 2016). Farklı bir çalışmada aynı bitkiye ait su ve etanol özütlerinin toplam flavonoid içeriği sırasıyla 25.62 mg/g ve 63.93 mg/g olarak belirlenmiştir (Rogowska ve ark., 2017). *Paronychia mughlaei*'nin metanol ve su özütlerinin toplam fenolik içeriği sırasıyla 11.90 mgGAE/g ve 7.39 mgGAE/g olarak bulunmuştur (Albayrak ve Aksoy, 2010). *P. mughlae*'ye ait sonuçlar bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında tüm ekstraksiyon metodlarında *D. caryophyllus*'un daha yüksek fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada sokslet ve ultrasonikasyon metotlarında en düşük toplam fenolik içerik etil asetat özütlerinde tespit edilmiştir. Ye ve ark. (2015) tarafından *Helianthus annuus*'un antioksidan ve fenolik içerik üzerine çözücülerin etkisinin araştırıldığı çalışma bu sonucumuzu destekler niteliktedir. Maserasyon ekstraksiyon metoduna baktığımızda ise en düşük fenolik içerik su özütünde tespit edilmiştir ve bu bulgu Do ve ark. (2014) yaptıkları çalışma ile uyum göstermektedir.

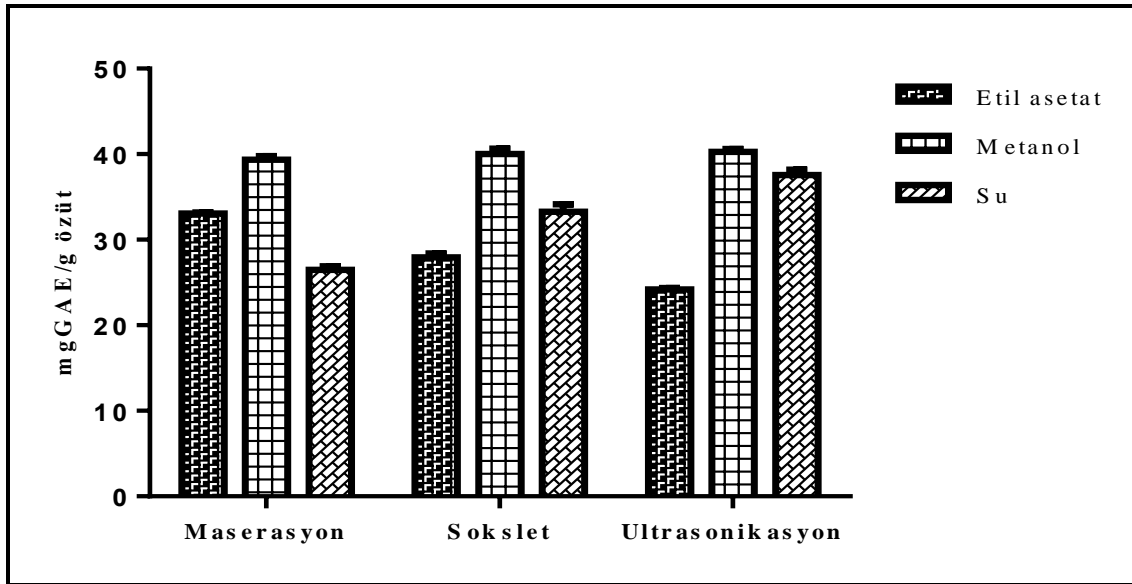
Tablo 4.1. *D. calocephalus*'un özüt verimleri

Metotlar	Çözücü	Verim (%)
Maserasyon	Etilasetat	1.64
	Metanol	9.46
	Su	6.89
Sokslet	Etilasetat	2.63
	Metanol	12.07
	Su	9.87
Ultrasonikasyon	Etilasetat	2.09
	Metanol	7.43
	Su	8.52

Tablo 4.2. *D. calocephalus*'un toplam fenolik içeriği

Metotlar	Çözücü	Toplam fenolik içerik (mgGAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	33.08±0.10*
	Metanol	39.35±0.44
	Su	26.47±0.42
Sokslet	Etilasetat	27.95±0.45
	Metanol	40.04±0.59
	Su	33.27±0.89
Ultrasonikasyon	Etilasetat	24.18±0.19
	Metanol	40.25±0.34
	Su	37.55±0.62

* Aritmetik ortalama±S.D. GAE: Gallik asit eşdeğeri.

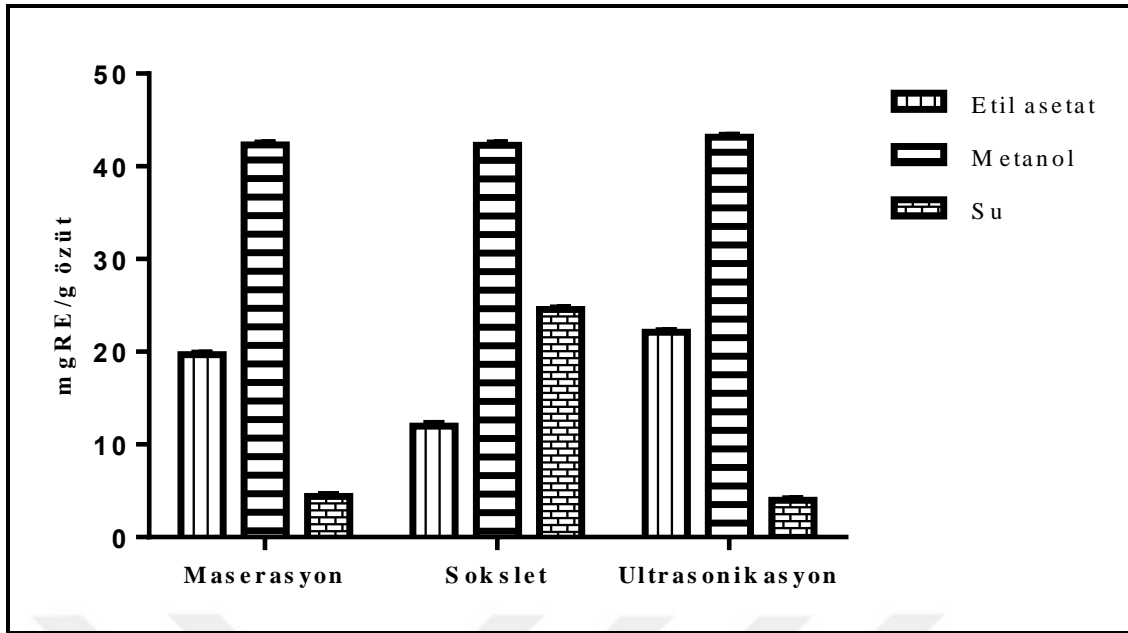


Şekil 4.1. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden toplam fenolik içeriğin karşılaştırılması

Tablo 4.3. *D. calocephalus*'un toplam flavonoid içeriği

Metotlar	Çözücü	Toplam flavonoid içerik (mgRE/g)
Maserasyon	Etilasetat	19.67±0.18*
	Metanol	42.32±0.19
	Su	4.39±0.21
Sokslet	Etilasetat	11.99±0.27
	Metanol	42.26±0.25
	Su	24.57±0.15
Ultrasonikasyon	Etilasetat	22.12±0.14
	Metanol	43.14±0.21
	Su	3.96±0.17

* Aritmetik ortalama±S.D.RE: Rutin eşdeğeri.



Şekil 4.2. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden toplam flavonoid içeriğinin karşılaştırılması

4.2. Kolinesteraz (AChE ve BChE) inhibitör aktivite

Alzheimer hastalığı nörodejeneratif bir hastalıktır (Kumar ve Singh, 2015) ve bu hastalığı tedavi etmede güncel eğilimler bu hastalıkların semptomlarının azaltılması yönündedir (Allgaier ve Allgaier, 2013; Schneider ve ark., 2014). Bu yüzden, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu Alzheimer hastalarının tedavisi için temel strateji olarak düşünülmektedir (Contestabile, 2011). Bu tez çalışmasında *D. calocephalus*'un kolinesteraz inhibitör aktivitesi farklı ekstraksiyon metodlar ve farklı çözücü kullanılarak asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerine karşı belirlenmiştir.

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, etil asetat (1.48 mgGALAE/g) > metanol (1.34 mgGALAE/g) > su (0.03 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek asetilkolinesteraz inhibitör aktivite etil asetat özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, etil asetat (1.45 mgGALAE/g) > metanol (1.44 mgGALAE/g) > su (0.46 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek asetilkolinesteraz inhibitör aktivite etil asetat özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Ultrasonikasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, etil asetat (1.48 mgGALAE/g) > metanol (1.42 mgGALAE/g) > su (0.43 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek asetilkolinesteraz inhibitör aktivite etil asetat özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, su (2.48 mgGALAE/g) > etilasetat (2.46 mgGALAE/g) > metanol (1.16 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite su özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, etil asetat (2.74 mgGALAE/g) > su (2.42 mgGALAE/g) > metanol (1.14 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite etil asetat özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Ultrasonikasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un bütirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi, su (2.49 mgGALAE/g) > etil asetat (2.44 mgGALAE/g) > metanol (1.13 mgGALAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek bütirilkolinesteraz inhibitör aktivite etil asetat özütünde belirlenmiştir (Tablo 4.5).

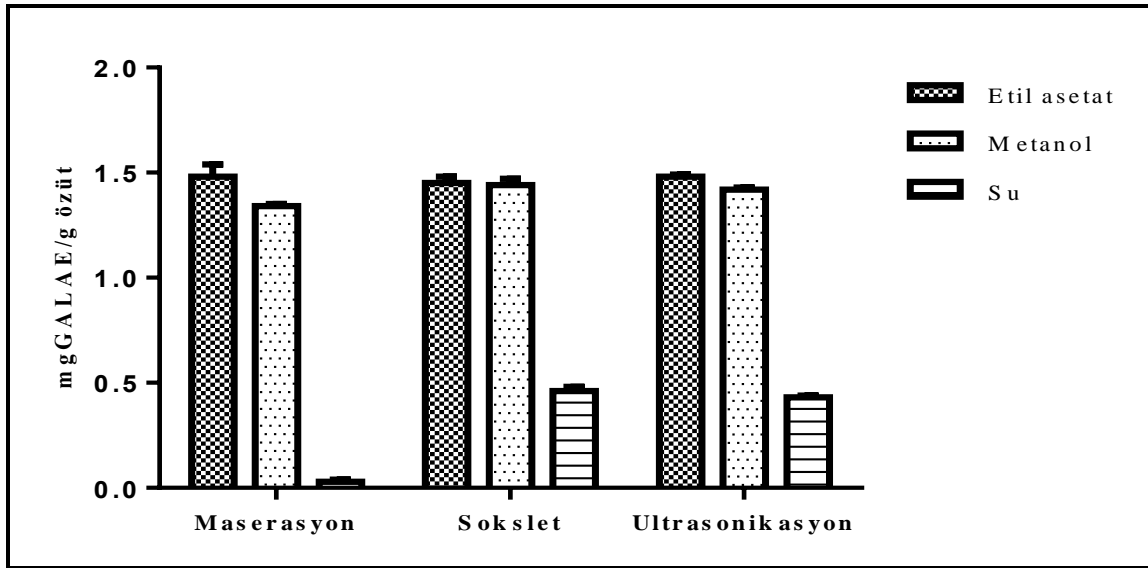
Literatüre baktığımızda bu tez çalışmasında kullandığımız *Dianthus* cinsinin farklı türlerinde kolinesteraz inhibisyonlarına yönelik herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Fakat *Dianthus* ile aynı familyadan farklı bitkilerin kolinesteraz aktiviteleri rapor edilmiştir. Örneğin, *Spergularia rubra*'nın hidrometanolik özütünün AChE (EC₂₅:3.68 mg/g) ve BChE (EC₂₅:4.29 mg/g) enzim inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir (Vinhole ve ark., 2011). Hajimehdipoor ve ark. (2016), İran'dan toplanan çeşitli bitkilerin antioksidan ve anti-kolinesteraz aktivitelerini üzerine yapılan çalışmalar içinde Caryophyllaceae familyasına ait bitkiler (*Acanthophyllum bracteatum*, *Gypsophila polyclada*, *Silene chlorifolia* ve *S. propinqua*) AChE enzimine karşı inhibitör aktivite göstermemiştir. Portekiz'den toplanan *Paronychia argentea*'nın (Caryophyllaceae) uçucu yağının, etanol ve su özütlerinin farklı konsantrasyonlarda AChE enzimine karşı inhibitör aktiviteleri belirlenmiştir. Su özütünde 0.5 mg/ml konsantrasyonda aktivite gözlenmezken, 1 mg/ml konsantrasyonda % 7.8 ve 5 mg/ml konsantrasyonda ise %26.1 inhibisyon aktivite gözlenmiştir. Su özütünde konsantrasyon

artıkça AChE enzim inhibisyon aktivitesin de arttığı gözlenmiştir. *P. argentea*'nın uçucu yağı ise 0.5 mg/ml de % 44.6 ve 1 mg/ml de % 49.5 aktivite göstermiştir. Etanol özütü ise 0.5 mg/ml konsantrasyonda %48.7 ile en yüksek aktiviteyi göstermiştir. (Ferreira ve ark., 2006). Çalışmamızdaki farklı ekstraksiyon metotları AChE enzim inhibitör aktivitesi açısından karşılaştırıldığında yakın sonuçlar gösterdiği görülmüştür. AChE enzim inhibitör aktivitesinde üç metot içinde en düşük aktivite su özütünde belirlenmiştir ve bu sonuç daha önce yapılan çeşitli çalışmalar tarafından desteklenmektedir (Badrul ve Ekramul, 2011; Zengin ve ark., 2014; Uysal ve Aktumsek, 2015). Sonuçlara göre, *D. caloccephalus* özütlerindeki non-polar bileşiklerin AChE enzim inhibitör aktiviteden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.4. *D. caloccephalus*'un asetilkolinesteraz inhibisyonu

Metotlar	Çözücü	Asetilkolinesteraz inhibisyonu (mgGALAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	1.48±0.06*
	Metanol	1.34±0.01
	Su	0.03±0.01
Sokslet	Etilasetat	1.45±0.03
	Metanol	1.44±0.03
	Su	0.46±0.02
Ultrasonikasyon	Etilasetat	1.48±0.01
	Metanol	1.42±0.01
	Su	0.43±0.01

* Aritmetik ortalama±S.D. GALAE: Galatamin eşdeğeri.

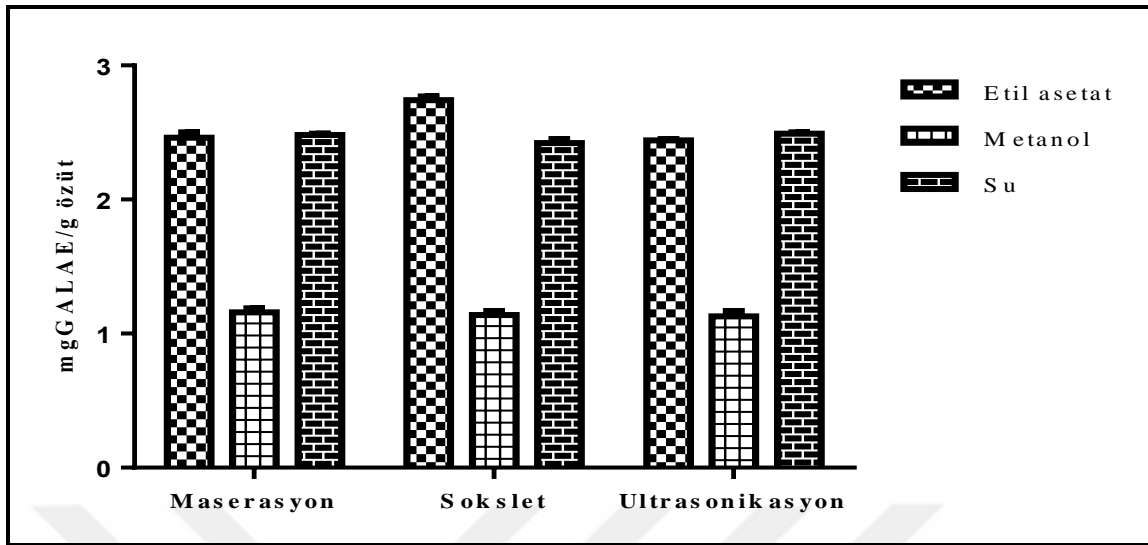


Şekil 4.3. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden asetilkolinesteraz inhibisyonunun karşılaştırılması

Tablo 4.5. *D. calocephalus*'un bütirilkolinesteraz inhibisyonu

Metotlar	Çözücü	Bütirilkolinesteraz inhibisyonu (mgGALAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	2.46±0.04*
	Metanol	1.16±0.03
	Su	2.48±0.01
Sokslet	Etilasetat	2.74±0.03
	Metanol	1.14±0.03
	Su	2.42±0.03
Ultrasonikasyon	Etilasetat	2.44±0.01
	Metanol	1.13±0.04
	Su	2.49±0.01

*Aritmetik ortalama±S.D. GALAE: Galatamin eşdeğeri.



Şekil.4.4. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden bütirilkolinesteraz inhibisyonunun karşılaştırılması

4.3. Antidiabetik aktivite (α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibitör aktivite)

Diabet ve onunla ilişkili komplikasyonların tedavisinde kan glukoz seviyesinin kontrolü önemlidir (Ortiz-Andrade ve ark., 2007). α -amilaz ve α -glukozidaz gibi karbohidrat metabolizmasına katılan enzimlerin inhibisyonu hipergliseminin azaltılmasında önemli bir terapötik yaklaşımdır (Kwon ve ark., 2007). Bu bağlamda bu tez çalışmasında α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri kullanılarak *D. calocephalus*'un farklı metotlara ve çözücüye bağlı olarak *in vitro* antidiabetik aktivitesi araştırılmıştır.

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (0.76 mmolACAE/g) > metanol (0.41 mmolACAE/g) > su (0.12 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.6).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (0.84 mmolACAE/g) > metanol (0.42 mmolACAE/g) > su (0.20 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.6).

Ultrasoniksasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (0.62 mmolACAE/g) > metanol (0.39 mmolACAE/g) > su (0.11 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.6).

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi, metanol (4.72 mmolACAE/g) > etil asetat (1.20 mmolACAE/g) > su (1.00 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi metanol özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.7).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi, metanol (5.51 mmolACAE/g) > su (2.48 mmolACAE/g) > etil asetat (0.88 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi metanol özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.7).

Ultrasonikasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi, metanol (5.84 mmolACAE/g) > etil asetat (2.42 mmolACAE/g) > su (0.36 mmolACAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesi metanol özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.7).

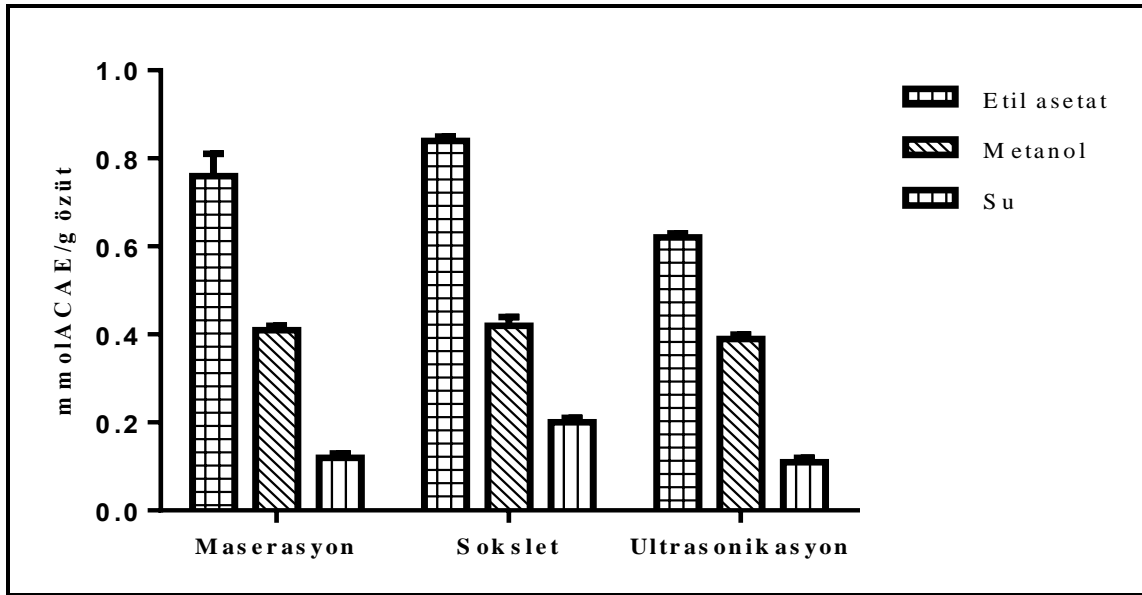
Çalışmamızın sonuçlar değerlendirildiğinde, α -amilaz enzim inhibitör aktivitesi tüm ekstraksiyon metodlarda etil asetat özütünde yüksek çıkmıştır (Tablo 4.5). α -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesine bakıldığında ise metanol özütü en yüksek inhibisyon aktiviteyi göstermiştir (Tablo 4.6). Genel olarak tüm metodlarda su özütlerinin düşük α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibitör aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Uysal ve Aktumsek, 2015; Llorent-Martínez ve ark., 2016). Kazeem ve Ashafa (2015) yaptıkları bir çalışmada Güney Afrika'da diabet tedavisi için kullanılan *Dianthus* cinsinden *D. basuticus*'un farklı özütlerinin *in vitro* antidiabetik aktivitesini α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerine karşı çalışmışlardır ve sonuçlar IC₅₀ olarak hesaplanmıştır. *D. basuticus* etanol özütü α -amilaz enzimine karşı güçlü inhibitör aktivite sergilemiştir (IC₅₀:34.02 μ g/ml). α -glukozidaz enzim inhibitör aktiviteye bakıldığında ise su özütü IC₅₀:6.59 μ g/ml değer ile en yüksek aktivite göstermiştir. Yine Caryophyllaceae familyasından olan *S. rubra*'nın hidrometanolik özütü doza bağlı olarak α -glukozidaz enzim inhibitör

aktivite göstermiştir (Vinholes ve ark., 2011). Afifi ve ark. (2005) Ürdün'de diabet tedavisinde geleneksel olarak kullanılan Caryophyllaceae familyasından *Paronychia argentea*'nın *in vivo* olarak antidiabetik aktivitesini belirlemişlerdir. Bu çalışmalar açıkça Caryophyllaceae üyelerinin diabet tedavisinde etkin doğal ajanlar yeni bakış açıları sağlayacak ve ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Bu noktadan hareketle, tez çalışmamız literatüre katkı sağlama açısından önem arz etmektedir.

Tablo 4.6. *D. calocephalus*'un α -amilaz inhibisyonu

Metotlar	Çözücü	Amilaz inhibisyonu (mmolACAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	0.76±0.05*
	Metanol	0.41±0.01
	Su	0.12±0.01
Sokslet	Etilasetat	0.84±0.01
	Metanol	0.42±0.02
	Su	0.20±0.01
Ultrasonikasyon	Etilasetat	0.62±0.01
	Metanol	0.39±0.01
	Su	0.11±0.01

*Aritmetik ortalama±S.D. ACAE: Akarboz eşdeğeri.

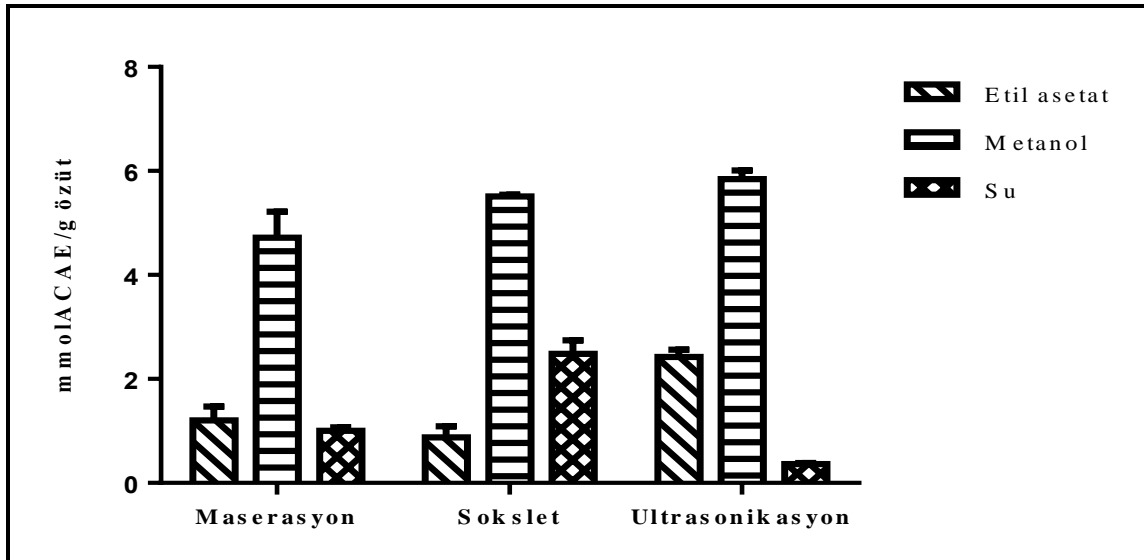


Şekil 4.5. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden α -amilaz inhibisyonunun karşılaştırılması

Tablo 4.7. *D. calocephalus*'un α -glukozidaz inhibisyonu

Metotlar	Çözücü	Glukozidaz inhibisyonu (mmolACAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	1.20±0.27*
	Metanol	4.72±0.50
	Su	1.00±0.07
Sokslet	Etilasetat	0.88±0.21
	Metanol	5.51±0.03
	Su	2.48±0.26
Ultrasonikasyon	Etilasetat	2.42±0.14
	Metanol	5.84±0.17
	Su	0.36±0.02

*Aritmetik ortalama±S.D. ACAE: Akarboz eşdeğeri.



Şekil 4.6. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden α -glukozidaz inhibisyonu karşılaştırılması

4.4. Tirozinaz inhibitör aktivite

Tirozinaz bakır içeren bir enzimdir ve melanin sentezinin anahtar enzimidir. Dolayısıyla tirozinaz inhibisyonu melanojeniz ve deri hastalıklarının kontrolünde önemli bir yaklaşımdır (Kim ve Uyama, 2005). Ayrıca tirozinaz inhibitörleri gıdaların esmerleşmesini azaltmak için kimyasal ajanlar olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2002; Lim ve ark., 2009). Bu bağlamda tez çalışmamızda *D. calocephalus*'un diğer enzim inhibitör aktivitelere ek olarak tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi de belirlenmiştir.

Maserasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (37.01 mgKAE/g) > metanol (36.41 mgKAE/g) > su (21.83 mgKAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.8).

Sokslet metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (40.48 mgKAE/g) > su (37.49 mgKAE/g) > metanol (36.24 mgKAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.8).

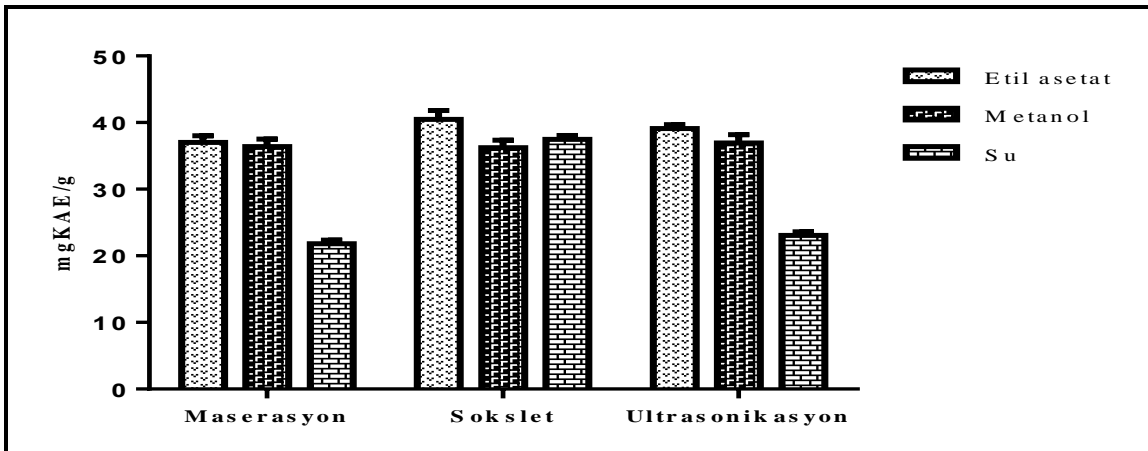
Ultrasonikasyon metodu sonuçlarına bakıldığında, *D. calocephalus*'un tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi, etil asetat (39.12 mgKAE/g) > metanol (36.94 mgKAE/g) > su (23.05 mgKAE/g) şeklinde sıralanmaktadır. Özütler karşılaştırıldığında en yüksek tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi etil asetat özütünde gözlenmiştir (Tablo 4.8).

Ekstraksiyon metotlarında gözlenen inhibisyon yetenekleri karşılaştırıldığında genel olarak etil asetat özütünün daha güçlü tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.7). Sonucumuz çeşitli çalışmalar tarafından desteklenmektedir (Uysal ve Aktumsek, 2015; Zengin ve ark., 2015). Literatür taraması yapıldığında *Dianthus* cinsi üzerine tirozinaz enzim inhibitör aktivite çalışması bulunmamaktadır.

Tablo 4.8. *D. calocephalus*'un tirozinaz inhibisyonu

Metotlar	Çözücü	Tirozinaz inhibisyonu (mgKAE/g)
Maserasyon	Etilasetat	37.01±1.02*
	Metanol	36.41±1.11
	Su	21.83±0.52
Sokslet	Etilasetat	40.48±1.33
	Metanol	36.24±1.10
	Su	37.49±0.57
Ultrasonikasyon	Etilasetat	39.12±0.56
	Metanol	36.94±1.26
	Su	23.05±0.57

*Aritmetik ortalama±S.D. KAE: Kojik asit eşdeğeri.



Şekil 4.7. *D. calocephalus*'un ekstraksiyon metodları ve çözücü yönünden α -glukozidaz inhibisyonu karşılaştırılması

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Dianthus cinsi astım, gastrointestinal bozukluklar ve öksürük gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte Türkiye’de *Dianthus* cinsinin enzim inhibitör aktiviteleri üzerine herhangi bir bilimsel veri bulunmamaktadır. Bu bağlamda tez çalışmamız büyük önem taşımaktadır ve ilk rapor niteliğindedir. Bu çalışmada *D. calocephalus*’un çeşitli enzim inhibitör aktiviteleri üç farklı metot (maserasyon, sokslet ve ultrasonikasyon) ve çözücü (etil asetat, metanol ve su) kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca *D. calocephalus*’un fenolik ve flavonoid içerikleri de belirlenmiştir. *D. calocephalus*’un kolinesteraz inhibitör aktivitesi AChE ve BChE enzimlerine karşı belirlenmiştir. Antidiabetik aktivitesi ise α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca anti-tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi de belirlenmiştir. *D. calocephalus*’un ekstraksiyon verimi için en etkili metottun sokslet olduğu belirlenmiştir. Enzim inhibitör aktiviteleri için metotlar karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir ve sonuçlar çözücüye bağlı olarak farklılık göstermiştir. Genel olarak etil asetat ve metanol özütleri su özütüne kıyasla daha yüksek enzim aktivite göstermiştir.

5.2. Öneriler

Bu tez çalışmasında *D. calocephalus*’un enzim inhibitör aktivitesi ve fitokimyasal profili üzerine farklı metotların ve çözücülerin etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *D. calocephalus*’un önemli enzim inhibitör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, bitkisel türevli yeni enzim inhibitörlerinin tespitine önemli katkılar sağlayacaktır. Çalışmamızda kullandığımız maserasyon ve sokslet metotları geleneksel, ultrasonikasyon metodu ise modern ekstraksiyon metodudur. Geleneksel metotlar modern metotlarla karşılaştırıldığında aşırı zaman, örnek ve çözücü tüketiminden dolayı kapsamlı ve zahmetli oldukları rapor edilmiştir. Sonuç olarak, dünyada araştırmacılar bitkisel materyallerden fenoliklerin ekstraksiyonu için etkili sürdürülebilir modern teknikler ile ilgilenmektedirler. Modern ekstraksiyon teknikleri hızlı, kullanışlı, ekonomiktir. Bu bağlamda tez çalışmamız enzim inhibitörleri ve bunların ekstraksiyonları üzerine yapılacak gelecek çalışmalara başlangıç noktası olacak ve yeni ufuklar açacaktır.

KAYNAKLAR

- Afifi, F., Al-Khalidi, B. ve Khalil, E., 2005, Studies on the in vivo hypoglycemic activities of two medicinal plants used in the treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine following intranasal administration, *Journal of ethnopharmacology*, 100 (3), 314-318.
- Al-Rawi, A. ve Chakravarty, H., 1988, Medicinal plants of Iraq, Ministry of Agriculture & Irrigation, State Board for Agricultural & Water Resources Research, National Herbarium of Iraq, p.
- Albayrak, S. ve Aksoy, A., 2010, In vitro antioxidant and antimicrobial properties of *Paronychia mughlaei* Chaudhri, *Acta Botanica Gallica*, 157 (3), 411-418.
- Alberti, K. G. M. M. ve Zimmet, P. f., 1998, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation, *Diabetic medicine*, 15 (7), 539-553.
- Allgaier, M. ve Allgaier, C., 2013, An update on drug treatment options of Alzheimer's disease, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19, 1345-1354.
- Ameer, K., Shahbaz, H. M. ve Kwon, J. H., 2017, Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.
- Association, A. s., 2011, 2011 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7 (2), 208.
- Atlas, I. D., 2015, International Diabetes Federation, Brussels, 2015, Available from:[Last accessed: 5 March 2014].
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N. ve Omar, A., 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436.
- Badrul, A. ve Ekramul, H., 2011, Anti-alzheimer and antioxidant activity of *Celastrus paniculatus* seed, *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (1), 49-56.
- Berk, S., Tepe, B., Arslan, S. ve Sarikurkcu, C., 2011, Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC, *African Journal of Biotechnology*, 10 (44), 8902-8908.
- Bernfeld, P., 1955, [17] Amylases, α and β , *Methods in enzymology*, 1, 149-158.
- Bittrich, V., 1993, Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families, In: *The Families and Genera of Vascular Plants (Eds: K. Kubitzki, J. Rohwer, V. Bittrich)*. Springer Verlag, Berlin,, 2, 206-236.
- Bonjar, G. S., 2004, Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine, *Fitoterapia*, 75 (2), 231-235.
- Bordoloi, M., Bordoloi, P. K., Dutta, P. P., Singh, V., Nath, S., Narzary, B., Bhuyan, P. D., Rao, P. G. ve Barua, I. C., 2016, Studies on some edible herbs: Antioxidant activity, phenolic content, mineral content and antifungal properties, *Journal of Functional Foods*, 23, 220-229.
- Bourquelot, E. ve Bertrand, G., 1895, Le bleuissement et le noircissement des champignons, *CR Soc Biol*, 47, 582-584.
- Bown, D., 1995, Encyclopaedia of Herbs and their Uses, *Dorling Kindersley, London, UK.*, 424.

- Brookmeyer, R., Gray, S. ve Kawas, C., 1998, Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset, *American journal of public health*, 88 (9), 1337-1342.
- Cánovas, F. G., Garcia-Carmona, F., Sánchez, J. V., Pastor, J. ve Teruel, J., 1982, The role of pH in the melanin biosynthesis pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 257 (15), 8738-8744.
- Chakrabarti, R. ve Rajagopalan, R., 2002, Diabetes and insulin resistance associated disorders: disease and the therapy, *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-, 83 (12), 1533-1538.
- Chang, T.-S., 2009, An updated review of tyrosinase inhibitors, *International journal of molecular sciences*, 10 (6), 2440-2475.
- Chang, T.-S., 2012, Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity, *Materials*, 5 (9), 1661-1685.
- Chemat, F., Tomao, V. r. ve Viot, M., 2008, Ultrasound-assisted extraction in food analysis, In: Handbook of food analysis instruments, Eds: CRC press, p.
- Cheng, A. Y. ve Fantus, I. G., 2005, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus, *Canadian Medical Association Journal*, 172 (2), 213-226.
- Contestabile, A., 2011, The history of the cholinergic hypothesis, *Behavioural brain research*, 221 (2), 334-340.
- Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. ve Smit, N. P., 1997, Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 272 (42), 26226-26235.
- Crônicas, C., 2007, A microcirculação no diabetes: implicações nas complicações crônicas e tratamento da doença, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 51 (2), 204-211.
- Cunha, I., Sawaya, A. C., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Dreza, F. T., Povia, G. S. ve Carvalho, P. d. O., 2004, Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15 (6), 964-970.
- De Castro, M. L. ve Garcia-Ayuso, L., 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica chimica acta*, 369 (1), 1-10.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S. ve Ju, Y.-H., 2014, Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*, *Journal of food and drug analysis*, 22 (3), 296-302.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. ve Featherstone, R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical pharmacology*, 7 (2), 88IN191-9095.
- Espinoza-Fonseca, L. M., 2006, The benefits of the multi-target approach in drug design and discovery, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14 (4), 896-897.
- Farnsworth, N. R., Akerev, O. ve Bingel, A., 1985, The Bulletin of WHO, 63, 9865-9871.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. ve Araujo, M., 2006, The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, *Journal of ethnopharmacology*, 108 (1), 31-37.
- Funke, I. ve Melzig, M. F., 2006, Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (1), 1-5.

- Gaur, R., Sharma, A., Khare, S. ve Gupta, M. N., 2007, A novel process for extraction of edible oils: enzyme assisted three phase partitioning (EATPP), *Bioresource technology*, 98 (3), 696-699.
- Ghafoor, K., Hui, T. ve Choi, Y. H., 2011, OPTIMIZATION OF ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION OF TOTAL ANTHOCYANINS FROM GRAPE PEEL USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY, *Journal of Food Biochemistry*, 35 (3), 735-746.
- Gilchrest, B. A., 2011, Molecular aspects of tanning, *Journal of Investigative Dermatology*, 131, E14-E17.
- Gillbro, J. ve Olsson, M., 2011, The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches, *International journal of cosmetic science*, 33 (3), 210-221.
- Göke, B. ve Herrmann-Rinke, C., 1998, The evolving role of α -glucosidase inhibitors, *Diabetes/metabolism reviews*, 14 (S1), S31-S38.
- Hajimehdipoor, H., Ara, L., Moazzeni, H. ve Esmaeili, S., 2016, Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province, Iran, *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 3 (4), 1-7.
- He, L., 1998, Alpha-glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes, *Diabetes review*, 6, 132-145.
- Hebert, L. E., Weuve, J., Scherr, P. A. ve Evans, D. A., 2013, Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census, *Neurology*, 80 (19), 1778-1783.
- Hernández, Y., Lobo, M. G. ve González, M., 2009, Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple, *Food Chemistry*, 114 (2), 734-741.
- Herrera, M. ve De Castro, M. L., 2005, Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection, *Journal of Chromatography A*, 1100 (1), 1-7.
- Hikino, H., Ohsawa, T., Kiso, Y. ve Oshima, Y., 1984, Analgesic and Antihepatotoxic Actions of Dianosides, Triterpenoid Saponins of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* Herb, *Planta medica*, 50 (04), 353-355.
- Holzgrabe, U., Kapková, P., Alptüzün, V., Scheiber, J. ve Kugelmann, E., 2007, Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration, *Expert opinion on therapeutic targets*, 11 (2), 161-179.
- Hooper, D., McNair, J. B. ve Field, H., 1937, Useful plants and drugs of Iran and Iraq, Field Museum of Natural History, p.
- Huie, C. W., 2002, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373 (1), 23-30.
- Inzucchi, S. E., 2002, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review, *Jama*, 287 (3), 360-372.
- Jennings, W. G. ve Rapp, A., 1983, Sample preparation for gas chromatographic analysis, Hüthig Heidelberg, p.
- Kandra, L., 2003, α -Amylases of medical and industrial importance, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666, 487-498.
- Katzman, R., 1986, Alzheimer's disease, *New England Journal of Medicine*, 314 (964-973).

- Kaufmann, B. ve Christen, P., 2002, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical analysis*, 13 (2), 105-113.
- Kazeem, M. I. ve Ashafa, A. O. T., 2015, In-vitro antioxidant and antidiabetic potentials of *Dianthus basuticus* Burt Davy whole plant extracts, *Journal of Herbal Medicine*, 5 (3), 158-164.
- Kim, Y.-J. ve Uyama, H., 2005, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62 (15), 1707-1723.
- Kim, Y. M., Yun, J., Lee, C.-K., Lee, H., Min, K. R. ve Kim, Y., 2002, Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action, *Journal of Biological Chemistry*, 277 (18), 16340-16344.
- Kokil, G. R., Veedu, R. N., Ramm, G. A., Prins, J. B. ve Parekh, H. S., 2015, Type 2 diabetes mellitus: limitations of conventional therapies and intervention with nucleic acid-based therapeutics, *Chemical reviews*, 115 (11), 4719-4743.
- Krentz, A. J. ve Bailey, C. J., 2005, Oral antidiabetic agents, *Drugs*, 65 (3), 385-411.
- Kumar, A. ve Singh, A., 2015, A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update, *Pharmacological Reports*, 67 (2), 195-203.
- Kwon, Y.-I., Apostolidis, E., Kim, Y.-C. ve Shetty, K., 2007, Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management, *Journal of medicinal food*, 10 (2), 266-275.
- Lee, C.-H., Wu, S.-B., Hong, C.-H., Yu, H.-S. ve Wei, Y.-H., 2013, Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy, *International journal of molecular sciences*, 14 (3), 6414-6435.
- Lee, S. Y., Baek, N. ve Nam, T.-g., 2016, Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31 (1), 1-13.
- Lim, T., Lim, Y. ve Yule, C., 2009, Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species, *Food Chemistry*, 114 (2), 594-599.
- Lin, J. Y. ve Fisher, D. E., 2007, Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature*, 445 (7130), 843-850.
- Llorent-Martínez, E., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Guler, G., Mocan, A. ve Aktumsek, A., 2016, *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities, *RSC Advances*, 6 (92), 88996-89006.
- Loizzo, M., Tundis, R. ve Menichini, F., 2012, Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11 (4), 378-398.
- López-Expósito, I., Castillo, A., Yang, N., Liang, B. ve Li, X.-M., 2011, Chinese herbal extracts of *Rubia cordifolia* and *Dianthus superbus* suppress IgE production and prevent peanut-induced anaphylaxis, *Chinese medicine*, 6 (1), 35.
- Mansouri, S., 1999, Inhibition of staphylococcus aureus mediated by extracts from Iranian plants, *Pharmaceutical Biology*, 37 (5), 375-377.
- Martins, N. ve Ferreira, I. C., 2017, Neurocognitive Improvement Through Plant Food Bioactives: A Particular Approach to Alzheimer's Disease, In: *Food Bioactives*, Eds: Springer, p. 267-298.

- Mason, T., Paniwnyk, L. ve Lorimer, J., 1996, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics sonochemistry*, 3 (3), S253-S260.
- Mohammed, M. J. ve Al-Bayati, F. A., 2009, Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyianus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds, *Phytomedicine*, 16 (6), 632-637.
- Mosca, M., Boniglia, C., Carratù, B., Giammarioli, S., Nera, V. ve Sanzini, E., 2008, Determination of α -amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD, *Analytica chimica acta*, 617 (1), 192-195.
- Moteetee, A. ve Van Wyk, B., 2011, The medical ethnobotany of Lesotho: a review, *Bothalia*, 41 (1), 209-228.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L. ve Cox, M. M., 2008, Lehninger principles of biochemistry, Macmillan, p.
- Orhan, D. D., Senol, F. S., Hosbas, S. ve Orhan, I. E., 2014, Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant properties of *Viscum album* L. samples collected from different host plants and its two principal substances, *Industrial Crops and Products*, 62, 341-349.
- Ortiz-Andrade, R., Garcia-Jimenez, S., Castillo-Espana, P., Ramirez-Avila, G., Villalobos-Molina, R. ve Estrada-Soto, S., 2007, α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent, *Journal of ethnopharmacology*, 109 (1), 48-53.
- Palanisamy, U. D., Ling, L. T., Manaharan, T. ve Appleton, D., 2011, Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity, *Food Chemistry*, 127 (1), 21-27.
- Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Jetiyanon, K., Wittaya-areekul, S. ve Ingkaninan, K., 2007, Comparison of various extraction methods of *Bacopa monnieri*, *Naresuan Univ. J.*, 15 (1), 29-34.
- Pullaiah, T., 2006, Encyclopaedia of world medicinal plants, Daya books, p.
- Ramachandran, A., Das, A., Joshi, S., Yajnik, C., Shah, S. ve Kumar, K. P., 2010, Current status of diabetes in India and need for novel therapeutic agents, *J. Assoc. Physicians India*, 58, 7-9.
- Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., Varón, R. ve García-Cánovas, F., 1991, Kinetic study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1076 (3), 379-386.
- Rogowska, M., Lenart, M., Srećec, S., Ziaja, M., Parzonko, A. ve Bazylko, A., 2017, Chemical composition, antioxidative and enzyme inhibition activities of chickweed herb (*Stelaria media* L., Vill.) ethanolic and aqueous extracts, *Industrial Crops and Products*, 97, 448-454.
- Roseiro, L. B., Rauter, A. P. ve Serralheiro, M. L. M., 2012, Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease, *Nutrition and Aging*, 1 (2), 99-111.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. ve Latha, L. Y., 2011, Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8 (1).
- Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V., Mecocci, P., Pani, L. ve Winblad, B., 2014, Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014, *Journal of internal medicine*, 275 (3), 251-283.

- Segel, I. H. ve Segel, A. H., 1976, Biochemical calculations: how to solve mathematical problems in general biochemistry, Wiley New York:, p.
- Shin, I.-S., Lee, M.-Y., Ha, H., Jeon, W.-Y., Seo, C.-S. ve Shin, H.-K., 2012, Dianthus superbis fructus suppresses airway inflammation by downregulating of inducible nitric oxide synthase in an ovalbumin-induced murine model of asthma, *Journal of Inflammation*, 9 (1), 41.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (1), 49-55.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. ve Wortsman, J., 2004, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiological reviews*, 84 (4), 1155-1228.
- Slominski, A., Zmijewski, M. A. ve Pawelek, J., 2012, L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions, *Pigment cell & melanoma research*, 25 (1), 14-27.
- Smith, R. M., 2003, Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques, *Journal of chromatography A*, 1000 (1), 3-27.
- Stratford, M. R., Ramsden, C. A. ve Riley, P. A., 2013, Mechanistic studies of the inactivation of tyrosinase by resorcinol, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21 (5), 1166-1173.
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P. W., Brooks, H. B., Radding, J. A., McGee, J. ve Weidner, J., 2012, Mechanism of Action assays for Enzymes.
- Szumski, M. ve Buszewski, B., 2002, State of the art in miniaturized separation techniques, *Critical reviews in analytical chemistry*, 32 (1), 1-46.
- Thomas, N. V. ve Kim, S.-K., 2013, Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals, *Marine drugs*, 11 (1), 146-164.
- Thompson, S., Lanctôt, K. L. ve Herrmann, N., 2004, The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease, *Expert opinion on drug safety*, 3 (5), 425-440.
- Tocco, G., Fais, A., Meli, G., Begala, M., Podda, G., Fadda, M. B., Corda, M., Attanasi, O. A., Filippone, P. ve Berretta, S., 2009, PEG-immobilization of cardol and soluble polymer-supported synthesis of some cardol-coumarin derivatives: Preliminary evaluation of their inhibitory activity on mushroom tyrosinase, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19 (1), 36-39.
- Touger-Decker, R. ve Van Loveren, C., 2003, Sugars and dental caries, *The American journal of clinical nutrition*, 78 (4), 881S-892S.
- Tundis, R., Loizzo, M. ve Menichini, F., 2010, Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10 (4), 315-331.
- Uysal, S. ve Aktumsek, A., 2015, A phytochemical study on *Potentilla anatolica*: An endemic Turkish plant, *Industrial Crops and Products*, 76, 1001-1007.
- Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E. ve Van Weel, C., 2005, Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus, *The Cochrane Library*.
- Videira, I. F. d. S., Moura, D. F. L. ve Magina, S., 2013, Mechanisms regulating melanogenesis, *Anais brasileiros de dermatologia*, 88 (1), 76-83.
- Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P. B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., de Pinho, P. G. ve Ferreres, F., 2011, In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*, *Food Chemistry*, 129 (2), 454-462.

- Wang, L. ve Weller, C. L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300-312.
- Wang, L., Weller, C. L., Schlegel, V. L., Carr, T. P. ve Cuppett, S. L., 2008, Supercritical CO₂ extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles, *Bioresource technology*, 99 (5), 1373-1382.
- Wang, Z.-M., Cai, P., Liu, Q.-H., Xu, D.-Q., Yang, X.-L., Wu, J.-J., Kong, L.-Y. ve Wang, X.-B., 2016, Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 282-297.
- Whitcomb, D. C. ve Lowe, M. E., 2007, Human pancreatic digestive enzymes, *Digestive diseases and sciences*, 52 (1), 1-17.
- WHO., 1998, Medicinal plants in the republic of Korea. , *Regional Office for Western Pacific, World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland*, 1-93.
- Woisky, R. G. ve Salatino, A., 1998, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal of apicultural research*, 37 (2), 99-105.
- Yanovski, S. ve Yanovski, J., 2002, Drug Therapy: Obesity, *N. Engl. J. Med.*, 346, 5991-5602.
- Ye, F., Liang, Q., Li, H. ve Zhao, G., 2015, Solvent effects on phenolic content, composition, and antioxidant activity of extracts from florets of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Industrial Crops and Products*, 76, 574-581.
- Yoo, K.-Y. ve Park, S.-Y., 2012, Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics, *Molecules*, 17 (3), 3524-3538.
- Zemek, F., Drtinova, L., Nepovimova, E., Sepsova, V., Korabecny, J., Klimes, J. ve Kuca, K., 2014, Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine, *Expert opinion on drug safety*, 13 (6), 759-774.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R. ve Ceylan, O., 2014, A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes, *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.
- Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R. ve Aktumsek, A., 2015, Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study, *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6.
- Zygmunt, B. ve Namiesnik, J., 2003, Preparation of samples of plant material for chromatographic analysis, *Journal of chromatographic science*, 41 (3), 109-116.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hamiyet Ünüvar
Uyruğu : Türkiye
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya 22.08.1991
Telefon : 05072650902
Faks :
e-mail : hamiyetunuvar91@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Konya Merkez İmam Hatip Lisesi	2010
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2014
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2017
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR