

AYHAN ÜĞÜDEN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AMARANTHUS LİVİDUS L. TOHUMLARINDAN
HAZIRLANAN ETANOL EKSTRESİNİN VE HAM
EKSTREDEN SAFLAŞTIRILAN LEKTİNİN BAZI
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

AYHAN ÜĞÜDEN

**DANIŞMAN
PROF. DR. NURTEN ÖZSOY**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Tezimi, kaybettiğimden beri yokluğunu her an hissettiğim çınarım canım babama, desteğini hiç esirgemeyen ve hep yanımda olan canım annem, kardeşim ve tüm aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Tezimin konusunu veren, tez çalışmalarımı özenle yöneten, karşılaştığım güçlüklerin giderilmesinde yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmam boyunca bana kattığı tüm destekleri, öğrettikleri ve gelişmeye sağladığı katkılarından ötürü danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZSOY'a,

Tez çalışmam için gerekli olan bitki materyalini sağlayan Sayın Prof. Dr. Ayşe CAN'a,

Yüksek lisans eğitimimin ders aşamasında öğrettikleri ve katkıları için Sayın Prof. Dr. Nuriye Akev, Sayın Prof. Dr. Nurten Özsoy, Sayın Prof. Dr. Pınar Aksoy Sağırlı, Sayın Doç. Dr. Özlem KURT ŞİRİN, Sayın Doç. Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN'e,

Tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne ve bu vesile ile Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya ve Biyokimya Anabilim Dalı eski Başkanı Sayın Prof. Dr. Nuriye AKEV'e,

Yüksek lisans eğitimimdeki katkıları ve yardımları için Arş. Gör. Dr. Gözde HASBAL ÇELİKOK, Arş. Gör. Gülsüm ALTIPARMAK ÜLBEGİ, Arş. Gör. Gülşah Gamze ARCAN'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi tezim süresince de her konuda bana sonsuz destek olan ve sevgileriyle yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe.....	4
2.2. Bitki Lektinlerin Sınıflandırılması	6
2.2.1. <i>Agaricus bisporus</i> Aglutinin (ABA) Ailesi	7
2.2.2. Amarantin Domaini İçeren Lektinler	7
2.2.3. Sınıf V Kitinazla İlişkili Aglutininler (CRA)	9
2.2.4. Siyanovirin Domain İçeren Lektinler	9
2.2.5. Baklagıl Lektinleri	10
2.2.6. Hevein Domain İçeren Lektinler.....	10
2.2.7. <i>Nicotiana tabacum</i> Aglutinin (Nictaba).....	11
2.2.8. Risin-B Domaini Lektinleri	11
2.2.9. Jacalin İle İlgili Domain İçeren Lektinleri	12
2.2.10. <i>Galanthus nivalis</i> Domaini İçeren Aglutininler (GNA): Antitümöral Özellikleri Olan GNA İlişkili Lektin Ailesi Üyeleri.....	12
2.2.11. <i>Euonymus europaeus</i> Lektin (EUL) Domaini	13
2.3. Bitki Lektinlerin Aktiviteleri.....	14
2.3.1. Antikanser Aktivitesi	14
2.3.1.1. Apoptoz İndüksiyonu Yolu.....	14
2.3.1.2. Otofaji Aktivasyonu Yolu.....	18
2.3.1.3. Apoptoz ve Otofaji Arasındaki Bağlantı.....	20
2.3.1.4. Otofajiyi Düzenleyen Sinyal Yolları	22

2.3.1.4.1.	Otofaji ve Kanserde mTOR/PI3K/AKT Sinyal Yolu.	23
2.3.1.4.2.	Otofaji ve Kanserde AMPK (Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz) Sinyal Yolu.	25
2.3.1.4.3.	Otofaji ve Kanserde MAPK sinyal yolağı	26
2.3.1.4.4.	Otofaji ve Oksidatif Stres.....	27
2.3.1.4.5.	Bitki Lektinlerin Antikanser Aktiviteleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	28
2.3.1.5.	İmmunomodülatör Aktivite	33
2.3.1.6.	Antimikrobiyal Etki	36
2.4.	Amaranthus	36
2.4.1.	Tarihçe	36
2.4.2.	Kimyasal Bileşimi.....	37
2.4.3.	Kullanılışı.....	38
2.4.3.1.	Gıda Olarak	38
2.4.3.2.	Boya Olarak	38
2.4.3.3.	Etnobotanik Kullanılışı	38
2.4.4.	Biyolojik Aktiviteleri	39
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1.	Kullanılan Gereçler	41
3.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
3.3.	Bitki Materyali	43
3.4.	<i>A. lividus</i> Tohumlarından Hazırlanan Etanol Ekstrenin Hazırlanması	44
3.5.	Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi.....	44
3.5.1.	Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini	44
3.5.1.1.	Prensibi	44
3.5.1.2.	Yapılışı.....	45
3.5.1.3.	Gallik Asit Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	45
3.5.1.4.	<i>A. lividus</i> Tohumlarından Hazırlanan Etanol Ekstrenin Demir (III) - Askorbik Asit ile başlatılmış Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi.....	46
3.5.1.4.1.	Prensibi.....	46
3.5.1.4.2.	Kullanılan Çözeltiler.....	47
3.5.1.4.3.	Yapılışı.....	47

3.5.2. DPPH Radikali Giderici Aktivitesi Tayini.....	47
3.5.2.1. Prensibi	47
3.5.2.2. Kullanılan Çözeltiler	48
3.5.2.3. Yapılışı	49
3.6. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesi Tayini.....	49
3.6.1. Prensibi.....	49
3.6.2. Yapılışı	49
3.7. Troloks Ekvolan Antioksidan Kapasitesi (TEAC) Deneyi	50
3.7.1. Prensibi.....	50
3.7.2. Kullanılan Çözeltiler	50
3.7.3. Yapılışı	51
3.7.4. Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	51
3.8. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi.....	52
3.8.1. Prensibi.....	52
3.8.2. Kullanılan Çözeltiler	53
3.8.3. Yapılışı	53
3.8.4. FeSO ₄ .7H ₂ O Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	53
3.9. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibe Edici Aktivitenin İncelenmesi	54
3.9.1. Prensibi.....	54
3.9.2. Kullanılan Çözeltiler	55
3.9.3. Yapılışı	55
3.10. Siklooksijenaz (COX) İnhibe Edici Aktivitenin İncelenmesi.....	55
3.10.1. Prensibi.....	55
3.10.2. Yapılışı	56
3.10.3. Prostaglandin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi	57
3.11. İstatistiksel Değerlendirme	57
3.12. <i>A. lividus</i> Tohumlarından Lektin Elde Edilmesi	58
3.12.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması	58
3.12.2. <i>A. lividus</i> Tohum Lektinin % 50 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi.....	58
3.12.3. % 4'lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması	58
3.12.4. Hemaglutinasyon Aktivitesi Tayini	58

3.12.5. Lektinin Özgöl Karbonhidrat Biriminin Belirlenmesi - Hemaglutinasyon İnhibisyon Aktivitesi Testi.....	59
3.13. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	61
3.13.1. Prensibi.....	61
3.13.2. Kullanılan Çözeltiler.....	61
3.13.3. Yapılışı.....	61
3.13.4. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi.....	62
3.14. Siyanojen Bromür (CNBr) ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Affinite Kromatografisi.....	62
3.14.1. Prensibi.....	62
3.14.2. Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Jelin Hazırlanması..	63
3.14.3. Ligantın (Ovalbumin) Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz 4B Jeline Bağlanması.....	63
3.14.4. Jelde Açıkta Kalan Aktif Grupların Bloke Edilmesi ve Jel Yıkılması..	64
3.14.5. Lektinin Jele Bağlanması ve Kolondan Elüsyonu.....	64
3.15. Poliakrilamid Jel Elektroföresi.....	64
3.15.1. Denatüre Edici SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Tayini.....	65
4.BULGULAR.....	66
4.1. <i>A. lividus</i> Tohumlarından (ALT) Hazırlanan Etanol Ekstresinin Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması.....	66
4.1.1. ALT Ekstresinin Total Ekstre Edilebilen Madde ve Fenolik Bileşiklerin Miktarının İncelenmesi.....	66
4.1.2. ALT Ekstresinin Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi.....	66
4.1.3. DPPH Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi.....	67
4.1.4. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi.....	68
4.1.5. Troloks Ekvaleant Antioksidan Kapasitesinin İncelenmesi.....	69
4.1.6. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyelinin İncelenmesi.....	71
4.2. ALT Etanol Ekstresinin ve Lektinin Anti-Kolinerjik Etkisinin İncelenmesi....	73
4.3. ALT Etanol Ekstresinin ve Lektinin COX-1 ve COX-2 İnhibe Edici Etkisinin İncelenmesi.....	74
4.4. <i>A. lividus</i> Tohumlarından Hazırlanan Ham Ekstreden Lektinin Saflaştırılması..	75
5. TARTIŞMA.....	78
KAYNAKLAR.....	86

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	99
---------------------------------	----



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: ALT ekstresinin özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları.....	63
Tablo 4-1: ALT etanol ekstresinin içerdği total ekstre edilebilen madde (EC) ve gallik asit ekivalanı olarak fenolik bileşik (PC) miktarları.....	72
Tablo 4-2: ALT etanol ekstresinin ve standard olarak kullanılan α -tokoferolün, askorbik asid ve gallik asidin EC ₅₀ , TEAC ve FRAP değeri olarak ifade edilen antioksidant aktiviteleri.....	72
Tablo 4-3: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan galantaminin AChE inhibe edici aktiviteleri.....	73
Tablo 4-4: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan galantaminin BuChE inhibe edici aktiviteleri.....	73
Tablo 4-5: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan indometazinin COX-1 inhibe edici aktivitesi.....	74
Tablo 4-6: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan indometazinin COX-2 inhibe edici aktivitesi.....	74
Tablo 4-7: <i>A. lividus</i> tohumlarından (30 g) hazırlanan ham ekstreden lektinin elde edilme basamakları.....	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Bitki lektinlerinin yapısal çeşitliliklerine göre sınıflandırılması.....	6
Şekil 2-2: Aerolizin domain içeren amarantin benzeri proteinlerin moleküler modellenmesi.....	9
Şekil 2-3: RIP'lerin birincil yapı karşılaştırılması.....	12
Şekil 2-4: Karbonhidrat bağlama domain (CBD'ler) yoluyla ilgili şekerlerle etkileşime giren üç lektinin kristal yapısı.....	14
Şekil 2-5: Apoptoz mekanizmasında kullanılan yollar.....	17
Şekil 2-6: Otofajinin başlangıcı ve oluşumu.....	20
Şekil 2-7: Otofajinin sinyal yolu.....	22
Şekil 2-8: Otofaji ve kanserde mTOR/PI3K/Akt sinyal yolu.....	24
Şekil 2-9: Otofaji ve kanserde AMPK sinyal yolu.....	25
Şekil 2-10: Otofaji ve kanserde MAPK sinyal yolağı.....	26
Şekil 2-11: Apoptoz ve Otofajide ROS ile lipid peroksidasyonun indüklenmesi.....	28
Şekil 2-12: Apoptoz ve/veya otofajide yer alan seçilmiş bitki lektinleri sinyal yolları...	33
Şekil 2-13: İmmunomodülatör Aktivite.....	35
Şekil 2-14: Amaranthus türlerinin farmakolojik özelliklerinin in vitro ve in vivo çalışmalara dayalı şematik gösterimi.....	39
Şekil 3-1: Amaranthus lividus syn. blitum.....	44
Şekil 3-2: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	45
Şekil 3-3: TBA metodun prensibi.....	46
Şekil 3-4: Bir antioksidan tarafından DPPH'ın indirgenmesi.....	48
Şekil 3-5: ABTS ^{•+} 'nin antioksidan bileşikleriyle reaksiyonu.....	50
Şekil 3-6: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	52
Şekil 3-7: Bir antioksidan varlığında FRAP deneyin etki mekanizması.....	52
Şekil 3-8: FeSO ₄ .7H ₂ O standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	54
Şekil 3-9: Asetilkolin esterase aktivite tayininde kullanılan Ellman metodun prensibi...	54
Şekil 3-10: AChE ELISA'nın şematik gösterimi.....	56
Şekil 3-11: PG standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	57
Şekil 3-12: Hemaglutinasyon aktivitesi (HA) testi 10x ışık mikroskobu görünümü.....	60

Şekil 3-13: Hemaglutinasyon aktivitesi (HA) testi 40x ışık mikroskobu görünümü.....	60
Şekil 3-14: BCA içeren protein tahlili için reaksiyon şeması.....	61
Şekil 3-15: BSA standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	62
Şekil 4-1: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak lipid peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri.....	67
Şekil 4-2: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak DPPH radikal giderici aktivite yüzdeleri.....	68
Şekil 4-3: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak superoksit radikal giderici aktivite yüzdeleri.....	69
Şekil 4-4: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak ABTS radikal giderici aktivite yüzdeleri.....	70
Şekil 4-5: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak TEAC değerleri.....	71
Şekil 4-6: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak FRAP değerleri.....	71
Şekil 4-7: <i>A. lividus</i> tohumları ham ekstresi % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği.....	76
Şekil 4-8: ALT lektininin affinite kromatografisiyle elde edilen elüatın doğal poliakrilamid jel elektroforezindeki tek protein bandı.....	76
Şekil 4-9: ALT ham ekstreden affinite kromatografisi ile elde edilen lektin elüatının, standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak çalışılan SDS-PAGE'deki protein bandı..	77
Şekil 4-10: Standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemi....	77
Şekil 5-1: In vivo olarak ROS/lipid radikalleri ile antioksidanlar arasındaki etkileşim.	80
Şekil 5-2: XO tarafından reaktif oksijen türlerin oluşumu.....	82

KISALTMALAR LİSTESİ

AAT	: Aerolizin toksin alanı
Ab	: Beta amiloid
ABA	: <i>Agaricus bisporus</i> aglütini
ABTS	: 2,2-azinobis (3-etilbenzotiozin-6-sülfonik asit)
AChE	: Asetilkolin esteraz
AGE	: Glikozilasyon son ürünleri
AGG	: <i>Abrus precatorius</i> lektini
AH	: Alzheimer hastalığı
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
ALT	: <i>Amaranthus lividus</i> tohumları
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
AP-1	: Aktivatör protein-1
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APC	: Antijen sunan hücre
Atg	: Otofaji ile ilişkili protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BCA	: Bikinkoninik asit
Bcl-2	: B lenfosit tümör-2 gen
BFL	: GalNac-spesifik baklagil lektini
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
BuChE	: Butirilkolin esteraz
BUL	: <i>Bauhinia ungulate</i> lektini
BVL	: <i>Bauhinia variegata</i> lektini
CAD	: Kaspaz ile aktiflenen deoksiribonükleaz
CBD	: Karbonhidrat bağlama bölgesi
CLR	: C tipi lektin reseptör
CNBr	: Siyanojen bromür
CNS	: Merkezi sinir sistemi

ConA	: Concanavalin A
COX	: Siklooksijenaz
CRA	: Kitinazla ilişkili aglütinin
DEAE	: Dietilaminoetil
DISC	: Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
DLL	: <i>Dioclea lasiocarpa</i> lektini
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DS	: Down sendromu
DTNB	: 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
DVL	: <i>Dioclea violacea</i> lektini
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
EUL	: <i>Euonymus europaeus</i> lektini
FADD	: Fas ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death domain)
FasL	: Fas ligandı
FC	: Folin ciocalteu ayırıcı
FRAP	: Ferri iyonu redükleyici antioksidan potansiyeli
GAE	: Gallik asit ekivalanı
Gal	: Galaktoz
GalNAc	: N-asetilgalaktozamin
GlcNAc	: N-asetilglukozamin
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GNA	: <i>Galanthus nivalis</i> domaini içeren aglütinin
GSH	: Glutasyon indirgenmiş
IFN- γ	: İnterferon- γ
HB	: Hemaglutinasyon birimi
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
IAP	: Apoptoz protein inhibitörü
ICAD	: Kaspaz ile aktiflenen deoksiribonükleaz inhibitörü
IL	: İnterlökin
Keap	: Kelk benzeri ECH ile ilişkili protein 1
LIR	: LC3-etkileşim bölgesi
LC3B	: Mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3

LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LNL	: <i>Liparis noversa</i> lektini
LOO·	: Lipit peroksil radikali
MAPK	: Mitojenle etkileşen protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
MHC	: Histouyumluluk kompleksi
ML-I	: Ökseotu lektini
MPT	: Mitokondri geçirgen port
NAD	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NF-kB	: Nükleer faktör-kappa β
NK	: Doğal öldürücü hücre
NLR	: NOD benzeri reseptör
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NOD	: Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi
NOX	: NADPH oksidaz
NSAİD	: Non-steroidal antiinflamatuvar ilaç
OJL	: <i>Ophiopogon japonicus</i> lektini
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PAMP	: Patojenik ilişkili moleküler yapılar
PAS	: Preotofagozomal yapı
PBMC	: Periferik kan mononükleer hücreler
PCL	: <i>Polygonatum cyrtonema</i> lektini
PD	: Parkinson hastalığı
PG	: Prostaglandin
PHA	: Fitohemaglutinin
PI	: Fosfatidilinozitol
PI-3K	: Fosfatidilinozitol-3-kinaz
PI3P	: Fosfatidilinozitol trifosfat
PIDD	: P53 ile indüklenen ölüm bölgesi proteini
PIP ₂	: Fosfatidilinozitol bisfosfat
POL	: <i>Polygonatum odoratum</i> lektini

PRR	: Yapı tanıma reseptörü
RAIDD	: RIP ilişkili ölüm bölgesi (RIP associated death domain)
RIG	: Retinoik asit ile indüklenebilir gen
RIP	: Ribozom inhibitör protein
RLR	: Retinoik asit ile indüklenebilir gen (RIG)-I benzeri reseptör
RNA	: Ribonükleik asit
ROO·	: Peroksil radikalleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RVL	: <i>Remusatia vivipara</i> lektini
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SnCl ₂	: Kalay II klorür
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyoobarbitürik asit
TBARS	: Tiyoobarbitürik asit reaktif türleri
TCA	: Trikloroasetik asit
TEAC	: Troloks ekivalan antioksidan kapasitesi
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNB	: 5-Tiyo-2-nitrobenzoik asit
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TOPS	: Terminal oligopirimidin demeti
TPTZ	: Tripiridiltriadin
TRADD	: TNFR ilişkili ölüm bölgesi (TNFR-associated death domain)
Treg	: Timik düzenleyici hücreler
UBD	: Ubikitin bağlama alanı
ULK	: UNC-51 benzeri kinaz
UVRAG	: Ultraviyole ışınlama direnci ile ilişkili gen
VCA	: Kore ökse otu lektini
WGA	: Buğday tohumu aglutini
XIAP	: X'e bağlı apoptoz protein inhibitörü
XO	: Ksantin oksidaz

ÖZET

Üğüden, A. (2022). *Amaranthus Lividus* L. Tohumlarından Hazırlanan Etanol Ekstresinin ve Ham Ekstreden Saflaştırılan Lektinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Bu çalışmada, ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesinde “darı mancarı” olarak bilinen ve halk arasında yiyecek olarak kullanılan bir bitki olan *Amaranthus lividus* L. tohumlarından hazırlanan etanol ekstresinin lipozomların peroksidasyonunu inhibe edici, radikal giderici aktivitesi ile redükleme gücü, α -tokoferol, askorbik asit ve doğal bir polifenolik bileşik olan gallik asidin etkisi ile karşılaştırılarak incelendi ve ekstrenin antioksidan etkiye sahip olduğu görüldü. Ayrıca ekstrenin in vitro AChE, BuChE, COX-1 ve COX-2 inhibe edici aktiviteleri incelenerek Alzheimer hastalığı, inflamasyon ve kanser tedavilerine yönelik potansiyel bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

A. lividus tohumlarından hazırlanan ham ekstresinden amonyum sülfat ile çöktürme ve affinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak lektin 11,8 kez saflaştırıldı ve her monomerin molekül ağırlığı denatürasyon ve indirgeme koşullarında yapılan SDS poliakrilamid jel elektroforezinde 34 kDa olarak belirlendi.

Sonuç olarak, bu araştırmanın sonuçları, *Amaranthus lividus* L. tohumlarının fenolik bileşikler ve lektin gibi sağlık için faydalı olan bileşenler içerdiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus lividus* tohumları, Antioksidan, Anti-inflamatuar, Lektin, Affinite kromatografisi

ABSTRACT

Uguden, A. (2022). Some Biological Activities of Ethanol Extract of *Amaranthus Lividus* L. Seeds and the Lectin Purified from the Crude Extract. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry Master Thesis, Istanbul.

In this study, the ethanol extract prepared from seeds of *Amaranthus lividus* L., locally known as “dari mancari” and one of the most popular leafy vegetable consumed in West Black Sea Region of Turkey, was tested *in vitro* for its ability to inhibits peroxidation of liposomes, scavenges radicals and reducing power in comparison with α -tocopherol, ascorbic acid and gallic acid, a natural polyphenolic compound. It was found that the extract possess the antioxidant activity. The extracts was tested also for its *in vitro* inhibitory effects against AChE, BuChE, COX-1 and COX-2 activities. It was concluded that the extract may provide treatment options for Alzheimer’s, inflammation-mediated and cancer diseases.

The lectin from *A. lividus* seeds crude extract was purified to homogeneity by ammonium sulphate fractional precipitation and affinity chromatography. The enzyme was purified approximatedly 11.8 fold over the crude extract. The molecular weight of the each monomer was calculated as 34 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing and reducing conditions.

Consequently, the results of this investigation showed that the seeds of *Amaranthus lividus* L. contained a rich amount of valuable ingredients like phenolic compounds and lectin that are beneficial for health.

Keywords: *Amaranthus lividus* seeds, Antioxidant, Anti-inflammatuar, Lectin, Affinity chromatography

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lektinler, doğada bitkiler, mikroorganizmalar, hayvanlar ve insanlarda bulunan, immün kaynaklı olmayan, monosakkaritleri ve oligosakkaritleri geri dönüşümlü olarak bağlayan proteinlerdir (glikoproteinler). Lektinlerin tarihi, yaklaşık 130 yıl önce *Ricinus communis* L. tohumlarından çok toksik olan, hemaglutinasyon aktivitesi gösteren ve ilk lektin olarak tanımlanan risinin keşfiyle başlamıştır ve o zamandan beri lektinler hakkındaki bilgilerimiz çarpıcı bir şekilde değişmiştir. Yıllar geçtikçe araştırma odağı "karbonhidrat bağlayıcı proteinlerin karakterizasyonundan" "lektinlerin biyolojik işlevini anlamaya" kaydırılmıştır. Bitki lektinleri, özellikle biyomedikal araştırma potansiyelleri ve ayrıca glikobiyolojide araç olarak uygulanmaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Günümüzde, bitki lektinlerin immunosupresif, sitotoksik ve mitojenik aktivite gibi biyolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle immünoloji, hücre biyolojisi ve kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Tsaneva ve van Damme, 2020).

1960'ların başında yapılan iki büyük keşif, lektinleri ilgi odağı haline getirmiştir. Bunlardan ilki, fitohemaglutinin (PHA) olarak bilinen kırmızı barbunya fasulyesinin (*Phaseolus vulgaris*) lektininin mitojenik olduğunu, yani lenfositleri mitoz geçirmek için uyarma yeteneğine sahip olduğunu bulan Pennsylvania Üniversitesi'nden Peter C. Nowell tarafından yapılmıştır (Sharon ve Lis, 2004). Bu keşif, immünoloji üzerinde devrim niteliğinde bir etki yaratmıştır, çünkü o zamana kadar lenfositlerin bölünemeyen veya farklılaşamayan hücreler olduğu görüşünü geçersiz kılmıştır. Kısa bir süre içinde, diğer birçok lektinin mitojenik olduğu kanıtlanmıştır. Daha sonra PHA'nın aksine, konkanavalin A'nın mitojenik aktivitesi, mannoz gibi düşük monosakkarit konsantrasyonları tarafından inhibe edildiği buluşu özel bir önem taşımıştır, çünkü bu bulgu, mitojenik stimülasyonun, lektinlerin lenfositlerin yüzeyindeki şekerlere bağlanmasının bir sonucu olduğuna dair kanıt sağlamıştır ve hücre yüzeyi şekerlerinin önemli biyolojik rolü olabileceği ileri sürmüştür. Mitojenik lektinler kısa sürede hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminin incelenmesi ve *in vitro* lenfosit stimülasyonu sırasında meydana gelen biyokimyasal olayların analizinde kullanılabilecekleri anlaşılmıştır.

İkinci keşif ise Boston'daki Massachusetts General Hospital'dan Joseph C. Aub tarafından yapılmıştır (Aub ve ark., 1963; Aub ve ark., 1965). Buğday tohumu aglutinininin (WGA) kötü huylu hücreleri tercihen aglutine etme yeteneğine sahip

olduğu bulunmuştur. Daha sonra konkanavalin A ve soya fasulyesi lektininin de aynı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu araştırmalar, hücre yüzeyi şekerlerindeki değişikliklerin kanser gelişimi ile ilişkili olduğuna dair erken kanıtlar sağlamıştır ve lektinler tarafından aglütinasyona karşı yüksek duyarlılığın tüm habis hücrelerin ortak özelliği olduğu varsayımına yol açmıştır. Bu nedenle son yıllarda, kanser araştırmalarda, lektinlerin biomarker olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar artmıştır (Hashim ve ark., 2017).

Bitki lektinleri, biyomedikal araştırma, teşhis ve tedavide uygulama alanı bulmuştur ve immünolojinin gelişiminde çok önemli bir rol oynamıştır. Çok sayıda çalışma, bitki lektinlerinin mitojenik veya apoptotik etkilere sahip olduğunu, inflamasyonu aktive edebileceğini veya baskılayabildiğini, tümörlerin büyümesini engelleyebildiğini, patojenlerin, virüslerin ve parazitlerin enfeksiyonuna karşı savaşılabildiğini veya yara iyileşmesini kolaylaştırdığını rapor etmişlerdir. Birçok bitki lektini, insan hücrelerine karşı mitojenik etkiler gösteren immünomodülatör ajanlar olarak bilinmektedir. Lektinler, yardımcı T hücreleri indükleyerek interlökinler, interferon- γ (IFT- γ) veya tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) seviyelerini ve farklı kinazların ekspresyonunu etkileyebildikleri bildirilmiştir. Bitki lektinlerinin kanser tanı ve tedavisinde kullanımı günümüzde en çok araştırılan konulardan biridir (Lagarda-Diaz ve ark., 2017; Coelho ve ark., 2017; Poiroux ve ark., 2017).

Lektinlerin ilaçlara bağlanması, lipozomlar veya nanopartiküller yoluyla doğrudan kimyasal kullanım veya uygulamaya kıyasla daha spesifik hedefleme ve dağıtımına izin veren, kanser hücrelerinin apoptozuna ve hücre ölümüne yol açabilen immünotoksinlerin ve ligand hedefli toksinlerin yaratılmasına yol açmıştır (Liu ve ark., 2010a; Bhutia ve ark., 2019). Bazı bitki lektinleri, kemoterapi sırasında adjuvan olarak başarıyla kullanıldıkları ve bu terapilerin yan etkisinin azalmasına neden oldukları bildirilmiştir. Bitki lektinleri ayrıca *in vitro* ve *in vivo* olarak apoptoz veya otofaji olaylarını, bir toksin veya lektine bağlı bir kimyasalın yokluğunda bile tetikleyebildikleri rapor edilmiştir (Jiang ve ark., 2015).

Bitki lektinleri, bakterilerin girişini, enfeksiyonunu, adezyonunu veya göçünü engellemek ve mikrobiyal büyümenin inhibisyonu gibi farklı yollarla antimikrobiyal aktivite gösterdikleri görülmüştür. Birçok lektin, gram pozitif veya gram negatif bakterilerin hücre duvarı bileşenlerinden olan teikoik ve teikronik aside veya peptidoglikanlar, lipopolisakkaritler, muramik veya N-asetilmuramik asitler ve muramil

dipeptidlere bağlanabildikleri rapor edilmiştir. Lektinlerin antiviral özellikleri ise özellikle HIV ve koronavirüslere karşı tedavide büyük ilgi görmüştür (Keyaerts ve ark., 2007; François ve ark., 2012; Coelho ve ark., 2018).

Lektinler, modern glikobiyoloji araştırmalarında güçlü araçlardır. Özellikle bitki lektinleri, birçok glikokonjugat çalışmasına katkıda bulunarak, protein karbonhidrat etkileşimlerini içeren süreçlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Lektin kavramı, lektinoloji alanının gelişmesi ve yeni bulguların birikmesi ile yavaş yavaş gelişmiştir (Tsaneva ve Van Damme, 2020).

Amaranthus türü, yüzyıllardır halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılan önemli bir geleneksel bitkidir. Amaranthus türlerinin tohumları alternatif bir doğal lif kaynağıdır, ayrıca önemli miktarda antosiyaninler, polifenoller, vitaminler ve skualen, içerdiği ve antioksidan etkileri adı geçen antioksidanlardan ileri geldiği bildirilmiştir (Pasko ve ark. 2007). Polifenol bakımından zengin Amaranthus bazlı diyet, birçok kronik hastalık durumuna karşı önemli koruma sağlayabilir. Gluten içermemesi, kaliteli protein ve doymamış yağ asitlerinin oranı yüksek olması, gıda takviyesi olarak avantajlarından biridir (Alvarez-Jubete ve ark., 2009).

Amaranthus türlerinin farmasötik endüstrilerinde tıbbi kullanımları hakkında mevcut bilgiler, tıbbi özelliklere sahip biyoaktif bileşiklerin ayrılması ve karakterizasyonuna daha fazla önem verilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde Batı Karadeniz Bölgesinde “darı mancarı” olarak bilinen ve halk arasında yiyecek olarak kullanılan bir bitki olan *Amaranthus lividus* L. tohumlarından, amonyum sülfatla çöktürme ve affinite kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılan, poliakrilamid jel elektroforezi ile saflığı kontrol edilen lektinin molekül ağırlığının ve şeker inhibisyon deneyleri ile lektine spesifik olan bir karbohidrat biriminin tespit edilmesi, ayrıca hazırlanan etanol ekstresi ile beraber antioksidan, asetilkolinesteraz ve siklooksijenaz enzimleri üzerinde inhibe edici etkileri incelenerek nörodejeneratif hastalıkları, inflamasyon ve kanser tedavisine yönelik olarak potansiyel kullanılışları bilimsel veriler ışığında değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

19. yüzyılın sonlarına doğru, doğada eritrositleri aglutine etme yeteneğine sahip proteinlerin varlığına dair kanıtlar birikmeye başlamıştır (Sharon ve Liz, 2004). 1888'de Stillmark, hint fasulyesi tohumlarından (*Ricinus communis* L.) oldukça toksik bir protein olan ve 'risin' olarak adlandırılan lektini rapor etmiştir. Risin hakkındaki ilk rapordan on yıl sonra Elfstrand, kırmızı kan hücrelerinin hemaglutinasyonuna veya aglutinasyonuna neden olan tüm proteinleri tanımlamak için 'aglutinin' terimini tanıtmıştır. Aynı yıl Ehrlich, fare modellerinde öldürücü olmayan dozlarda risin ve abrin kullanarak immünolojideki bazı temel ilkelerini, yani bağışıklık cevabın özgüllüğünü, farklı antijenlere karşı bir immünolojik belleğin varlığını ve annenin hamilelik sırasında ve süt yoluyla antikorları transfer etme yeteneğini keşfetmiştir. Risinin 1978 yılında, Bulgar muhalif yazar ve sürgündeki yayıncı ve politik eleştirmeni Georgi Markov'un “şemsiye cinayetinde” bir silah olarak kullanılmasının ardından birçok insan risin hakkında bilgi sahibi olmuştur. Özellikle Hint yağı bitkisinde (gene otu) var olan risin proteininin de eski zamanlardan beri aşırı derecede toksik olduğu kayıtlarda yer almaktadır. I. Dünya Savaşı sırasında Amerika Birleşik Devletleri tarafından potansiyel bir savaş silahı olarak risinin kullanma girişimleri gerçekleştirilmiştir. I. Dünya Savaşı sırasında İngiliz ordusu tarafından bir risin bombası geliştirilmiş ve test edilmiş, ancak hiçbir zaman kitle imha silahı olarak kullanılmamıştır. Landsteiner ve Raubitschek (1907), *Pisum sativum* (bezelye), *Vicia sativa* (fiğ), *Lens culinaris* (mercimek) ve *Phaseolus vulgaris* (fasulye) gibi baklagil tohumlarından izole edilen tüm aglutinasyon proteinlerinin toksik olmadığını ileri sürmüşlerdir. 1919'da Sumner, jack bean (*Canavalia ensiformis*) tohumlarından saflaştırılan konkanavalin A (ConA) lektinin kan veya maya hücrelerini aglutine etme ve çözelti içinde glikojen, amilopektin ve dekstranları çökeltme yeteneğini tanımlamıştır. Birkaç yıl sonra, iki bağımsız araştırma grubu, bitki proteinlerinin hemaglutinasyon aktivitesinin, kan hücrelerinin tipine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebileceğini keşfetmiştir (Sumner, 1919; Sumner, 1936; Sharon ve Lis, 2004). Bu bulgu, lektinler tarafından hücre kümelenmesinin nasıl elde edilebileceğini çözmeyi mümkün kıldığı için lektinolojide bir dönüm noktası olarak kabul edilmiştir. Watkins ve Morgan (1952), lektinolojiyi ve proteinlerin

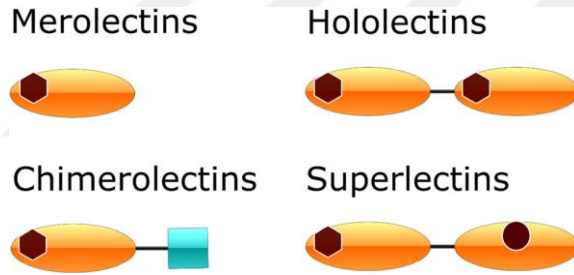
hemaglutinasyon özelliklerinin anlaşılmasını temelden değiştiren bir başka önemli keşif yapmışlardır. Bu araştırmacılar, her kan grubu eritrositler için spesifik şekerlerin eklenmesinin, lektinlerin neden olduğu aglutinasyonu engelleyebileceğini göstermişler. Bu şekilde lektinlerin aglutinasyon aktivitesinin, kırmızı kan hücrelerinin hücre yüzeyindeki karbonhidrat yapılarının tanınmasına ve bağlanmasına dayandığı keşfedilmiş ve kanıtlanmıştır. Bu çalışma ayrıca hücre yüzeyinde karbonhidratların varlığını, hücre tanımadaki rollerini ve hücre belirteçleri olarak kullanılma potansiyellerini ortaya çıkarmıştır. Kısa bir süre sonra, hemaglutinin terimi, proteinin “seçme” yeteneğini ifade eden Latince “legere” fiilinden türetilen “lektin” terimi ile değiştirilmiştir.

Agrawal ve Goldstein (1965), ConA'nın Sephadex matrikslerinin ana bileşeni olan dekstranlara bağlanma özelliğini kullanarak lektin saflaştırması için afinite kromatografisi yöntemini geliştirmişlerdir. 1970'lerde ConA'nın birincil dizisi ve üç boyutlu yapısı, iki araştırma grubu tarafından bağımsız olarak aydınlatılmıştır. Buğday tohumu aglutinininin (WGA) ligandlarıyla kompleks halindeki üç boyutlu yapısı, lektinler arasındaki yapısal çeşitliliğini göstermiştir. 1970'lerden beri mevcut olan saflaştırma protokollerin iyileştirilmesi ve rekombinant DNA teknolojinin geliştirilmesiyle, araştırmalar lektinlerin moleküler karakterizasyonuna, üç boyutlu yapılarına ve karbonhidrat bağlayıcı proteinlerin biyolojik rollerine odaklanmıştır. 1983 yılında ilk olarak soya fasulyesi lektin dizisi klonlanmıştır. 1980 yılında Goldstein, lektinleri “hücreleri aglutine eden ve/veya glikokonjugatları çökelten, immün olmayan karbonhidrat bağlayıcı proteinler (veya glikoproteinler)” olarak tanımlamıştır (Goldstein ve ark., 1980). Bu tanım, monovalent, aglutinasyon yapmayan ve kimerik lektinleri hariç tutmuştur. Bu nedenle Kocourek ve Horejsi (1983), lektin kavramını "Lektinler, tanınan herhangi bir glikozil ligandının kovalent yapısını değiştirmeden kompleks karbonhidratların karbonhidrat kısmına spesifik ve geri dönüşümlü olarak bağlanabilen immünoglobulin olmayan yapıya sahip proteinler" olarak genişletmişlerdir. Barondes (1988), lektinleri “antikorlar veya enzimler dışındaki karbonhidrat bağlayıcı proteinler” olarak tanımlamıştır; bu tanım, karbonhidrat bağlama bölgesine bağlı enzimatik aktivite gösteren ribozom inaktive bölgesinden oluşan risin gibi lektinlerin tanımı ile çelişmektedir. Peumans ve Van Damme (1995), lektinleri “belirli bir mono veya oligosakkarite geri dönüşümlü olarak bağlanan, katalitik olmayan en az bir alana sahip tüm proteinler” olarak tanımlamışlardır ve bu tanım günümüzde bilim dünyasında

yaygın olarak kabul görmüştür. Bu tanıma göre, aglütinasyon aktivitesi artık proteinlerin lektin olarak sınıflandırılması için bir kriter değildir. Karbonhidrat kısmını değiştirmeden, karbonhidrat yapılarını spesifik olarak tanıyan ve geri dönüşümlü olarak bağlayan en az bir bölgenin (domainin) var olması lektinlerin en önemli özelliğidir.

2.2. Bitki Lektinlerin Sınıflandırılması

Bitki lektinleri, oldukça çeşitli moleküler yapılar ve üç boyutlu katlanmalara sahip büyük ve heterojen bir protein grubunu temsil eder. Bir lektin domaininden oluşan bitki lektinine 'merolektin' denir. İki veya daha fazla lektin domaini içeren bitki lektini "hololektin" olarak adlandırılırken, en az bir başka protein domaine bağlı bir lektin domaini içeren lektin "kimerolektin" olarak adlandırılır. Farklı karbonhidrat bağlama özelliklerine sahip çoklu lektin bölgelerinden (domain) oluşabilen bitki lektinleri 'süperlektinler' olarak adlandırılır (Şekil 2-1) (Tsaneva ve van Damm, 2021).



Şekil 2-1: Bitki lektinlerinin yapısal çeşitliliklerine göre sınıflandırılması (Tsaneva ve van Damm, 2021).

Lektin bölgesi (domaini) turuncu ile gösterilmiştir. Başka bir protein domaini mavi kare, lektin bölgesindeki karbonhidrat bağlama yerleri ise siyah altıgen veya yuvarlak olarak gösterilmiştir.

Bugüne kadar bilinen tüm bitki lektinlerinin büyük çoğunluğu, nispeten az sayıda evrimsel ve yapısal olarak ilişkili protein ailesi olarak sınıflandırılabilir. 1998'de orijinal sınıflandırma sistemi

- 1) Baklagiller (Leguminosae) familyasına ait lektinler
- 2) Monokot bağlayan lektinler
- 3) Kitin bağlama domaini içeren lektinler
- 4) RIPs-II (Tip II ribozom-inaktive edici protein)
- 5) *Cucurbitaceae phloem* lektinleri

6) Jacalin ailesine ait lektinler

7) *Amaranthaceae* lektinleri olmak üzere 7 bitki lektin ailesinden oluşuyormuş (Peumans ve van Damme, 1998), ancak 2008'de bitkilerden yeni tanımlanan tüm karbonhidrat bağlayıcı lektinler hakkındaki verileri katmak için 12 bitki lektin ailesine genişletilmiştir. Lektin aileleri, bu ailenin ayrıntılı olarak karakterize edilen ilk lektininin adını almıştır (Tsaneva ve van Damme, 2021).

- 1) *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) ailesi
- 2) Amarantin domain içeren lektinler
- 3) Kitinazla ilişkili agglutininler (CRA)
- 4) Siyanovirin domain içeren lektinler
- 5) *Galanthus nivalis* domain agglutininler (GNA)
- 6) Euonymus ile ilgili lektinler
- 7) Hevein domain içeren lektinler
- 8) Jacalin ile ilgili domain içeren lektinler
- 9) Baklagil lektinleri
- 10) Lys M domain lektinleri
- 11) *Nicotiana tabacum* agglutinin (Nictaba) ile ilgili lektinler
- 12) Risin-B domain lektinleri olarak sınıflandırılır.

2.2.1. *Agaricus bisporus* Agglutinin (ABA) Ailesi

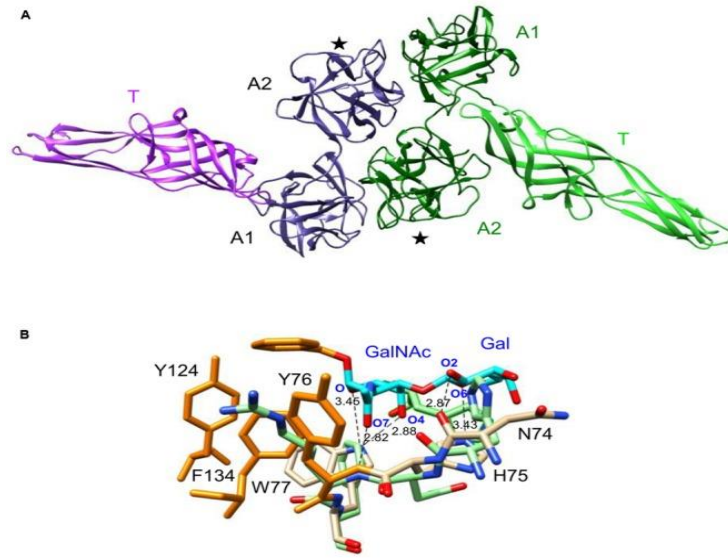
ABA ilk olarak yenilebilir mantar *A. bisporus*'tan izole edilmiştir. Bu lektinin homologları mantarlar arasında yaygındır, ancak daha düşük bitkilerde, özellikle *Marchantia polymorpha* sadece birkaç ABA homoloğu rapor edilmiştir. ABA, sarmal-ilmek-sarmal motifi ile birbirine bağlanan iki β -tabaka ile benzersiz bir katlanma yapı gösterir. Her ABA monomeri, sarmal-ilmek-sarmal motifinin karşıt bölgelerinde bulunan ve T antijenine karşı yüksek affinite gösteren sırasıyla GlcNAc ve GalNAc tanıma bölgelerine sahiptir. ABA bir tetramer olarak bulunur ve T-antijeni tanınması, bazı epitelyal kanser hücre dizilerinin proliferasyonunun baskılanmasına yol açar (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.2. Amarantin Domaini İçeren Lektinler

Amarantin domaini, özellikle T-antijeni hedefler. İlginç bir şekilde, bu lektin motifinin karbonhidrat bağlama bölgesi, kısa bir α -sarmal 310 segment ile bağlanan

yaklaşık 150 amino asitlik iki ardışık dizili homolog domainin baştan kuyruğa bağlanması yoluyla oluşturulur. Her bir amaranthin domaini, üç β -firkete ile kısa bir β -fıçı şeklinde kapatılan altı adet antiparalel β -tabakasından oluşan bir β -yonca yapısına sahiptir. Karbonhidrat bağlama bölgesi, T-antijenin sialile edilmiş varyantlarını tanıma özelliği, kolon ve serviks kanserlerinin histokimyasal çalışmalarında başarıyla uygulanmıştır. Moleküler klonlama ve X-ışını difraksiyon analizi, *Amaranthus caudatus*'tan elde edilen tohum lektini olan amaranantin amino asit dizisi (Raina ve Datta, 1992) ve üç boyutlu yapısı bakımından başka hiçbir bitki lektinine benzemediğini ortaya konması ve amarantinlerin uzun süredir Amaranthaceae familyası için benzersiz oldukları düşünülse de, eğrelti otları, likofitler ve gymnospermiler de dahil olmak üzere taranan 84 bitki genomunun 34'ünde amarantin ile ilgili diziler mevcut olduğu tespit edilmiştir (Peumans ve van Damme, 1988). Amarantinler, hololektinler olarak tanımlanmıştır, ancak bir aerolizin toksin domaine bağlı bir amarantin domaini içeren birkaç kimerolektin de rapor edilmiştir.

Farklı bitki genomlarının analizi, amarantin alanlarına sahip çok sayıda dizi ortaya çıkarmıştır. Amarantin alanlarının sayısı, farklı bitki türleri arasında önemli ölçüde değişiklik gösterir. Çalışılan tüm bitki türleri arasında en yaygın domain yapısı, bir aerolizin toksin alanına (AAT) bağlı iki amarantin domaini içeren ve en çok cucumber (salatılık) genomunda bulunan yapıdır (Şekil 2-2) (Dang ve ark., 2017).



Şekil 2-2: Aerolizin domain içeren amarantin benzeri proteinlerin moleküler modellenmesi (Dang ve ark., 2017).

- (A) AAT4'ün dimerik yapısının diyagramı. Sırasıyla mor ve yeşil renkli olan her iki monomer, bir aerolizin benzeri alana (T) bağlı iki amarantin alanından (A1, A2) oluşur. A2 alanları bir karbonhidrat bağlama bölgesi içerir (★).
- (B) Benzoyl T-antijen disakaritini (camgöbeği ve turuncu çubuk) amarantin lektinin karbonhidrat bağlama bölgesine sabitleyen H-bağları ağı (kesikli siyah çizgiler). Soluk yeşil renkli amino asit kalıntıları, amarantin karbonhidrat bağlama bölgesini oluşturan amino asit kalıntılarının homolog olan AAT4 A2 alanının kalıntılarına karşılık gelir (Dang ve ark., 2017).

2.2.3. Sınıf V Kitinazla İlişkili Aglutininler (CRA)

Sınıf V kitinazla ilgili ilk lektin siyah akasyasının (*Robinia pseudoacacia*) kabuğundan karakterize edilmiş ve sınıf V'den bitki kitinazları ile yaklaşık %50 sekans özdeşliği gösterdiği, ancak kitinaz aktivitesinden yoksun olduğu gözlenmiştir. Proteinin yüksek mannoz N-glikanları bağladığı gösterilmiştir. CRA domainin kristal yapısı, bir TIM-fıçı iskelesini (scaffold) ortaya çıkarmıştır. Karbonhidrat bağlama yerlerini oluşturan halka bölgelerinin yeniden düzenlenmesi, CRA'nın kitine karşı hidrolitik aktiviteden yoksun olmasını ve yüksek mannoz tipi N-glikanlarla etkileşime girebilmesini açıklamaktadır (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.4. Siyanovirin Domain İçeren Lektinler

Siyanovirin ilk olarak siyanobakteri *Nostoc ellipsosporum*'dan izole edilmiştir. Nükleer manyetik rezonans çalışmaları, siyanovirinin iç iki katlı psödosimetri sergileyen uzun, büyük ölçüde β -yapraklı bir protein olduğu ortaya konulmuştur.

Lektin, viral gp120 glikoproteininin yüzeyinde bulunan yüksek mannozlu N-glikanlar ile etkileşerek hedef hücrelerde insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) girişini bloke ettiği bildirilmiştir (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.5. Baklagil Lektinleri

Şimdiye kadar klasik baklagil lektinleri sadece Leguminosae familyasına ait bitkilerde bulunmuştur. Protein ve gen dizilimi, tüm baklagil lektinlerinin, yaklaşık 30 kDa'lık iki veya dört protomeren oluştuğunu göstermiştir. İki zincirli baklagil lektinlerinde protomerler ayrıca daha küçük iki polipeptide bölünmüştür. Tüm baklagil lektinleri kuşkusuz moleküler düzeyde ilişkilidir, ancak karbonhidrat bağlama özgülüğünde dikkate değer bir değişiklik göstermektedir. Bu geniş özellik yelpazesi, baklagil lektinlerinin bir araç olarak kullanılmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca, baklagil lektinleri, birçok ekin bitkisinde bol miktarda bulunmaları ve baklagiller ile nitrojen sabitleyici bakteri *Rhizobium* arasındaki simbiyozdaki varsayılan katılımları nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Peumans ve van Damme, 1988).

Baklagil lektin domaini, iki ana β -tabakadan oluşan jellyroll üçüncül sarmal yapısına sahiptir. Yassı kubbe şeklinde bir β -sandviç yapısını oluşturmak üzere birbiriyle kısa dört β -zincirden oluşan bağlayıcı β -tabakanın yanısıra dönüşler ve halkalarla bağlı olan düz bir yedi zincirli β -tabaka ve kavisli bir altı-zincirli β -tabakadan oluşur (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.6. Hevein Domain İçeren Lektinler

Hevein domainleri içeren kitin bağlayıcı proteinler büyük bir lektin ailesini temsil eder. "Hevein domaini" terimi, kauçuk ağacının (*Hevea brasiliensis*) lateksinde bulunan, N-asetilglukozamin (GlcNAc) oligomerlerini ve kitini bağlayabilen 43 amino asit kalıntılı monomerik bir protein olan heveinden ileri gelir. Hevein, büyük bir öncü molekülden türeyen tek bir kitin bağlama domaininden oluşan bir merolektindir. Birçok bitki proteini, heveine benzer kitin bağlama domaini içerir. Üç β -tabaka ve iki kısa α -heliks zincirinden oluşan hevein domainin üç boyutlu yapısı NMR spektrometrisi ile belirlenmiştir. Hevein domaini, genişletilmiş bir bağlanma alanının varlığından dolayı daha uzun GlcNAc oligomerlerine karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğu gözlenmiştir. Hevein domaini, tek bir domain, bir dizi tandem olarak dizilmiş (7'ye kadar) domain veya C-terminal kitinaz domaini ile birlikte kimerolektinin bir parçası

olarak bulunabilmektedir (Peumans ve van Damme, 1988; Tsaneva ve van Damme, 2021).

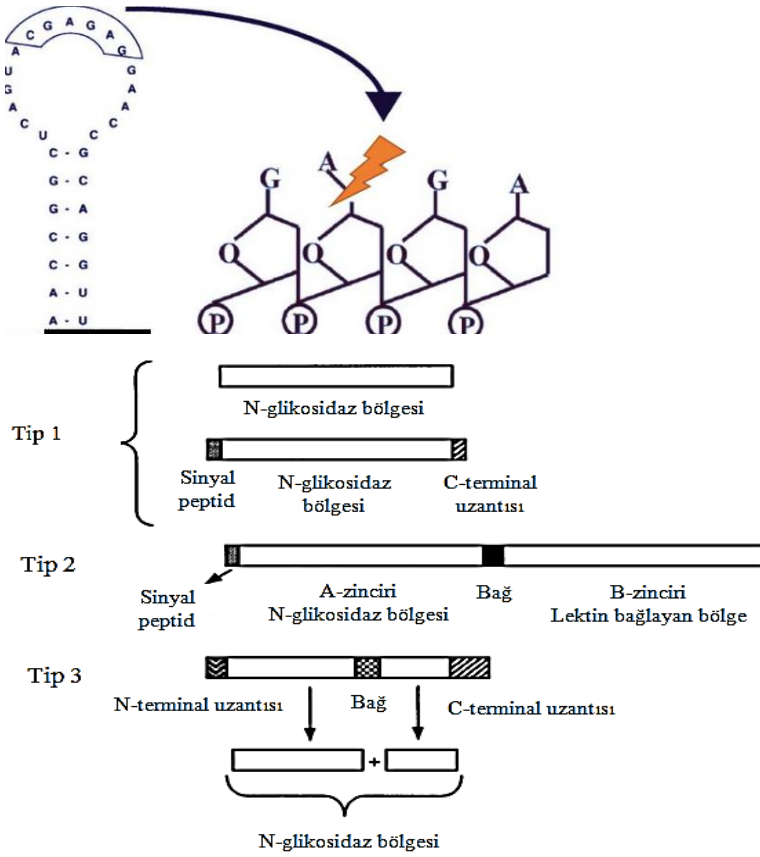
2.2.7. *Nicotiana tabacum* Agglutinin (Nictaba)

Nictaba ilk olarak tütün (*Nicotiana tabacum*) yapraklarından izole edilmiştir. İki 19 kDa alt birimden oluşan bir homodimerdir ve yüksek mannozlu N-glikanlara, kompleks N-glikanlara ve daha az ölçüde GlcNAc oligomerlerine güçlü bir şekilde bağlanır. Şu anda, Nictaba domainin üç boyutlu yapısı henüz çözülmemiştir. Moleküler modelleme, Nictaba'nın esasen uzatılmış döngülerle birbirine bağlanan iki β -tabakadan oluşan bir β -sandviç yapısından oluştuğunu göstermektedir (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.8. Risin-B Domaini Lektinleri

Ribozomu inaktive eden proteinler (RIP), translasyon aşamasında protein sentezini durduran N-glukozidaz etki gösteren biyoaktif moleküllerdir. *Ricinus communis* tohumlarından izole edilen ilk RIP risin'dir. Tip 2 RIP, B zinciri olarak adlandırılan bir karbonhidrat bağlama bölgesi (domain) ile A zinciri olarak adlandırılan tandem olarak dizilmiş bir polinükleotid adenozin glikozidaz bölgesinden (domain) oluşan kimeroktinlerdir. A ve B zincirleri arasındaki bir bağlayıcının (linker) kesilmesi (eksizyonu) yoluyla her iki zincir post-translasyonel olarak işlenen tek bir öncü molekül üzerinde sentezlenir. Tüm tip 2 RIP, hem A hem de B zincirinde yüksek bir dizi benzerliğini paylaşır ve benzer bir genel katlanma ve üç boyutlu yapıya sahiptir. Belirgin benzerliklere rağmen, tip 2 RIP, katalitik aktiviteleri, substrat spesifikliği ve (sito)toksik özellikleri bakımından birbirinden oldukça farklıdır. Çoğu tip 2 RIP, tercihen Gal veya GalNAc'ı bağlar (Peumans ve van Damme, 1988).

RIP'lerin birincil yapı karşılaştırılması Şekil 2-3'te gösterilmiştir.



Şekil 2-3: RIP'lerin birincil yapı karşılaştırılması (Güneş ve ark., 2018).

2.2.9. Jacalin İle İlgili Domain İçeren Lektinleri

Jacalin ilk olarak jack meyvesinin (*Artocarpus integrifolia*) tohumlarından izole edilen ve jacalinle ilişkili lektinlerin geniş ailesi için model oluşturan bir proteindir. Jacalin benzeri lektin domaini üç adet dört zincirli β -tabakadan oluşan üç katlı bir β -prizmasından oluşmaktadır. Bu lektin ailesi, karbonhidrat bağlama özgülüklerine göre vakuolde bulunan galaktoz bağlayan ile sitoplazma ve nukleusta bulunan mannoz bağlayan lektinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sitoplazmik jacalinle ilişkili lektinler grubu birçok bitki ailesinde yaygındır, oysa vakuoler lektinler Moraceae gibi birkaç bitki ailesiyle sınırlıdır (Peumans ve van Damm, 1988; Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.10. *Galanthus nivalis* Domaini İçeren Aglutininler (GNA): Antitümöral Özellikleri Olan GNA İlişkili Lektin Ailesi Üyeleri

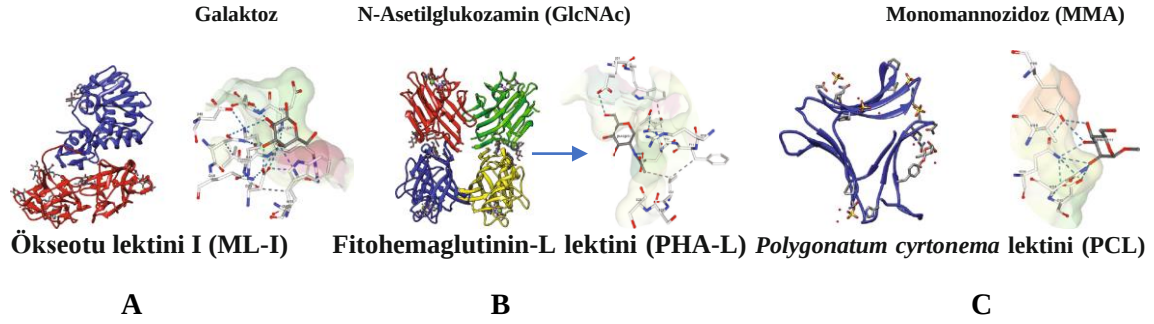
Galanthus nivalis aglütinin (GNA) ile ilgili lektinler, kansere, virüslere ve mantarlara karşı aktif olan mannoz bağlayıcı proteinlerin bir üst ailesini oluşturur.

Oligomannozidlere ve yüksek mannozlu N-glikanlara karşı yüksek afinite gösterirler. *Galanthus nivalis* lektin (veya GNA) olarak adlandırılan ilk GNA ile ilgili lektin, kardelen soğanlarından elde edilmiştir. Daha önce “monokot mannoz bağlayıcı lektinler” olarak yeniden adlandırılmıştır. Fakat, GNA domaini içeren birçok lektin izole ve karakterize edildikten sonra GNA ile ilgili lektinler olarak adlandırılmıştır (Mazalovska ve Kouokam, 2020). 12.5 kDa monomerlerinden oluşan bir homotetramerdir. X-ışını kristalografisi, her bir alt birimin, üç mannoz bağlama bölgesi oluşturan üç antiparalel dört iplikli β -tabakadan oluşan bir β -prizma olarak katlandığını göstermiştir (Tsaneva ve van Damme, 2021).

2.2.11. *Euonymus europaeus* Lektin (EUL) Domaini

İğ ağacının (*Euonymus europaeus*) arillisinden izole edilen aglutininin (EUL) kan grubu B oligosakkaritlerine karşı yüksek, H-tipi oligosakkaritlere karşı ise daha az ölçüde tercih gösterdikleri bildirilmiştir. Tam EUL dizisi, ancak 2008'de lektinin moleküler klonlanmasından sonra aydınlatılabilmektedir. Dizi analizi, EUL'nin yeni bir lektin motifini temsil ettiğini ortaya koymuştur. EUL domainin kristal yapısı henüz çözülmemiştir, ancak moleküler modelleme çalışmaları, çeşitli karbonhidrat yapılarının tanınması için tek bir bağlanma bölgesine sahip risin-B benzeri bir katlanma önerilmiştir (Tsaneva ve van Damme, 2021).

Karbonhidrat bağlama domain (CBD'ler) yoluyla ilgili şekerlerle etkileşime giren üç lektinin kristal yapısı Şekil 2-4'te gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Karbonhidrat bağlama domain (CBD'ler) yoluyla ilgili şekerlerle etkileşime giren üç lektinin kristal yapısı (Tsaneva ve van Damme, 2021).

A: Galaktoz ile kompleks oluşturmuş ökseotu lektini I (Ricin ailesi): (A zinciri (mavi) ve B zinciri (kırmızı) ile gösterilmiştir.

B: Monomerleri farklı renklerle gösterilen N-asetilglukozamin ile kompleks oluşturmuş tetramerik fitohemagglutinin-L (Baklagil ailesi).

C: Mannozidozlar ile kompleks oluşturmuş monomerik *Polygonatum cyrtonema* (GNA ilişkili lektin ailesi).

2.3. Bitki Lektinlerin Aktiviteleri

2.3.1. Antikanser Aktivitesi

2.3.1.1. Apoptoz İndüksiyonu Yolu

Apoptoz, nükleer yoğunlaşma, hücre büzülmesi, zar kabarması ve DNA fragmentasyonu ile karakterize, programlanmış bir hücrel intihar mekanizmasıdır. Bir sistein proteaz ailesi olan kaspazlar, apoptozun temel düzenleyicileridir. Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahiptir ve aspartik asitten sonraki peptit bağına parçalayabilirler. Kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek preteolitik şelale tarzında reaksiyonları başlatırlar. Tanımlanan on ana kaspaz genel olarak başlatıcı (kaspaz-2,-8,-9,-10), efektör veya uygulayıcı (kaspaz-3,-6,-7) ve inflamatuvar (kaspaz-1,-4,-5) olarak sınıflandırılmıştır. Kaspaz-11, 12,13 ve 14 de tanımlanmıştır (Elmore, 2007).

TNFR ailesinin üyesi olan ve hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları olan sırasıyla FasL ve TNF ile etkileşime girmesi sonucu kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri ("death domain") adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile interaksiyona girerler. FADD daha sonra ölüm efektör domainin dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8

ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan, ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Kaspaz-8 etkinleştirildiğinde apoptoz tetiklenir (Elmore, 2007).

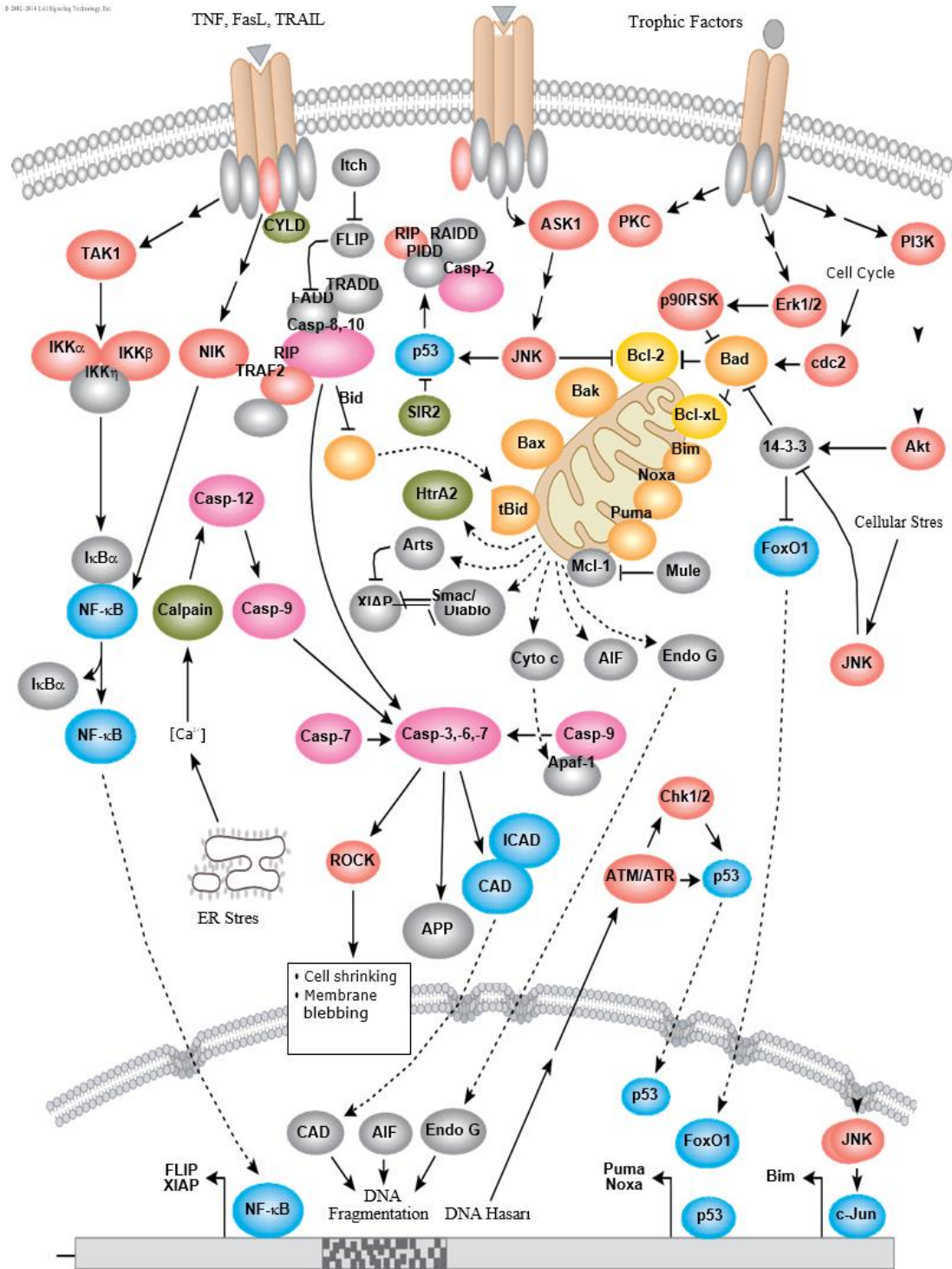
Protein-protein etkileşim motifleri içeren adaptör moleküllerin, bu ölüm proteazlarının sinyal yollarına bağlanmasına aracılık ettiği düşünülmektedir. DNA hasarı, RAIDD (Ölüm domaine sahip RIP (Receptor-Interacting Protein) ile ilişkili ICH1/CED3-homolog protein) ve kaspaz-2'ye bağlanan ve kaspaz-2'nin aktivasyonuna yol açan PIDD (p53 ile indüklenen ölüm domain proteini) ekspresyonunu indükler (Elmore, 2007).

Sitokinler, büyüme faktörleri gibi uyarıcıları, mitokondriyal geçirgenlik geçiş (MPT) gözeneginin açılması, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve normal olarak sekestre edilmiş iki ana pro-apoptotik protein grubunun zarlararası boşluktan sitozole salınmasıyla sonuçlanan iç mitokondriyal zarla değişikliklere neden olur. Birinci grup sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'den oluşur. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolu aktive eder. Sitokrom c, mitokondriden apoptoz-indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1") Apaf-1'in yanı sıra prokaspaz-9'u bağlayıp aktive ederek bir "apoptozom" oluşturur. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktive ettikten sonra, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD), bağlı olduğu ICAD'tan serbestleşerek apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondenzasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Kaspaz-bağımsız apoptoz ise mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir (Elmore, 2007).

Kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (inhibitors of apoptosis) apoptozun önemli düzenleyicileridir, kaspazları selektif olarak inhibe ederek apoptozu durdururlar. Ayrıca birçok tümör hücrede de eksprese edilirler. XIAP (X'e bağlı memeli apoptoz proteini inhibitörü) ve survivin, en iyi bilinenlerdir. XIAP kaspaz 3, 7 ve 9'u inhibe eder. Patolojik proinflamatuvar ve proapoptotik uyarıcılar tarafından indüklenen ve aktive edilen kaspaz-11, kaspaz-3'e doğrudan etki ederek inflamatuvar yanıtı ve apoptozu artıran kaspaz-1'in aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-12 ve 7 ise, ER stres koşulları

altında aktive edilir. Büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren antiapoptotik ligandlar, Akt ve p90RSK'yi aktive eder. Akt, doğrudan fosforilasyon yoluyla Bad'i inhibe eder ve Forkhead transkripsiyon faktörleri ailesini (Fox0) fosforile ederek ve inhibe ederek Bim'in ekspresyonunu önler. Fox0, FasL ve Bim gibi proapoptotik molekülleri akış yukarı regüle ederek apoptozu destekler. Mitokondriyal apoptotik olayların düzenlenmesi ve kontrolü, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir. Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi yolu ile etki eder. Mitokondriyal membran geçirgenliğini yöneten Bcl-2 protein ailesi, proapoptotik (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl XS, Bcl-w, BAG) veya antiapoptotik (Bcl10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk) olabilir (Elmore, 2007).

Çeşitli hücre sinyal yollarındaki değişiklikler, apoptozun düzensizliğine ve kansere yol açabilir. Apoptozun baskılanması, bazı kanserlerin gelişmesinde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Tümör hücreleri, Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu veya Bax gibi proapoptotik proteinlerin aşağı regülasyonu veya mutasyonu yolu ile apoptoza direnç kazanabilir. Hem Bcl-2 hem de Bax'ın ekspresyonu, p53 tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlenir. p53 tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve insan tümörögenezinde en yaygın mutasyona uğramış gendir. p53'ün kritik rolü, tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış olması gerçeğiyle açıkça görülmektedir. p53, DNA hasar gördüğünde DNA onarım proteinlerini aktive edebilir, hücre döngüsünü G1/S düzenleme noktasında tutabilir ve DNA hasarının onarılamaz olduğu ortaya çıkarsa apoptozu başlatabilir (Elmore, 2007). Apoptoz mekanizması Şekil 2-5'te özetlenmiştir.



Şekil 2-5: Apoptoz mekanizmasında kullanılan yollar
 (https://blog.cellsignal.com/blog.cellsignal.com/cell-process-seven-assays-to-detect-apoptosis adresinden alındı).

2.3.1.2. Otofaji Aktivasyonu Yolu

Genellikle otofaji olarak adlandırılan makrotofaji, toplu sitoplazmik içeriklerin, anormal protein agregatlarının ve fazla veya hasarlı organellerin otofagozomik-lizozomal parçalanmasıyla sonuçlanan katabolik bir süreçtir. Otofaji genellikle besin yoksunluğu koşulları tarafından aktive edilir, ancak farklılaşma, gelişim, stres, enfeksiyon, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik durumlarla da ilişkilendirilmiştir. Kinaz mTOR, otofajiyi baskılayan aktif mTOR (Akt ve MAPK sinyali) ve onu destekleyen mTOR'un (AMPK ve p53 sinyali) negatif düzenlemesi ile otofaji indüksiyonunun kritik bir düzenleyicisidir (Chen ve ark., 2021).

“Otofaji ile ilişkili proteinler” (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri, otofaji olayında görev alırlar ve “otofajik kesecik” ya da bir başka deyişle “izolasyon membranının” ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Mayada yapılan genetik tarama sonucunda 32 farklı Atg geni tanımlanmıştır (Glick ve ark., 2010). Hücrede otofagozomlar, endoplazmik retikulum ile golgi membranların arasında yayılmış “otofaji oluşum merkezi” (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen yapılarda meydana gelirler (Glick ve ark., 2010).

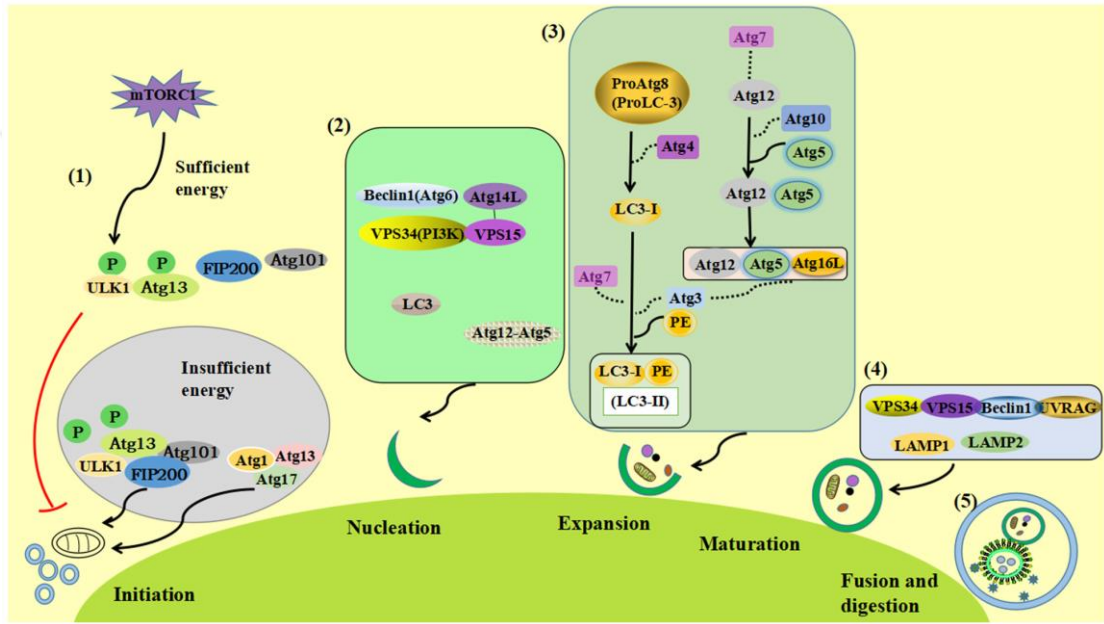
Otofaji, Atg1 kinazının aktivasyonu ile uyarılır. Vezikül çekirdeklenmesine, Vps34'ün bir ortologu olan Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinazın aktivasyonu aracılık eder. Maya Atg1 ile benzer bir rol oynayan üç serin/treonin kinaz, UNC-51 benzeri kinaz -1, -2 ve -3 (ULK1, ULK2, UKL3), mTOR kompleksinin akış aşağı etki ederler. ULK1 ve ULK2, otofaji ile ilişkili (Atg) gen ürününün (mAtg13) memeli homologue ve iskele (scaffold) proteini FIP200 (bir maya Atg17'nin ortologu) ile büyük bir kompleks oluşturur. hVps34, Beclin 1 (maya Atg6'nın bir memeli homologue), p150 (maya Vps15'in bir memeli homologue) ve Atg14 benzeri protein (Atg14L veya Barkor) veya ultraviyole ışınlama direnci ile ilişkili gen (UVRAG) içeren Sınıf III PI3K kompleksi, otofajinin uyarılması için gereklidir. Vps34, fagoforun uzaması ve diğer Atg proteinlerinin fagofora alınması için gerekli olan fosfatidilinositol trifosfat oluşturmak üzere substrat olarak yalnızca fosfatidilinositol kullanılması bakımından PI3-kinazlar arasında benzersizdir.

PI3F'in görevi, kesecik oluşumunda görev alan proteinleri PAS'a yönlendirmektir. Otofagazom membranının uzaması ve kesecik halini alması ise iki ubiquitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir (Glick ve ark., 2010).

Bu sistemlerin ilkinde, bir E1 ubikuitin aktive edici enzim gibi davranan Atg7, karboksi terminal glisin kalıntısına bağlanarak Atg12'yi ATP'ye bağımlı bir şekilde aktive eder. Atg12 daha sonra, Atg12'nin Atg5'in lizin 130'una kovalent bağlantısını güçlendiren E2 benzeri bir ubikuitin taşıyıcı protein olan Atg10'a aktarılır. Konjuge Atg5-Atg12 kompleksleri Atg16L dimerleri ile çiftler halinde, genişleyen fagofor ile birleşen multimerik Atg5-Atg12-Atg16L kompleksi oluşturur. Atg5-Atg12-Atg16L komplekslerinin birleşmesi, işlenmiş LC3B-II'nin asimetric alımı yoluyla büyüyen fagoforda eğriliği indüklediği düşünülmektedir. Atg5-Atg12 konjugasyonu, otofajinin aktivasyonuna bağlı değildir ve otofagozom bir kez oluştuğunda, Atg5-Atg12 Atg16L zardan ayrışır ve konjuge Atg5-Atg12'yi nispeten zayıf bir otofaji belirteci yapar.

Otofagozom oluşumunda yer alan ikinci ubikuitin benzeri sistem, Atg8'in memeli homologu tarafından kodlanan mikrotübül ile ilişkili protein hafif zincir 3'ün (LC3B) işlenmesidir. LC3B, çoğu hücre tipinde tam uzunlukta bir sitozolik protein olarak eksprese edilir ve otofajinin indüklenmesi ile, LC3B-I oluşturmak için bir sistein proteazı olan Atg4 tarafından proteolitik olarak bölünür. Atg4'e bağlı bölünme ile açığa çıkan karboksi terminal glisin, daha sonra E1 ubikuitin aktive edici enzim gibi davranan Atg7'nin Atg12'yi ATP'ye bağımlı bir şekilde aktive ettiği gibi benzer şekilde aktive eder. Aktive edilmiş LC3B-I daha sonra, işlenmiş LC3B-II'yi oluşturmak için fosfatidiletanolamin (PE)'nin karboksil glisine konjuge edilmeden önce farklı bir E2 benzeri taşıyıcı protein olan Atg3'e aktarılır. LC3B-II'nin büyüyen fagofora alınması ve entegrasyonu Atg5-Atg12'ye bağlıdır ve otofagozomun hem iç hem de dış yüzeylerinde yer alarak membran hemifüzyonunda ve yıkım için kargo seçiminde rol oynar. LC3'ün sentezi ve işlenmesi, otofaji sırasında artar. Fagoforda bir 'reseptör' olarak görev yapan LC3B-II'nin, seçici alımlarını ve parçalanmalarını uyarmak üzere hedef üzerindeki 'adaptör' molekülleri ile etkileşime girer. Bu bağlamda en iyi karakterize edilen molekül, poliubikuitinlenmiş protein agregatlarının dönüşümünü destekleyen çok işlevli bir adaptör molekülü olan p62/SQSTM1'dir. p62/SQSTM1, ubikuitin bağlama alanı (UBD) aracılığıyla poliubikuitinlenmiş proteinler ve agregatlarla, LC3-etkileşim Bölgesi (LIR) aracılığıyla ise LC3B-II ile birleşir, aynı zamanda Traf-6 ile etkileşim yoluyla NF- κ B sinyalini düzenler. Son çalışmalar, p62'nin insan hepatoselüler karsinomunda biriken karaciğerdeki Mallory cisimlerinin ana bileşeni olduğu; yüksek p62 seviyelerinin NF- κ B sinyalini düzenlemede ve inflamasyonla ilişkili tümörogenezi indüklemekte aktif bir rol oynadığını göstermiştir. Mitofaji olarak adlandırılan

mitokondrinin otofajiye bağlı parçalanması, bu kritik organellerin bütünlüğünü korumak ve reaktif oksijen türlerinin üretimini sınırlamak için önemlidir. Mitofajide görevi olduğu belirlenen ilk protein Uth1'dir. Mitofajide görevli diğer moleküller, kırmızı kan hücrelerinin farklılaşmasında mitokondriyal klirensle ilgili olan BNIP3L, Atg1'in memeli homologu olan Ulk1 ve Parkinson hastalığı ile ilgili bir gen tarafından kodlanan ve dış mitokondriyal membranda bulunan bir E3 ubikuitin ligaz olan Parkin (Şekil 2-6) (Glick ve ark., 2010).



Şekil 2-6: Otofajinin başlangıcı ve oluşumu (Chen ve ark., 2021).

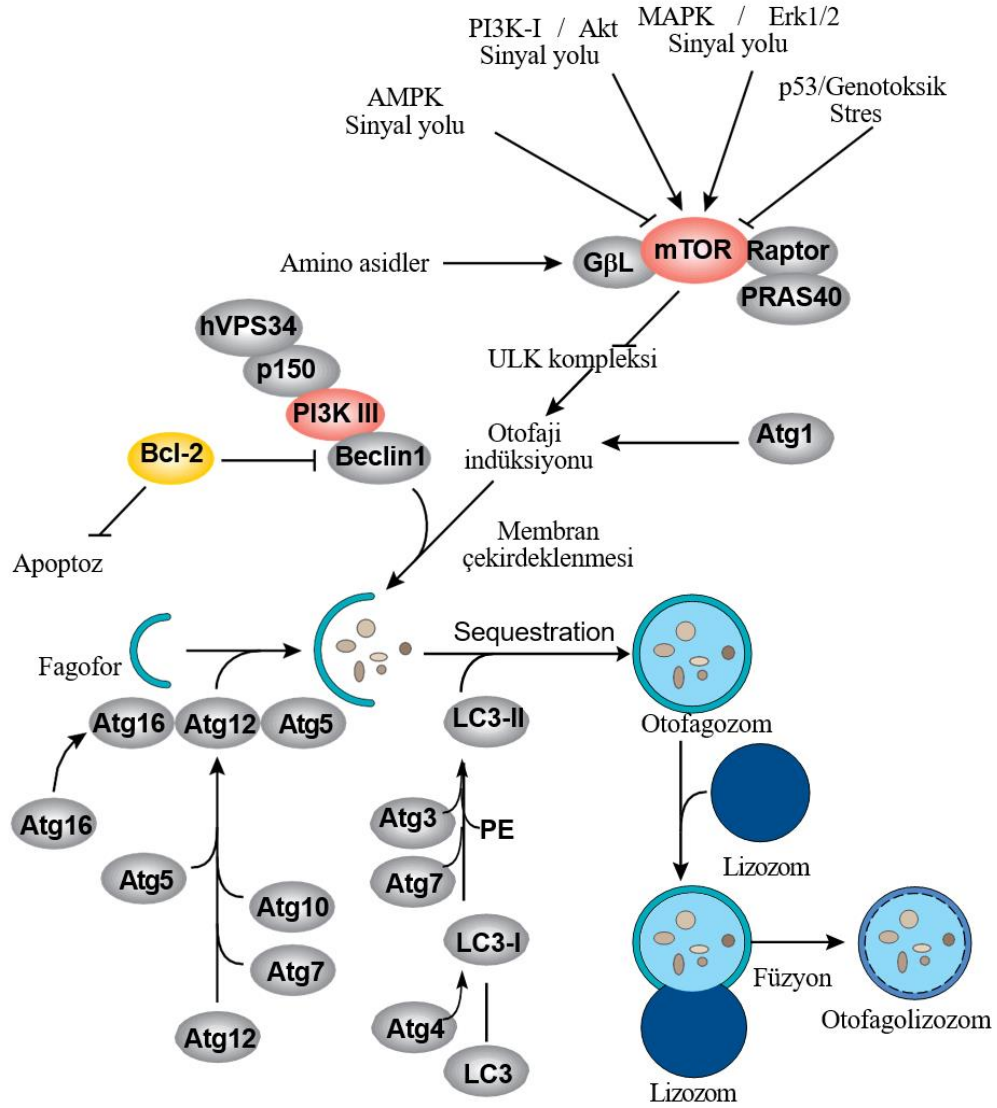
Otofaji, indüksiyon, çekirdeklenme, otofagozom uzantısı, otofagozom olgunlaşması ve otofagozom lizizi aşamalarından oluşur.

- (1) ULK1-Atg13-FIP200-Atg101 kompleksi, otofajinin uyarılmasında rol oynar.
- (2) Beclin-1 (Atg6)-Atg14L-VPS15-VPS34 (PI3K) kompleksinin oluşumu ve Atgs'nin alınması.
- (3) Atg5-Atg12 ve LC3 sistemlerinin modifikasyonu.
- (4) SNARE ve Vps34-Vps15-Beclin1-UVRAG kompleksinin, otofagozomların olgunlaşmasına katılması.
- (5) Otofajik lizozomlardaki asit hidrolazlar tarafından veziküller içeriğinin parçalanması.

2.3.1.3. Apoptoz ve Otofaji Arasındaki Bağlantı

Beclin-1, insan meme, yumurtalık ve prostat kanserinde monoallel olarak silindiği ve bu nedenle tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Otofajinin nekroz ve inflamasyonu sınırlayarak, hücre döngüsü durdurulmasını indükleyerek ve genom instabilitesini önleyerek tümör oluşumunu önlediği varsayılmıştır. Beclin-1 gibi, UVRAG'ın da insan kanserinde monoallel olarak silindiği

gösterilmiştir. Farklı temel moleküler mekanizmalar tarafından kontrol edilmelerine karşın (kaspaz şelaleleri ile apoptoz, Atg protein sistemleri ile otofaji), bu iki programlı hücre ölümü arasında bağlantı ve iletişim bulunmaktadır. Apoptozun engellendiği koşullar altında otofajinin baskın bir programlı ölüm mekanizması olarak ortaya çıkması da bu bağlantı ve iletişimin varlığını kanıtlamaktadır. Beclin-1'in Bcl-2 ile etkileşimi, Beclin-1'in Vps34 ile etkileşimini bozmaktadır. Böylece, otofajide Beclin-1, ER'de Bcl-2 (ve Bcl-XL) ile etkileşime girerek aktivitesi inhibe edilmektedir. Bu etkileşime Beclin-1'deki BH3 alanı aracılık eder ve açlığın neden olduğu sinyallemeye yanıt olarak Bcl-2'nin Jnk1 aracılı fosforilasyonu ile bozulur, böylece otofajinin ilerlemesine izin verilir. Bu nedenle, Bcl-2, hücredeki lokalizasyonuna bağlı olarak hücre canlılığının belirlenmesinde ikili bir rol oynar: (a) mitokondride, sitokrom c salımını inhibe ederek, böylece apoptozu bloke ederek bir hayatta kalma fonksiyonu ve (b) ER'de, apoptotik olmayan hücre ölümüne yol açabilen Beclin-1 ile etkileşimin aracılık ettiği bir otofaji önleyici aktivite. Başka bir deyişle, Bcl-2 proteinleri hem antiotofajik, hem de antiapoptotik bir özellik göstermektedir ve her iki mekanizmayı koordine etmektedir (Gump ve Thorburn, 2011).



Şekil 2-7: Otofajinin sinyal yolu
(<https://www.cellsignal.com/pathways/science-pathways-autophagy> adresinden alıntı).

2.3.1.4. Otofajiyi Düzenleyen Sinyal Yolları

Otofaji, çoğu hücre tipinde bazal seviyelerde aktiftir. Bununla birlikte, otofaji, açlıkla güçlü bir şekilde indüklenir ve hücrelerin ve organizmaların, besinler yeniden sağlanana kadar hayatta kalmayı destekleyen besin yoksunluğuna adaptif yanıtın önemli bir bileşenidir.

2.3.1.4.1. Otofaji ve Kanserde mTOR/PI3K/AKT Sinyal Yolu

Evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir kinaz olan mTOR, hücre proliferasyonu, büyümesi ve metabolizması için önemlidir. TOR kompleksi 1 (TORC1) rapamisin tarafından inhibisyona duyarlıdır. İlk çalışmalar, bir mTOR inhibitörü olan rapamisinin otofajiyi indükleyebileceğini göstermiştir. İki tür mTOR kompleksi vardır, rapamisine duyarlı mTORC1 ve rapamisine duyarsız mTORC2. Rapamisine duyarlı mTORC1, PRAS40, mTOR, Raptor, DEPTOR, mLST8, Rheb-GP ve RadA-D proteinlerinden, mTORC2 ise mLST8, Rictor, mTOR ve ilgili proteinlerden (Protor ve Sin1, DEPTOR) oluşur. mTOR, iki mekanizma yoluyla otofajiyi düzenler (Chen ve ark., 2021).

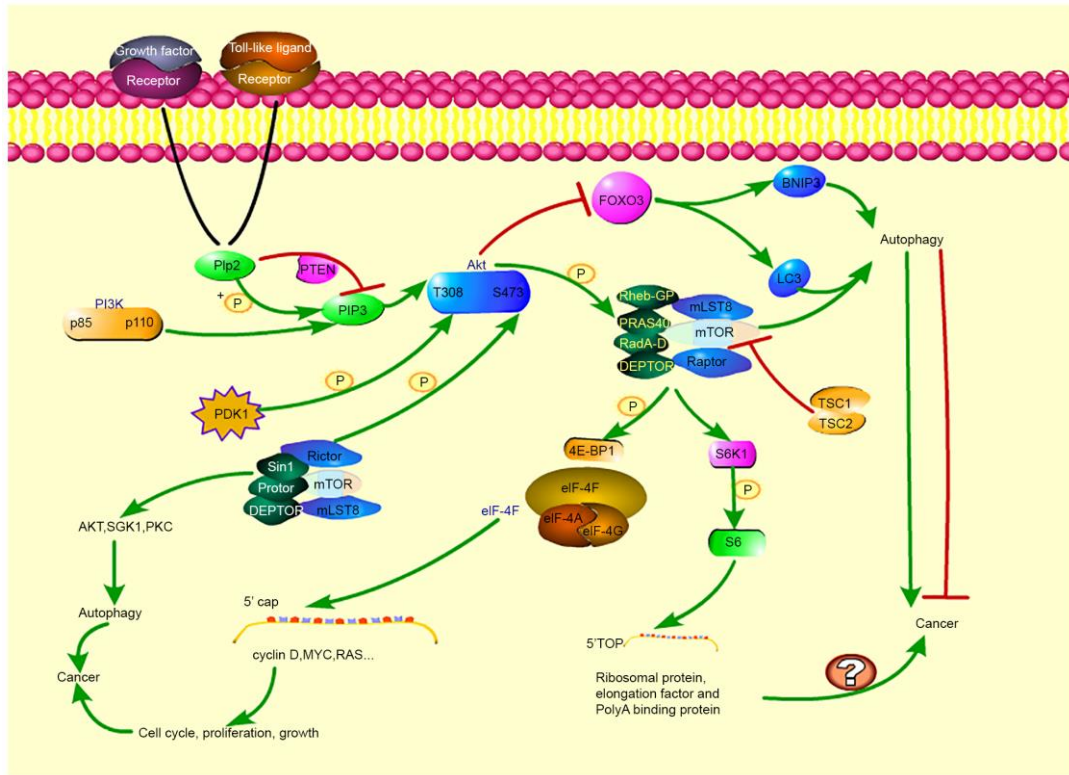
Fosforile edilmiş mTORC1, 4EBP1 ve p70S6 kinaz (S6K) aşağı sinyal iletim efektörleri aracılığıyla hücre siklusu devamlılığı, hücre büyümesi ve hücre metabolizması için gerekli proteinlerin translasyonunu sağlamaktadır. mTOR kinaz ayrıca doğrudan Atg'ye etki edebilir ve otofajiyi düzenleyebilir.

S6K1, mTORC1 tarafından doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenen ve otofajinin düzenlenmesine katılan çoklu fosforilasyon bölgelerine sahip bir serin/treonin kinazdır. Aktive edilmiş S6, 5' terminal oligopirimidin demeti (TOPS) RNA'nın translasyon etkinliğini iyileştirebilir. 5'Top mRNA, toplam hücre içi RNA'nın %15-20'sini oluşturur ve ribozomal proteinler, uzama faktörleri ve poliA bağlayıcı proteinler dahil olmak üzere protein translasyonu için gerekli çok sayıda bileşeni kodlar. Bazı çalışmalar, bu proteinlerin anormal sentezinin kanserle ilişkili olduğunu göstermiştir.

Agc protein kinaz ailesinin üyeleri ve mTORC2'nin substratları olan Akt, SGK1 ve PKC hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ve otofajinin düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. Tümör baskılayıcı FOXO3a'nın ekspresyonu genellikle kanserde aşağıya düzenleme ile regüle edilir. Aktive edilmiş FOXO3, otofaji ile ilgili LC3 ve BNIP3 genlerin transkripsiyonunu artırarak otofajiyi indükleyebilir, mTORC2 ise Akt'yi aktive ederek FOXO3'ün aktivasyonunu bloke eder. Bu nedenle, FOXO3a, otofaji ve kanseri bağlayan anahtar bir moleküldür ve ekspresyonu, otofaji sinyal yolağı aracılığı ile düzenlenebilir, bu da FOXO3a'nın kanser tedavisi için bir hedef olabileceğini düşündürür.

Bir büyüme faktörü veya Toll benzeri bir ligand, bir büyüme faktörü reseptörüne veya bir Toll benzeri reseptöre bağlandığında, p85 aktive edilir ve p110 devreye girerek

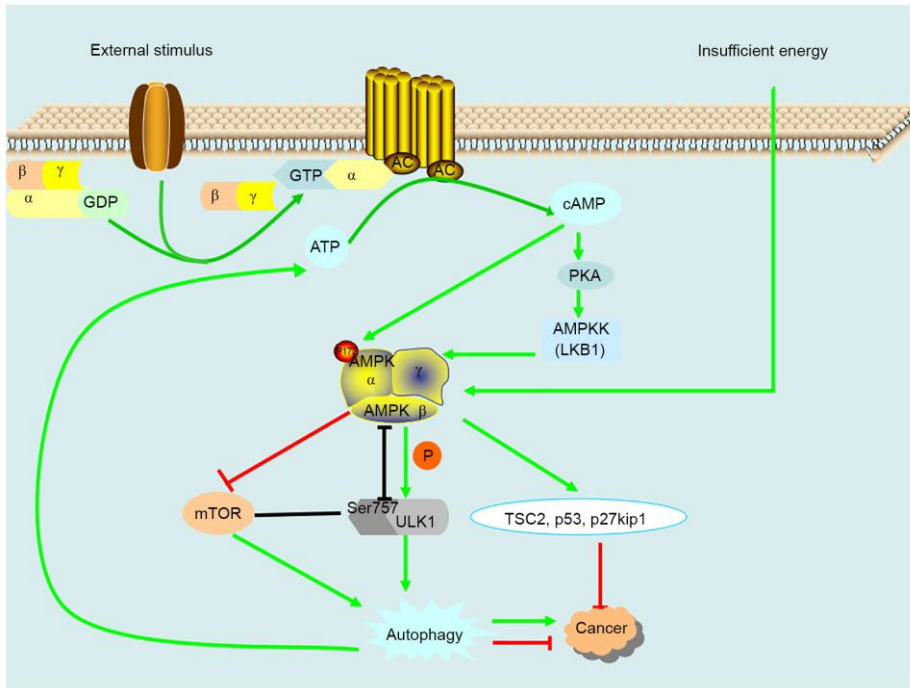
aktive edilen PI-3K, fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatı (PIP₂) ikinci haberci gibi davranan fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP₃) dönüştürmektedir. PIP₃, Akt/PKB yolu aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktif Akt ise TOR'u aktive ederek otofajiyi engellemektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PIP₂'nin PIP₃'e dönüşümünü kataliz eder ve otofajinin arttırılmasına neden olmaktadır. mTOR/PI3K/Akt sinyal yolunun tümör hücrelerinde tetiklendiği ve çeşitli kanser türlerinin tedavisi için önemli bir terapötik hedef olarak kabul edildiği gösterilmiştir. Pek çok kanser türünde koruyucu otofaji, çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı kimyasal direnci indükler. Bu nedenle, birçok kanser türünde kemoterapötik ajanların etkinliği, spontan koruyucu otofajik indüksiyon ile sınırlıdır ve otofaji yollarını inceleyerek ve otofaji seviyelerini uygun şekilde düzenleyerek kimyasal direncin üstesinden gelinebilir (Şekil 2-8) (Chen ve ark., 2021).



Şekil 2-8: Otofaji ve kanserde mTOR/PI3K/Akt sinyal yolu (Chen ve ark., 2021).

2.3.1.4.2. Otofaji ve Kanserde AMPK (Adenozin Monofosfat ile Aktive Olan Protein Kinaz) Sinyal Yolu

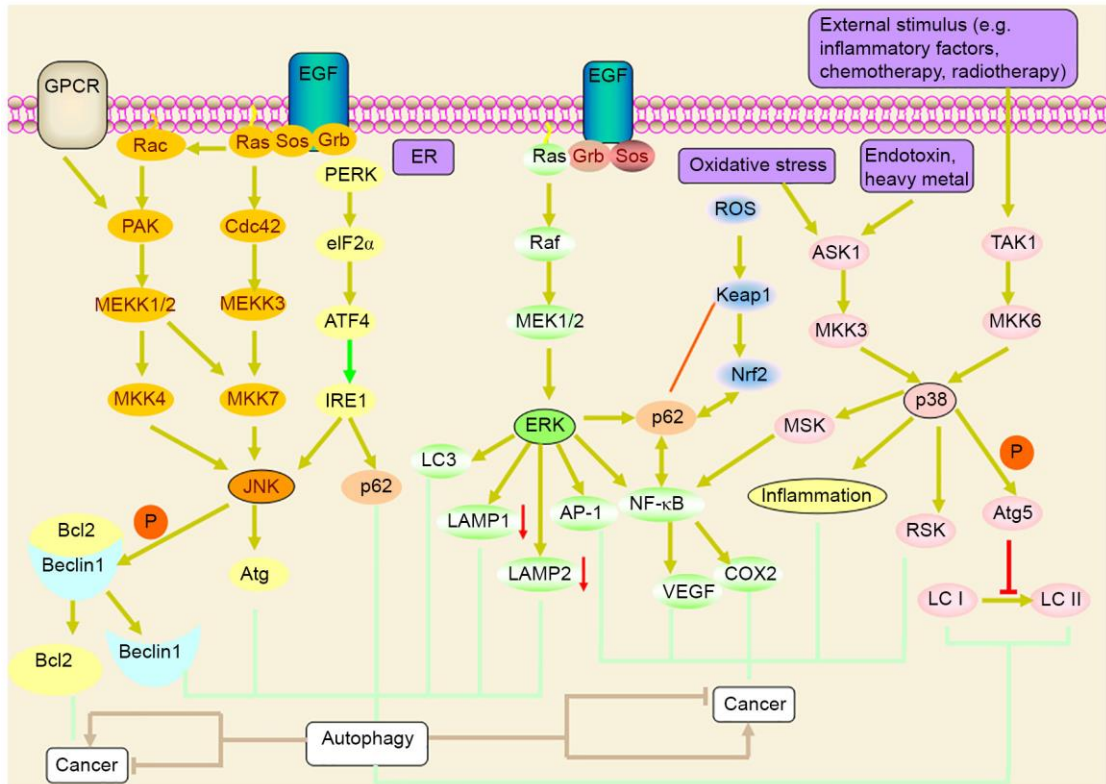
Bir hücrel enerji reseptörü olarak AMPK, yalnızca hücrel enerji homeostazının düzenlenmesinde değil, aynı zamanda kanserogenez ve antikanser ilaç direncinde de önemli bir rol oynar. AMPK, katalitik bir α -alt birimi ve düzenleyici β - ve γ -alt birimleri içeren bir heterotrimerik kompleks oluşturabilir. AMP'nin γ -alt birimine bağlanmasını takiben, allosterik aktivasyon kompleksi treonin 172'de fosforile edilir ve otofajiyi indükleyen alfa alt biriminin aktivasyon loop'u yukarı akış düzenleme ile LKB1 tarafından fosforile edilir. AMPK ayrıca aşağı akış faktörleri olan TSC2, p53 ve p27kip1 üzerinde de etki edebilir ve kanser oluşumuna ve gelişimine aracılık edebilir. (Şekil 2-9) (Chen ve ark., 2021).



Şekil 2-9: Otofaji ve kanserde AMPK sinyal yolu (Chen ve ark., 2021).

2.3.1.4.3. Otofaji ve Kanserde MAPK sinyal yolağı

MAPK, ERK, JNK/SAPKII ve p38-MAPK olmak üzere başlıca üç alt grubu içeren bir serin/treonin protein kinazdır. MAPK, B lenfosit tümör-2 gen (Bcl-2) ailesi proteinlerini düzenleyerek aşağı akış genlerinin ekspresyonunu düzenleyebilir. Bcl-2 ailesi proteinleri, anormal hücrelerin atılmasında anahtar düzenleyicilerdir ve hücre döngüsü düzenlemesi, hücre hayatta kalması ve ölümü, gen ekspresyonu ve hücre hareketi dahil olmak üzere hemen hemen tüm hücre patolojik ve fizyolojik süreçlerine katılırlar. JNK, Beclin'e bağımlı ve bağımsız sinyalleşme yoluyla otofajiyi düzenler. JNK, tümör tedavisi için potansiyel bir moleküler hedeftir. Hücreler, büyüme faktörleri, mitojenler ve çevresel uyaranlar tarafından uyarıldığında, Ras-Raf-MEK1/2-ERK kaskadı yoluyla aktive olan AP-1 ve NF- κ B nükleer transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunu düzenlerler. Hücre dışı stimülasyon (inflammatuar faktörler, endotoksin, ozmotik basınç, kemoterapi ve ultraviyole ışığı) veya hücre içi stimülasyon (oksidatif stres ve ağır metaller), sırasıyla TAK1-MKK6-p38 ve ASK1-MKK3-p38 kaskadları aracılığıyla MAPK p38'i aktive eder (Şekil 2-10) (Chen ve ark., 2021).



Şekil 2-10: Otofaji ve kanserde MAPK sinyal yolağı (Chen ve ark., 2021).

2.3.1.4.4. Otofaji ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, otofajinin nedenlerinden biridir. Reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi sadece otofajiyi değil, aynı zamanda Keap1-Nrf2 oksidatif stres sinyal yolunu da aktive eder. P62 sadece otofajide anahtar faktörlerden biri olarak işlev görmez, aynı zamanda p62 gen transkripsiyonunu indükleyen Nrf2 ve NF- κ B'yi de düzenler ve endoplazmik retikulum stresi p62 mRNA ekspresyonunu indükleyebilir. p62'nin birikmesi, NF-KB'nin aktivasyonuna yol açabilir ve NF-KB, VEGF ekspresyonunu indükleyerek ve anjiyogenezi arttırarak kanser oluşumuna yol açabilir. Ayrıca NF- κ B, COX-2 ve diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyerek tümör büyümesini destekleyebilir. Otofaji bozulduğunda, p62, Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) proteinine kompetitif şekilde bağlanarak Keap1-Nrf2 yolunu bloke eder ve Nrf2 sinyal iletimini arttırır. P62, Nrf2'nin transkripsiyonel hedefidir. Oksidatif stres koşulları altında, Nrf2, Nrf2'yi yeniden etkinleştirmek için artan p62'yi indükler. Aynı zamanda, p62'deki artış otofajiyi arttırır. ABRUS lektin (AGG), *Abrus precatorius* tohumlarından izole edilen bir heterotetramer tip II ribozomu inaktive eden proteindir. AGG, ROS yoluyla insan dili fosfor kanseri CAL33 hücre hattında otofajiyi indükler ve NRF2'yi p62'ye kadar düzenler. Bu nedenle AGG, otofaji yoluyla NRF2 bozulmasını indükler ve ağız kanseri tedavisinde kullanılabilecek ROS birikimine bağlı apoptoza yol açar (Chen ve ark., 2021).

interlökin (GM-CSF (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör), IL-1 ve IL-6) gibi sitokinleri yukarı regüle eden immün sistemi uyarıcı özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tavşanlara düşük dozlarda ML-I ve B zincirinin parenteral enjeksiyonu sonucunda doğal öldürücü hücre (NK) sitotoksitesi veya büyük granüler lenfosit yoğunluğu gibi hücresel konak savunma sisteminin parametrelerinde önemli artışlara neden olduğu gözlenmiştir (Hajito ve ark., 1990).

Bantel ve ark. (1999), ML-I'in sitotoksik etkilerine apoptoz indüksiyonu aracılık ettiği, lösemik T ve B hücrelerinin ML-I ile muamele edilmesi, apoptotik hücre ölümüne yol açan kaspaz-8/FLICE, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlandığı bildirmişlerdir.

Hücre yüzeyindeki glikana bağlanması, klatrin bağımlı ve bağımsız endositozu, endositik veziküllerden Golgi ağından ER'ye retrograd taşınması yolları, ML-I'in sitozoldeki moleküler hedefine ulaşması ve antiproliferatif ve proapoptotik aktivite sağlaması için çok önemli oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, ML-I'in, ABC taşıyıcıları yoluyla taşınan antikanser ilaçlarına zayıf yanıt veren çoklu ilaca dirençli tümör hücrelerinin yok edilmesi için uygulanabilen potansiyel bir sitotoksin olduğu sonucuna varılmıştır (Beztsinna ve ark., 2018).

ML'ler ribozomal inhibitör tip 2 proteinlerdir (RIP) ve heterodimerler oluşturmak üzere disülfid bağlarıyla bağlanan sitotoksik (A) ve karbonhidrat bağlayıcı (B) alt birimlerine sahiptir. Bununla birlikte, farklı şeker bağlama özellikleri vardır: ML-I, D-galaktoz ile, ML-III, N-asetil-galaktozamin ile ve ML-II, her ikisi ile etkileşime girer. RIP' olarak, ML'ler hücreleri B alt birimi aracılığıyla bağlar ve toksik A alt birimini sitoplazmaya iletir (Mazalovska ve Kouokam, 2020). B alt biriminin, bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen, ayrıca glioma hücreleri dahil olmak üzere bazı kanser hücrelerinde yukarı regüle edilen CD75 resptörüne bağlandığı, ML içeren ilaçların tümör hücresi motilitesini azalttığı, kanserle ilişkili genlerin ekspresyonunu değiştirdiği, hücre ölümünü indüklediği, tümör büyümesini azalttığı ve antikanser immün yanıtlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Okse otu ekstraktının, monosit türevli makrofaj aktivitesini uyardığını, dendritik hücre olgunlaşmasını tetiklediğini ve spesifik bir T-yardımcı hücre reaksiyonunu indüklediğini bildirilmiştir. Schötterl ve ark. (2018), T-hücresi aracılı glioma hücrelerinin ölümünde üç ML-1 içeren ilacın (ISCADOR Qu özü, rekombinant ML-1 Aviskumin ve saflaştırılmış doğal ML-1) immüno arttırıcı

etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemişler ve her üç ML-1 içeren preparatın, bağışıklık cevabı ile ilişkili genlerin ekspresyonunu modüle ettiği bildirmişlerdir.

Choi ve ark. (2004), Kore ökseotu olan *Viscum album* var. *coloratum* (VCA) ile muamele edilmiş A253 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla apoptotik hücre ölümünün indüklendiğini ve hTERT'nin transkripsiyonel aşağı regülasyonu ve Akt'nin fosforilasyonu yoluyla telomeraz aktivitesinin inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir.

Lyu ve ark. (2002), VCA'nın hem SK-Hep-1 (p53-pozitif) hem de Hep 3B (p53-negatif) hücrelerinde p53- ve p21-bağımsız yoluyla apoptozu indüklediğini gözlemişler ve her iki hücre hattında apoptozun indüklenmesi Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ve Bax'in yukarı regülasyonu ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Kim ve ark. (2004) hepatokarsinom Hep3B hücrelerinde VCA ile indüklenen apoptozda mitokondriyal geçiş geçirgenliği, Bax translokasyonu, sitokrom c salınımı, kaspaz-3 aktivitesi ve poli(ADP-riboz) polimeraz degradasyonu gibi hızlı değişiklikleri gözlemişlerdir. VCA'nın, ROS üretimini ve $\Delta\psi_m$ kaybını indükleyerek JNK fosforilasyonu yolu ile düzenlenen apoptozu neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Liu ve ark. (2009a) Con A'nın A375 hücreleri üzerinde kayda değer bir antiproliferatif etkiye sahip olduğunu, hemagglütinasyon, mannoz bağlama ve antiproliferatif aktiviteleri arasında bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada ilk olarak ConA'nın kaspaz bağımlı bir şekilde ve ayrıca mitokondriyal apoptotik yoluyla A375 hücre ölümünü indüklediğini bildirmişlerdir.

Dioclea violacea tohumları tarafından üretilen *Dioclea violacea* lektini (DVL), mannoz/glikoz özgüllüğü ve antikanser özellikleri gösteren bir diğer baklagil proteindir (Mazalovska ve Kouokam, 2020). Nascimento ve ark. (2018) DVL'nin C6 sıçan glioma hücre hattı üzerindeki etkileri incelemişler ve DVL ile muamelenin kaspaz-3 aktivasyonunu, apoptotik hücre ölümünü ve hücrel membran hasarını indükleyebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, DVL, mitokondriyal membran potansiyelini azalttığını ve asidik veziküllerin sayısını ve otofajik süreçlerin aktivasyonunu gösteren LC3'ün bölünmesini arttırdığını da gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada, DVL'nin kanserde aşırı eksprese edilen Akt, ERK1/2 ve TORC1 gibi efektörleri baskılayarak otofaji sürecini artırarak U87 hücrelerini inhibe ettiğini gösterilmiştir.

Dioclea lasiocarpa tohumlarından izole edilen DLL, A2780 (yumurtalık), A549 (akciğer), MCF-7 (meme) ve PC3 (prostat) dahil olmak üzere birçok insan karsinom hücre hattına karşı oldukça güçlü (düşük nanomolar) antiproliferatif aktivite gösterdiği

ve A2780 ile PC3 hücrelerine karşı ConM (*Canavalia maritima*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*) ve DSclerL (*Dioclea sclerocarpa*) lektinler kadar veya daha güçlü olduğu bildirilmiştir (Gondim ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, DLL'nin kaspaz-3 aktivasyonunu, otofajiyi ve ardından hücre ölümünü desteklediğini gösterilmiş ve DLL'nin glioma direncini azaltmak için alternatif bir tedavi olabileceğini ileri sürülmüştür (Nascimento ve ark., 2018).

Dioclea lasiophylla lektini (DlyL), *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth tohumlarından elde edilen mannoz spesifik bir karbonhidrat bağlayıcı proteindir. Kompleks veya hibrit N-glikan tiplerine karşı yüksek bir afiniteye sahiptir. DlyL, hücre göçünü inhibe ederek, kaspaz 3'ün aktivasyonu yoluyla otofajiyi ve hücre ölümünü indükleyerek sıçan C6 glioma hücrelerine karşı antitümör potansiyel gösterdiği bildirilmiştir (Leal ve ark., 2018).

Bauhinia forficata'dan izole edilen GalNac-spesifik baklagil lektini (BFL), kaspaz-9 baskılama ve ardından G2/M fazı durdurma yoluyla meme kanseri MCF7 hücrelerine karşı sitotoksikite gösterdiği bildirilmiştir (Cagliari ve ark., 2018). Ayrıca, BFL'in NCI-60 panelindeki çeşitli malign hücreleri inhibe ettiği ve melanom LOX IMVI hücrelerine karşı yüksek duyarlılık gösterdiği rapor edilmiştir (Lubkowski ve ark., 2017). *Bauhinia variegata* lektinin (BVL) mikromol düzeyde meme kanseri (MCF7) ve hepatoma (HepG2) hücrelerin (Lin ve Ng, 2008), *Bauhinia unguulate* lektinin (BUL) ise doza bağlı olarak kolon adenokarsinom (HT-29) hücrelerin (Silva ve ark., 2014) büyümesinin baskılayarak antitümör etki gösterdikleri gösterilmiştir.

Antiviral ve apoptoz indükleyici aktivitelere sahip yeni bir mannoz bağlayıcı lektin olan *Polygonatum odoratum* lektini (POL), *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce'nin rizomlarından izole edilmiş ve Vero hücrelerine karşı kayda değer bir anti-HSV-II aktivitesine, insan melanom A375 hücrelerine karşı sitotoksikiteye ve kaspaz bağımlı bir şekilde apoptozu indükleyici aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2011).

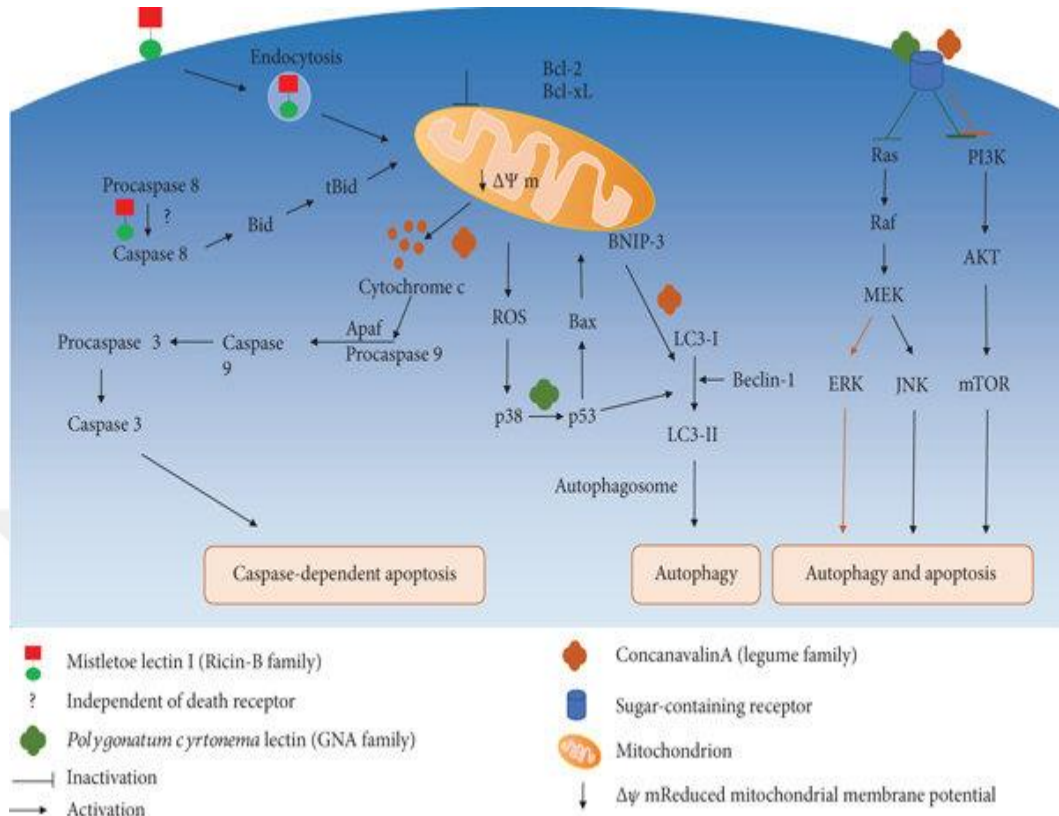
Üç tipik monokot mannoz bağlayıcı lektin (*Ophiopogon japonicus* lektini, OJL; *Polygonatum cyrtoneura* lektini, PCL ve *Liparis novae* lektini, LNL), kaspaz bağımlı yoluyla MCF-7 hücrelerinde apoptozu indükledikleri Liu ve ark. (2009b) tarafından rapor edilmiştir.

PCL'nin Ras-Raf ve PI3K-Akt sinyal yolunu baskılamak suretiyle fare fibrosarkom L929 hücrelerinde otofaji ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Liu ve ark.,

2010b). Başka bir çalışmada, PCL'nin, normal melanositlere karşı düşük toksisite gösterirken, insan melanoma A375 hücrelerinin büyümesini belirgin şekilde engellediği, ayrıca mitokondriyal membran potansiyelin redüklenmesi, sitokrom salınımı ve kaspaz aktivasyonuna yol açan Bax ve Bcl-2 düzenlenmesi ile apoptozu indüklediği, A375 hücrelerinde otofajiye katkıda bulunan p38 ve p53 aktivasyonunun yanı sıra ROS üretimini de arttırdığı, bu da PCL'nin her iki hücre ölüm mekanizmasını aynı anda tetiklediği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada PCL'nin A549 hücrelerinde ROS'a bağlı MAPK ve NF- κ B yolu düzenlemesi yoluyla otofajik ve apoptotik ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016).

Remusatia vivipara lektini (RVL), güçlü nematisidal aktiviteye sahip *Remusatia vivipara* (Araceae) tarafından üretilen başka bir mannoz bağlayıcı proteindir. RVL, N-bağlı glikanlara yüksek afinite gösterirken, ancak O-bağlı glikanlar ve monosakkaritler ile etkileşim göstermediği saptanmıştır. Apoptoz yoluyla meme kanseri MDA-MB-468 ve MCF-7 hücreleri üzerinde inhibitör ve antihücre göçü etkileri bildirilmiştir (Sindhura ve ark., 2017).

Antitümör etkileri yanında konkanavalin A'nın farelerde otoimmün hepatiti indükleyebilen bir T hücresi mitojeni olduğu, NK hücrelerinin tetiklenmesi ve ardından CD4+T hücrelerinin aktivasyonu yoluyla farelerde hepatiti indüklediği gösterilmiştir (Lei ve Chang, 2007). İn situ hepatom modelinde, hücre zarları üzerindeki yüksek mannoz kalıntılarına spesifik bağlanması yoluyla karaciğer nodüllerinde biriken Con A'nın, hepatoma hücrelerini doğrudan otofajiye maruz bırakmakla kalmadığı, aynı zamanda bağışıklık hücrelerini karaciğere aktive ettiği ve topladığı, gelişen hepatik inflamasyon daha sonra tümöre karşı adaptif immün yanıtını indüklediği ve karaciğer tümörünün gerilemesine yol açtığı gözlenmiştir. Hem immünomodülatör hem de otofajiyi indüksiyon yoluyla antitümör aktivite gösteren mannoz spesifik lektinlerin bulunması, antikanser bileşikler olarak doğal lektinler için yeni keşif yolları açmıştır. Şekil 2-12'de bazı lektinlerin apoptoz ve/veya otofajiyi düzenleyen sinyal yolları gösterilmiştir.



Şekil 2-12: Apoptoz ve/veya otofajide yer alan seçilmiş bitki lektinleri sinyal yolları (Mazalovska ve Kouokam, 2020).

2.3.1.5. İmmunomodülatör Aktivite

Bağışıklık sistemi, konakçıyı patojenlere, yabancı maddelere ve doku hasarına karşı koruma yeteneğine sahip hücrel ve humoral bileşenlerden oluşan bir konak savunma sistemidir. Doğuştan gelen bağışıklık ve adaptif bağışıklık olarak ikiye ayrılabilir. Evrimsel olarak korunan ve patojenle ilişkili moleküler yapılar (PAMP'ler) olarak adlandırılan patojen türevli ligandların konakçı doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından tanınmasına yapı tanıyan reseptörler (PRR'ler) aracılık eder. PRR, Toll benzeri reseptörler (TLR), nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanları (NOD) benzeri reseptörler (NLR), retinoik asit ile indüklenebilir gen (RIG)-I benzeri reseptörler (RLR), DNA sensörleri ve C tipi lektin reseptörler (CLR) ana sınıflara ayrılır. C-tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), fagositoz, antijen işleme ve sunumu ve ardından T hücresi aktivasyonu gibi antiviral bağışıklık tepkilerini aktive etmek için viral patojenlerde

bulunan glikanları algılayabilen PRR'lerdir. Doğuştan gelen bağışıklıkta yer alan miyeloid CLR'ler, patojenlerde ve ayrıca konakçı hücrelerde bulunan glikolipidlerin ve glikoproteinlerin tanınmasında uzmanlaşmış glikan bağlayıcı reseptörlerdir. Dendritik hücre ve makrofaj gibi antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından eksprese edilen CLR'ler, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler dahil olmak üzere patojenler üzerinde bulunan PAMP'leri ve hasarlı host hücrelerindeki DAMP'leri tanıyabilir ve dolayısıyla antijen işleme ve sunumu için patojenlerin alımında ve ardından T hücresi aktivasyonunda rol oynar (Monteiro ve Lepenies, 2017). Endozomlarda ve lizozomlarda işlenmeleri ardından meydana gelen fragman peptidler, histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II ve MHC sınıf I moleküllerine yüklenerek CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin hazırlanmasını sağlar (Şekil 2-13).

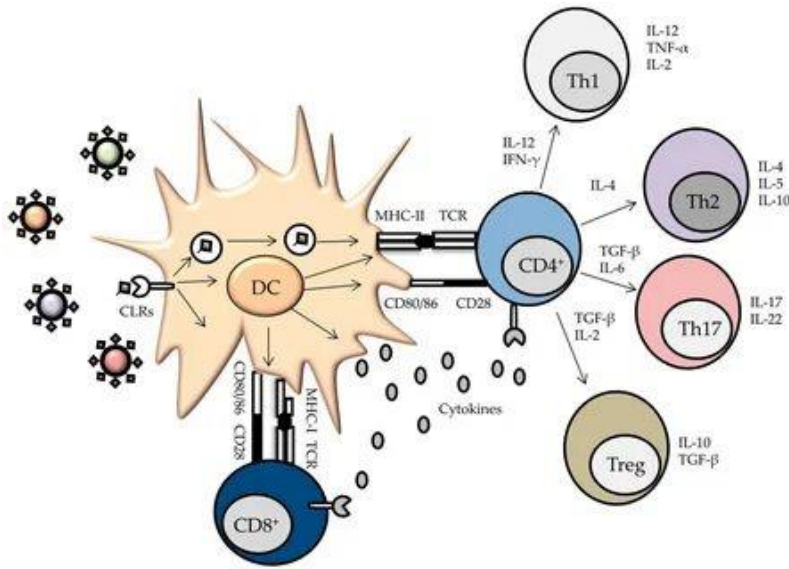
Proliferatif ve bağışıklık tepkileri, bağışıklık sistemi bileşiklerinin etkili fonksiyonlarını belirleyen spesifik sitokinler ve hücreler tarafından yönlendirilir. İnterlökin 2 (IL-2), bağışıklık sistemi hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden önemli bir sitokindir. Bu sitokin, esas olarak aktifleştirilmiş CD4+ ve CD8+ T lenfositleri, dendritik hücreler ve timik düzenleyici T (Treg) hücreleri tarafından üretilir ve *in vitro* olarak T hücre büyümesini aktive eder. IFN- γ , konak savunmasını, inflamasyonu ve otoimmüniteyi düzenleyen, aktive edilmiş alt küme T hücreleri ve NK hücreler tarafından salgılanan bir sitokindir. İnterlökin (IL-6), aktive edilmiş lenfoid hücreler ve çeşitli lenfoid olmayan hücreler tarafından üretilen çok işlevli bir sitokindir. Hemopoez, immün yanıtlar ve akut faz reaksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar (Melo ve ark., 2011).

Birçok immünomodülasyon mekanizması bitki lektinlerine atfedilmiştir. Fitohemaglutinin (PHA), kırmızı barbunya fasulyesinden (*Phaseolus vulgaris*) elde edilen N-asetilgalaktozamine spesifik bir lektindir ve lenfositlere mitojenik ajan olarak tanımlanan ilk lektinlerden biridir.

Kore ökseotu lektini (KML), çeşitli sitokinlerin (IL-3, IL-23 ve TNF- α), ROS oluşumunu, fagositik alımını, ko-uyarıcı moleküllerin (CD80 ve CD86), adezyon moleküllerin (CD29) ve PRR'lerin (detectin-1 ve TLR-2) yüzey seviyelerinin ekspresyonunu modüle ettiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2007).

Konkanavalin A, *Canavalia ensiformis* tohumlarından izole edilen mannoz/glikoz spesifik bir lektindir ve lektin-karbonhidrat etkileşim çalışmalarında

model olarak kullanılan bazı lektinler arasındadır. Con A'nın CD4⁺ T hücreleri üzerinde mitojenik ve antitümöral olduğu rapor edilmiştir. Con A ayrıca sitotoksiktir; hücre zarı glikoproteini veya polisakkaritinin mannoz kalıntısına bağlandıktan sonra, kltrin aracılı endositoz yoluyla içselleştirilir, daha sonra tercihen mitokondride birikir. Bunun sonucunda mitokondrinin membran geçirgenliği değişir ve otofaji yolunun aktive edilmesiyle tümör hücrelerin ölümüne yol açar. Con A, diğer lektinlerin immünomodülasyon etkisini değerlendirilmesinde pozitif kontrol olarak yaygın olarak kullanılır (Lei ve Chang, 2007). *Abrus precatorius* kaynaklı aglutini, splenosit aktivasyonu ve IL-2, IFN γ ve TNF α sitokin üretiminin uyarılması yoluyla Th1 immün cevabın bir indükleyicisi olarak rapor edilmiştir (Tripathi ve Maiti, 2005). *Canavalia brasiliensis* tohumlarından elde edilen bir mannoz bağlayıcı lektin olan ConBr, *in vitro* splenositler üzerinde mitojenik aktivite gösterdiği, IL-2, IL-6 ve IFN- γ ekspresyonunu arttırdığı, IL-10 ekspresyonunu ise azalttığı bildirilmiştir (Silva ve ark., 2011). *Cratylia mollis* baklagil tohumlarından saflaştırılan mannoz bağlayıcı lektinlerin izoformları, Cramoll 1 ve Cramoll 1,4'in *in vitro* olarak yüksek insan T lenfosit mitojenini uyarma potansiyeli göstermiştir (Maciel ve ark., 2004). Başka bir çalışmada Cramoll 1,4 lektini, daha önce Con A ve Cramoll lektinleri ile aşılınmış farelerde hücresel ve humoral parametreler yoluyla proliferatif bir tepkiye neden olduğu gözlenmiş ve immünostimülatör deneylerde mitojenik bir ajan olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Oliveira ve ark., 2013).



Şekil 2-13: İmmunomodülatör Aktivite (Monteiro ve Lepenies, 2017).

2.3.1.6. Antimikrobiyal Etki

Lektinlerin antibakteriyel etkisi, lektin ile bakterinin hücre zarı üzerindeki spesifik reseptörleri arasındaki etkileşiminden ileri geldiği öne sürülmüştür. Bakteriyel membran reseptörleri ile etkileşime girmesi nedeniyle lektinler, konformasyonel değişiklikleri indükleyerek bakterilerin hücre metabolizmasında bir değişikliğe yol açar. Örneğin, ApulSL lektini farklı bakterilerin hücre duvarında bulunan N-asetilglukozamin için özgüllüğe sahip olduğu için antibakteriyel etkinliği, N-asetilglukozamin kalıntılarına bağlanma özgüllüğüne atfedilir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler arasındaki yapısal fark, farklı bir antibakteriyel aktiviteye yol açabilir, çünkü lektinin, bir Gram-negatif suşun dış zarını ve hücre duvarını geçerek sonunda periplazmik boşluğa ulaşması daha karmaşıktır. Gram pozitif bakteriler tarafından eksprese edilen yüksek seviyedeki peptidoglikan ise aksine, lektin ile daha fazla etkileşim bölgesi sağlar. Bugüne kadar geniş bir antibakteriyel aktivite sergileyen lektinler, her lektinin karbonhidrat spesifitesine göre etki ettiği için ekstrakte edilen bitki türlerine göre farklı bir performansa sahip olmanın mümkün olduğu ileri sürülmüştür. 2011'den 2020'ye kadar olan dönemde bitki lektininin antibakteriyel aktiviteleri Silva (2021) tarafından özetlenmiştir.

2.4. Amaranthus

Amaranthus, Amaranthaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Amaranthus adı, genel olarak, sonsuz veya solmayan anlamına gelen Yunanca “Anthos” (Çiçek) kelimesinden türetilmiştir. Şu anda aynı zamanda üçüncü milenyum mahsul bitkisi olarak da adlandırılmaktadır. Amaranth türü esas olarak yaklaşık 400 türden oluşur ve bunlardan çok azı dünya çapında bulunur (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.1. Tarihçe

Tarihsel kanıtlar, Amaranthus'un yetiştiriciliğinin yaklaşık 8000 yıl önce Güney ve Orta Amerika'daki Maya uygarlığında kullanılmaya başladığını göstermektedir. En önemli tarihsel kanıtlar, amaranthların Aztek uygarlığı sırasında Meksika'da *huahtli* olarak adlandırılan temel bir gıda olduğunu desteklemektedir. Aztekler, onlara güç veren sihirli özelliklere sahip olduğuna inanıyorlarmış. Bu inanıştan dolayı Amaranthus, dini uygulamalarda tahıl olarak kullanılmıştır. Ancak 1500'lerde İspanyol fatihler,

dünyanın diğer bölgelerinde *Amaranthus*un üretilmesini teşvik eden Aztek kültürünü ve dinini bastırmak için *Amaranthus*'un yetiştirilmesini yasaklamışlardır. Günümüzde Aztek'te sadece sınırlı miktarda tahıl yetiştirilmekte ve bal ile karıştırılarak “alegría” şeker üretiminde ve “tole” içeceğin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Tarihsel kanıtlar, soluk tohumlu amaranthın on altıncı yüzyılda Almanya'da da yetiştirildiğini göstermiştir. 1700'lerde Avrupa'ya yayılmış ve süs bitkisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1800'lerde Nepal'in dağ vadisinde ve doğu Afrika'nın bazı bölgelerinde yetiştirildiği ve daha sonra on dokuzuncu yüzyılda Himalayalar'a, iç Çin'e ve doğu Sibirya'ya yayıldığı bildirilmiştir. Avrupa'da süs amaçlı, Afrika'da ise sebze amaçlı dikilmiştir. Sadece Himalaya bölgesinde küçük bir tahıl olarak yenmiş ve muhafaza edilmiştir. Yirminci yüzyılda Çin, Hindistan, Afrika ve Avrupa'nın yanı sıra Kuzey ve Güney Amerika'da da yetiştirilmeye başlanmıştır. ABD, perakende gıda ürünlerinde kullanılan tahıl amaranthının önde gelen üreticisi olmasına rağmen, son on yılda en büyük üretim alanının Çin'de olduğuna inanılmaktadır. Çinliler amaranthı tahıl olarak hasat etmek yerine domuzları beslemek için yem olarak kullanmaktadırlar. Antik Yunanistan'da *Amaranthus*, *Chrusanthemon* ve *Elichusos* olarak adlandırılmış ve ayrıca Efes Artemis için kutsal olmuş. Amaranthın iyileştirici özelliği olduğunu ve tanrıların ve mezarların dekorasyonunda ölümsüzlüğün sembolü olarak kullanıldığını varsaymışlardır. Yunan mitolojisinde, *Amaranthus*, bir avcı ve Euboea adasının kralıymış. Tanrıça Artemis tarafından sevildiğine ve ona av sırasında eşlik ettiğine inanılıyormuş. Ama Poseidon'a sebepsiz yere hakaret ettiği için, tanrılar onu denize atmak için dev bir dalga göndermiş ve boğulmuştur. Artemis daha sonra onu kutsal bitkisi olan amaranth çiçeğine dönüştürmüştür. Ayrıca Pagan kabilelerinin defin törenlerinde *Amaranthus* kullandıkları bildirilmiştir (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.2. Kimyasal Bileşimi

Nişasta *Amaranthus* tohumların ana bileşenidir ve gıdaların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Amaranth tohumlarından elde edilen yağ, yüksek miktarda omega yağ asitleri içermektedir. Amino asit bileşimi bakımından, Amaranth tahılı alanin, serin, valin, lösin, izolösin, fenilalanin, triptofan, arginin, prolin, metionin gibi önemli amino asitlerin zengin bir kaynağı olduğunu ve bu da Amaranth'ın besleyici tahıl yerine kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Amaranth tahılı diğer tahıllara kıyasla benzersiz olan çok yüksek lizin seviyelerine sahiptir. *Amaranthus*, riboflavin, C ve E vitamini gibi

gerekli günlük miktardaki vitaminlere sahip olduğu ve vitamin eksikliğini azaltmak için mükemmel bir kaynak olabileceği ileri sürölmüştür. Ayrıca lif ve mineraller bakımından zengin bir kaynaktır (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.3. Kullanılışı

2.4.3.1. Gıda Olarak

Amaranthus önemli bir besin mahsulüdüdür. Yaprakları sebze, tohumları tahıl olarak yenen nadir bir bitkidir. İçerdikleri protein, yağ, lif ve geleneksel tahıllara göre daha yüksek miktarda lizin içermesi bakımından besin değeri yüksek olan Amaranth tohumları ekmek, makarna ve bebek mamasının bileşeni olarak kullanılmaktadır. Amaranthus unu birçok ölkede tek başına veya diğer tahılların unları ile karıştırılarak ekmek ve pasta yapımında kullanılmaktadır (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.3.2. Boya Olarak

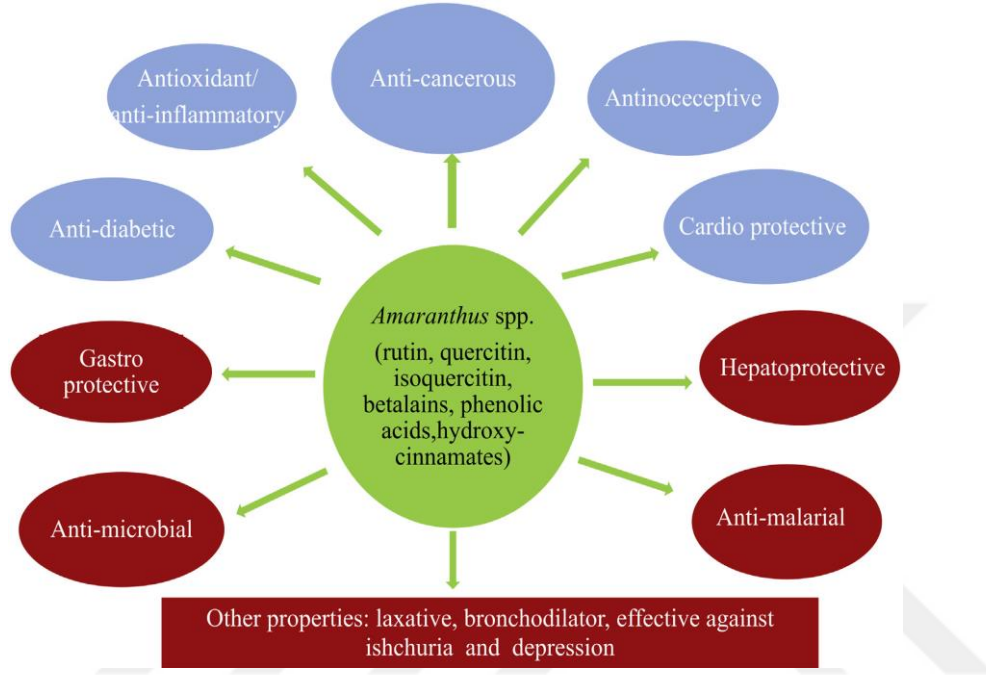
Son 20 yıldır sentetik boyaların yerini doğal pigmentlerin alması yönünde artan bir eğilim vardır. Bu amaçla Amaranth bitkisinin tamamı sarı ve yeşil boyaların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bitkide bulunan kırmızı pigment, gıda ve ilaçlarda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Amerika'da kökler, şap mordanlı açık sarı, kromlu bronz, bakırlı hafif zeytin, kalaylı açık altın, demirli gri ve mordansız fildişi gibi çok az solan renklerin elde edilmesinde kullanılır. Bolivya ve Kuzeybatı Arjantin'de, insanlar alkollü içecekleri renklendirmek için Amaranthus yapraklarının kırmızı boyasını kullanırken, Meksika ve Güneybatı Amerika Birleşik Devletleri'nde mısır hamurunu renklendirmek, Ekvador'da ise yiyecek ve içecekleri renklendirmek için kullanılır (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.3.3. Etnobotanik Kullanılışı

Amaranthus'un çeşitli türleri geçmişte dünya çapında ilaç üretimi için kullanılmıştır ve çabalar devam etmektedir. Ayurveda tıbbında bitki idrar söktürücü, öksürük ve soğuk algınlığında, idrar ve boğaz rahatsızlıklarında, mide problemleri için kullanılır. Kolay sindirilebilir yaprakları öksürük ve soğuk algınlığında, şişlikte ve zehir tedavisinde panzehir olarak kullanılır (Rastogi ve Shukla, 2013).

2.4.4. Biyolojik Aktiviteleri

Amaranthus türlerinin farmakolojik özelliklerinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları Şekil 2-14'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-14: Amaranthus türlerinin farmakolojik özelliklerinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara dayalı şematik gösterimi (Peter ve Gandhi, 2017).

Bazı bitki türlerinin farmakolojik değerlendirmesinden elde edilen bulgular, hedeflenmemiş hücrelere zarar vermeden kanser hücresi büyümesi üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri nedeniyle kanser için alternatif tedavi olarak bitki kaynaklı ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızlanmıştır. Amaranthların, kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilen birçok biyoaktif bileşikler açısından zengin bir kaynak olarak değerlendirilmiştir.

Amaranthaceae ailesinden *Amaranthus caudatus*'un toksik aglutinin içerdiği ve serolojik özgüllüğü olmadığı, serum glikoproteinleri tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir. Bu lektinin ayrıca domuz lenfositlerine karşı mitojenik olmadığı, izole edilmiş eritrosit membran proteinleri ile zayıf reaksiyona girdiği ve bu nedenle hücre yüzeyine özgü bir reaktif olarak kabul edildiği kanıtlanmıştır (Pardoe ve ark., 1970). Amarantinin karbonhidrat bağlama bölgesi, T-antijenin sialile edilmiş varyantlarını da

tanıldığı ve bu özellik, kolon ve serviks kanserlerinin histokimyasal çalışmalarında başarıyla uygulandığı bildirilmiştir (Boland ve ark., 1991). Ayrıca, amarantinın insan kolon kanser hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi de rapor edilmiştir (Yu ve ark., 2001; Santaella-Verdejo ve ark., 2007). *A. caudatus* hemaglutininin aksine *A. leucocarpus* lektini, fetuin gibi serum glikoproteinleri tarafından inhibe edildiği, mitojenik olduğu ve toksik olmadığı bildirilmiştir (Zenteno ve Ochoa, 1988). Quiroga ve ark. (2015), *A. caudatus*'tan izole edilen amaranth lektinin rafine lektinden beş kat daha güçlü antiproliferatif etki gösterdiğini gözlemlemiştir. Silva-Sánchez ve ark. (2008), *Amaranthus hypochondriacus* tohumlarından izole edilen lunasin peptidinin antikanserojenik aktivitesini araştırmıştır. *A. mantegazzianus* tohumlarından izole edilen proteinin antiproliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Barrio ve Añón, 2010).

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgular, antioksidanların, özellikle sebzelerden elde edilen flavonoidlerin, kronik hastalıkların azalmasına katkıda bulunan temel faktörler olduğunu kanıtlamıştır. *Amaranthus hypochondriacus* L. (Nsimba ve ark., 2008; Lopez ve ark., 2011; Lopez-Mejia ve ark., 2014), *Amaranthus cruentus* R 104 ve *Amaranthus cruentus* M7 (Nsimba ve ark., 2008), *Amaranthus viridis* L. (Iqbal ve ark., 2012; Ahmed ve ark., 2013), *Amaranthus caudatus*, *A. paniculatus* ve *Amaranthus cruentus* (Klimczak ve ark., 2002; Escudero ve ark., 2011) tohumlarının antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve *Amaranthus* tohumlarının doğal antioksidan aktiviteye sahip değerli bir kaynak olduğu ileri sürülmüştür.

Zambrana ve ark. (2018), *A. caudatus* tohumlarından hazırlanan hidroetanol ekstrenin, Goto-Kakizaki ve Wister sıçanlarında, insülini artırarak ve glukoz toleransını iyileştirerek antidiyabetik etki gösterdiği bildirilmiş ve *A. caudatus*'un insanda tip 2 diyabette nutrasötik tedavi olarak kullanılmaya aday olabileceği sonucuna varılmıştır.

Amaranthus hypochondriacus'e dayalı diyetin etanol ile indüklenmiş karaciğer hasarına olumlu etkisi olduğu rapor edilmiştir (Lopez ve ark., 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

- Affinite kromatografisinde elüatların toplanmasında, fraksiyon toplayıcı (Gilson FC 204)
- Antioksidan aktivite tayinlerinde, su banyoları (Thermomix BU ve Grant SB2)
- Buz Makinesi (Eurfrigor)
- Buzdolabı (Ariston)
- Cam kolon (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Sweden)
- Çalkalamalı İnkübatör (N-Biotek)
- Çalkalayıcı (IKA KS260)
- Değirmen
- Dondurucu (Nuaire) (-80°C)
- Etüv (Heraeus)
- Hassas Terazî (AND HM 200)
- Hemaglutinasyon aktivitesi tayininde, ışık mikroskobu (Olympus)
- Manyetik karıştırıcı (Kermanlar)
- Mikro-plaka Okuyucu (Eon Biotek)
- Pipet takımı otomatik (Gilson ve Eppendorf)
- pH metre (Radiometer 92)
- Rotaevaporatör (Büchi Rotavapor R-200A)
- SDS-PAGE Jeli (Bio-Rad 456-9031)
- Soğutmalı Santrifüj (Gyrozen)
- Sonikatör
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208)
- Su Banyosu (Memmert) (37°C'lik)

- Ultra Saf Su Cihazı (Elga)
- Ultrafiltrasyon hücresi (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730 U.S.A.) ve ultrafiltrasyon membranı (Amicon, PM 10)
- Vertikal jel elektroforez cihazı (GIBKO BRL Model V 15.15 No 21080–015)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Vorteks karıştırıcı (VELP Scientifica)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fenol bileşiklerin tayininde Folin-Ciocalteu (FC) ayırıcı (Sigma F9252), sodyum karbonat (Merck 106398) ve standart olarak galik asit (Sigma G7384) kullanıldı.

Lipozom peroksidasyonu üzerine inhibe edici etkinin tayininde L-askorbik asit (Sigma A5960), α -tokoferol (Sigma T3376), n-butanol (Merck 100988), butillenmiş hidroksitoluen (Fluka 34750), ferri klorür (Merck 803945), soya L- α -fosfatidilkolin (Tip IV-S; Sigma P3644), tiyobarbitürik asit (TBA; Merck 108180) ve trikloroasetik asit (TCA; Merck 100810) kullanıldı.

DPPH• giderici aktivitesi tayininde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma D-9132) ve metanol (Merck 106008) kullanıldı.

Süperoksit radikali giderici aktivitesi tayininde etilendiamin tetraasetik asit (Sigma E5134), ksantin (Fluka 95490), ksantin oksidaz (Sigma X1875), nitroblue tetrazolium (Fluka 74032) ve potasyum hidroksit (Merck 105021) kullanıldı.

ABTS^{•+} giderici aktivitesi tayininde 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asid) amonyum tuzu (Fluka 11557), potasyum peroksodisülfat (Merck 105090) ve standart olarak 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid (troloks) (Fluka 56510) kullanıldı.

İndirgeme gücü tayininde (FRAP deneyinde) demir sülfat (Fluka 44970), glasiyel asetik asit (Merck 23332325), sodyum asetat (Merck 106264) ve 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Merck 110 238), kullanıldı.

Asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) enzimi inhibitör aktivitenin tayinlerinde AChE (Sigma-Aldrich C3389), BuChE (Sigma-Aldrich C7512),

asetiltiyokolin iyodür (Sigma 01480), butiriltiyokolin iyodür (Sigma-Aldrich B 3263), 5,5'-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (D8130), sodyum bikarbonat (Merck 6323) kullanıldı.

COX inhibe edici aktivitenin tayininde COX inhibitör kiti (COX inhibitor screening assay kit, Cayman Chemical, 560131) ve standart madde olarak indometazin (Cayman Chemical, 70270) kullanıldı.

Amonyum sülfatla çöktürmede amonyum sülfat (Merck 101217) kullanıldı.

Protein miktar tayininde Bikinkoninik Asit Kiti (Sigma B9643, BCA1) kullanıldı.

Affinite kromatografisinde siyanojen bromür ile aktive edilmiş Sefaroz 4B (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sweden, Kod. No. 17-0430-01) ve uygun ligantın seçiminde laktoz (Merck 7656), N-asetil-D-galaktozamin (Sigma A2795), N-asetil-D-glukozamin (Fluka K6478), D-fukoz (Sigma F8150), D-galaktoz (Merck 4060), D-glukozamin hidroklorür (Fluka K5402), maltoz (Merck 5911), D-mannoz (Fluka 232576), D-metil- α -D-mannopiranoz (Sigma M6882), 4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit (Fluka 73673), 4-nitrofenil- β -Dglukopiranozit (Fluka 73676), D-rafinoz (Fluka 223802) ve ovalbumin (BDH Chemicals, Poole, England, 33008) kullanıldı.

Tamponların hazırlanmasında glisin (Merck 500188), dipotasyum hidrojen fosfat (Merck 105101), potasyum dihidrojen fosfat (Merck 4873), sodyum bikarbonat (Merck 6323), sodyum fosfat dibazik (Riedel 04272), sodyum fosfat monobazik (Riedel 04270), sodyum asetat (Merck 106264), sodyum klorür (Sigma S9625), Tris baz (Sigma T6066), kullanıldı.

Poliakrilamit jel elektorforezinde Coomassie brillant blue R-250 (Fluka 27816) ve protein marker (Invitrogen LC5615) kullanıldı.

3.3. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *Amaranthus lividus* L. bitkisi Bartın İlinden Prof. Dr. Ayşe CAN tarafından temin edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (ISTE)'nda 83401 numara ile kayıtlıdır.



Şekil 3-1: *Amaranthus lividus* syn. *blitum*
(<http://www.guenther-blaich.de/pflseite.php?par=Amaranthus+blitum>).

3.4. *A. lividus* Tohumlarından Hazırlanan Etanol Ekstrenin Hazırlanması

40 g bitkisel materyal üzerine 200 mL etanol ilave edildi. 24 saat süreyle Soxhlet apareyi kullanılarak ekstraksiyon gerçekleştirildi ve sonrasında rota evaporatör yardımıyla etanol uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre analizlerde kullanılıncaya kadar +4 °C' de bekletildi. Ekstre verimi % 2,8 olarak hesaplandı.

3.5. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

3.5.1. Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini

3.5.1.1. Prensibi

Slinkard ve Singleton'un (1977) geliştirmiş olduğu metod kullanılarak Folin-Ciocalteu (FC) ayırıcı ile total fenolik bileşik miktarı hesaplandı.

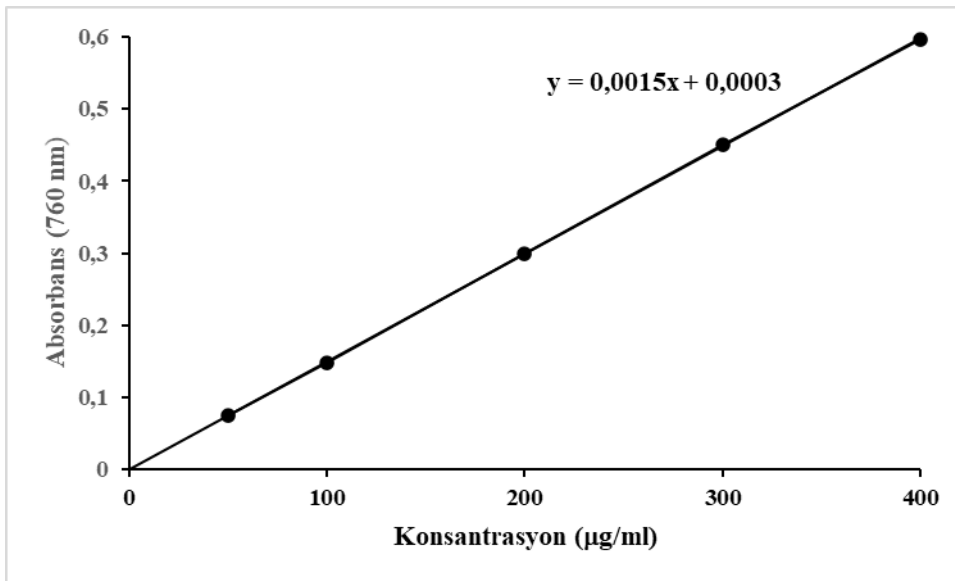
FC metodu, karbonat çözeltisi ile sağlanan alkali ortamda fenol bileşiklerin molibdotungstofosfat heteropolianyon ayırıcı ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$) ile oksidasyonu sonucunda meydana gelen mavi rengin absorbansının 760 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (Apak ve ark., 2016).

3.5.1.2. Yapılışı

0,1 ml ekstre (20-80 mg/ml) 4,5 ml distile su ve 1/3 oranında seyreltilen 0,1 ml Folin-Ciocalteu ayırıcı ile 0,3 ml % 2 sodyum karbonat çözeltisinden ilave edildikten sonra tüpler vorteks mikserde karıştırıldı ve 2 saat bekletilmesi sonucunda meydana gelen mavi rengin absorbansı ekstrenin yerine 0,1 ml distile su ilavesiyle hazırlanan köre karşı 760 nm’de ölçüldü. Gallik asit (50 - 400 µg/ml) standart eğrisine ait değerlerin ekstre değerlerinin karşılaştırılmasıyla elde edilen sonuçlar gallik asit ekivalanları (GAE)/g ekstre olarak ifade edildi. Deney üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı.

3.5.1.3. Gallik Asit Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Gallik asidin 1000 µg/ml’lik stok çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml olan çözelti elde edildi. Çözeltilere Folin-Ciocalteu metodu uygulandıktan sonra oluşan rengin absorbansı 760 nm’de ölçüldü. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla gallik asit standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil3-2).



Şekil 3-2: Gallik asit standart eğrisi ve regresyon denklemi.

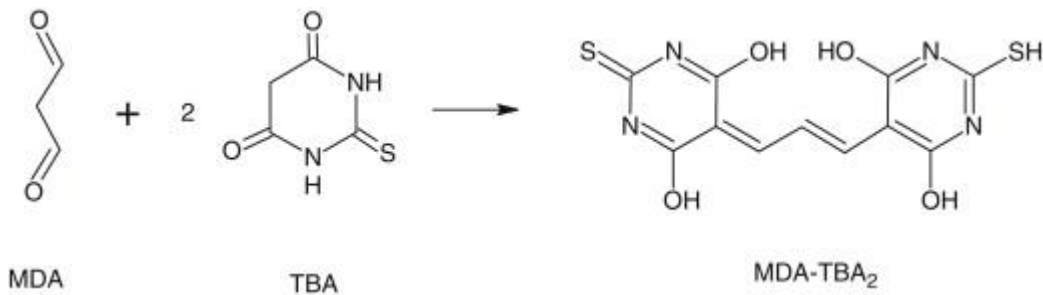
3.5.1.4. A. *lividus* Tohumlarından Hazırlanan Etanol Ekstrenin Demir (III) - Askorbik Asit ile başlatılmış Fosfatidilkolin Lipozomlarının Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Lipid peroksidasyonu, hücrel oksidatif stresin bir belirtici olarak kullanılmaktadır.

Lipozomlar, lipid peroksidasyonu tayin etmek için bir biyolojik membran model sistemi olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, soya fosfatidilkolininden (lesitinden) hazırlanan lipozomlardan oluşturulan suni lipid sisteminin Fe^{2+} - askorbik asit ile başlatılan lipid peroksidasyonun üzerinde ekstrenin antioksidan etkisi incelenmiştir.

3.5.1.4.1. Prensibi

Ekstrenin lipid peroksidasyonuna karşı inhibitör aktivitesi Duh ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre yapıldı. TBA (tiobarbitürik asit) testi, MDA'nın (malondialdehit) TBA ile reaksiyona girerek oluşan tiyobarbitürik asit reaktif türlerin (TBARS) 532 nm'de gösterdikleri pembe rengin absorbansının ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: TBA metodun prensibi.

3.5.1.4.2. Kullanılan Çözeltiler

TCA/TBA Ayıracı

6 g trikloroasetik asit ve 0,15 g tiyobarbitürik asit 40 ml 0,25 N HCl'de (1 N HCl'in 4 kez seyreltilmesiyle hazırlandı) hafif ısıtılarak (60 - 70°C'de) çözünmesi ile hazırlandı.

3.5.1.4.3. Yapılışı

10 mg/ml fosfolipit lipozomları içeren süspansiyon, 300 mg lesitinin 30 ml 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0) 5 dakika sonike edilerek (9 cycle/ 26 % power) hazırlandı. 31,25 µl ekstre (10 - 80 mg/ml) veya referans madde olarak kullanılan α-tokoferol (0,04-0,625 mg/ml) ve gallik asid (0,31-2,5 mg/ml)'e 125 µl lipozom süspansiyonu ve 125µl 400 µM FeCl₃ ilave edildikten sonra reaksiyon 125 µl 400 µM askorbik asit ilavesi ile başlatıldı. Reaksiyon karışımı 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA metodu ile tayin edildi (Buege ve Aust, 1978). 125 µl reaksiyon karışımına 250 µl TCA - TBA ayıracı ve 14 µl % 2'lik BHT'nin absölü etanoldeki çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı vortekste karıştırıldı ve 100°C'de 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra 1 ml n-butanol ilave edildi ve 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki organik tabaka alındı. Meydana gelen pembe rengin absorbansı 532 nm'de ölçülerek ekstrenin lipid peroksidasyonunu inhibe edici yüzdesi Denklem 3-1'e göre hesaplandı.

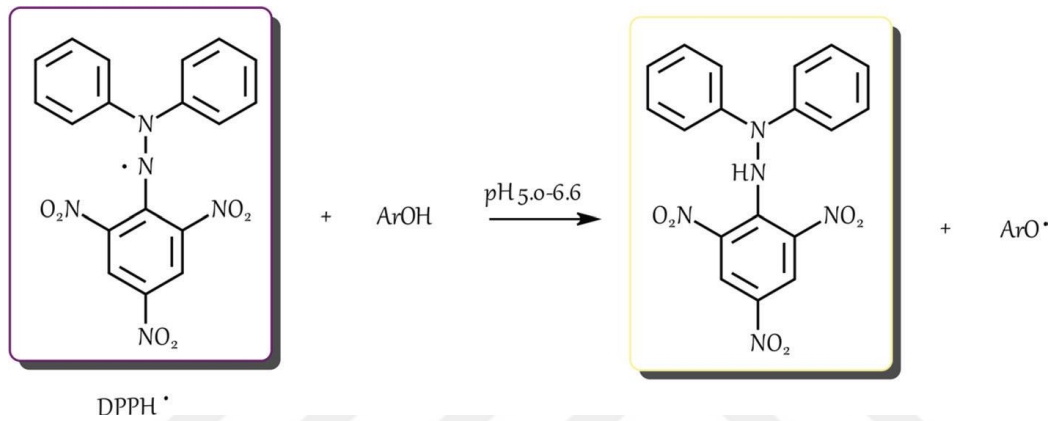
$$\text{İnhibisyon(\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 532 nm'deki absorbans}}{\text{Kontrolün 532 nm'deki absorbans}}\right) \times 100 \quad (3-1)$$

3.5.2. DPPH Radikali Giderici Aktivitesi Tayini

3.5.2.1. Prensibi

DPPH radikali giderici aktivitesi Brand-Williams ve arkadaşları (1995) tarafından geliştirilen metoda göre tayin edildi.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•])'in yapısındaki aromatik halkanın pi elektronları elektron eksikliğini kompanse edebildikleri için stabil serbest radikali olarak tanımlanır. DPPH[•] diğer birçok serbest radikaller gibi dimerize olmaz. Elektronların delokalizasyonu, 517 nm'de absorpsiyon gösteren koyu viole rengin oluşmasına sebep olur. DPPH[•] çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir bileşik ile reaksiyona girerek oluşan redüklenmiş formu (DPPH-H) rengin açılmasına ve absorbansın azalmasına yol açar (Sanches ve ark., 2019).



Şekil 3-4: Bir antioksidan tarafından DPPH[•]'in indirgenmesi (Sánchez ve ark, 2019).

Şekil 3-4'den görüldüğü gibi antioksidan (ArOH) bir bileşiği hidrojen atomu vererek zincir reaksiyonu durduran daha kararlı ve stabil moleküler yapının oluşmasına neden olur. Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali (ArO[•]) başka radikallerle reaksiyona girerek stabil bir molekül oluşur (DPPH-OAr, ArO-OAr).

3.5.2.2. Kullanılan Çözeltiler

1 M DPPH[•] Stok Çözeltisi

9,85 mg DPPH[•] metanolde çözüldükten sonra hacim 25 ml'ye metanol ile tamamlanması ile hazırlandı.

60 x 10⁻⁵ M DPPH[•] Çalışma Çözeltisi

6 ml 1 M DPPH[•] stok çözeltisinin 100 ml'ye metanol ile tamamlanması ile hazırlandı.

3.5.2.3. Yapılışı

3,9 ml DPPH•'ın metanoldeki çözeltisi (6×10^{-5} M), 0,1 ml ekstre (10-80 mg/ml) veya referans madde olarak kullanılan α -tokoferol (0,04-0,625 mg/ml), askorbik asit (0,02-0,16 mg/ml) ve gallik asit (0,01-0,08 mg/ml)'e ilave edildikten sonra 30 dakika karanlıkta bekletildi. Meydana gelen rengin absorbanısı 517 nm'de metanole karşı okundu. Ekstrenin yerine metanol ve standart ilave edilerek hazırlanan sırasıyla negatif ve pozitif kontroller paralel olarak çalışıldı. DPPH radikali giderici aktivitesi Denklem 3-2'e göre hesaplandı.

$$\text{DPPH radikali giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 517 nm'deki absorbanısı}}{\text{Kontrolün 517 nm'deki absorbanısı}}\right) \times 100 \quad (3-2)$$

3.6. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesi Tayini

3.6.1. Prensibi

Süperoksit radikali giderici aktivitesi Aruoma ve arkadaşlarının (1989) geliştirdiği metoda göre tayin edildi. Deney, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi sonucunda oluşan mavi - mor renkli formazonların 560 nm'de absorbanlarının okunması esasına dayanır.

3.6.2. Yapılışı

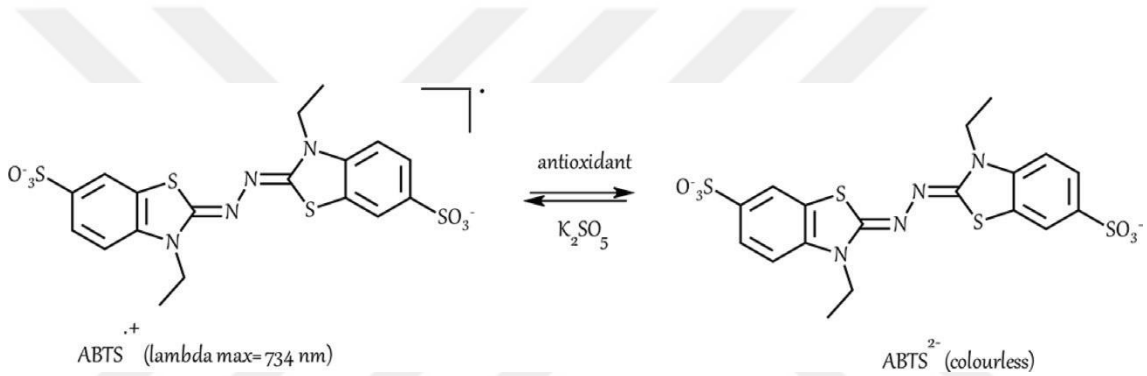
100 μ l ekstre (10-80 mg/ml) veya referans madde olarak kullanılan α -tokoferol (0,16-1,25 mg/ml), askorbik asit (0,08-0,625 mg/ml) ve gallik asit (0,08-0,625 mg/ml), 100 μ l 3 mM NBT, 100 μ l 30 mM EDTA, 10 μ l 50 mM KOH'de çözünmüş 30 mM ksantin ve 2,59 ml 57,5 mM KH_2PO_4 - KOH, pH 7,4 (50 mM) karıştırıldı. Reaksiyon 100 μ l 1,5 U ksantin oksidaz'ın ilave edilmesiyle başlatıldı. 5 dakika bekletildikten sonra absorbanlar 560 nm'de köre karşı okundu. Süperoksit radikali giderici aktivitesi Denklem 3-3'e göre hesaplandı.

$$\text{Süperoksitradikali giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 560 nm'deki absorbanısı}}{\text{Kontrolün 560 nm'deki absorbanısı}}\right) \times 100 \quad (3-3)$$

3.7. Troloks Ekvivalan Antioksidan Kapasitesi (TEAC) Deneyi

3.7.1. Prensibi

TEAC deneyi Re ve arkadaşlarının (1999) modifiye ettikleri metoda göre yapıldı. 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiozin-6sulfonik asit) amonyum tuzu ($ABTS^{2-}$), peroksitlerin varlığında antioksidan örneklerin reaktivitesini değerlendirmek için kullanılan bir hedef moleküldür. ABTS, başlangıçta potasyum persülfat ile oksidasyon reaksiyonuna tabi tutularak dayanıklı bir bileşik olan mavi yeşil renkli $ABTS^{•+}$ radikal katyonuna dönüşür ve antioksidan bileşiğin ilave edilmesinden sonra renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak 734 nm’de ölçülmesine dayanır (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: $ABTS^{•+}$ nin antioksidan bileşikleriyle reaksiyonu (Sánchez ve ark., 2019).

3.7.2. Kullanılan Çözeltiler

7 mM $ABTS^{•+}$ stok çözeltisinin hazırlanması: 19,20 mg 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asid) amonyum tuzu 2,5 ml 4,9 mM potasyum peroksodisülfat çözeltisinde çözündü ve 12 - 16 saat bekletildi.

4,9 mM Potasyum peroksodisülfat çözeltisinin hazırlanması: 0,132 g potasyum peroksodisülfat distile suda çözündü ve hacim 100 ml’ye tamamlandı.

$ABTS^{•+}$ çalışma çözeltisinin hazırlanması: $ABTS^{•+}$ stok çözeltisinin 734 nm’de absorbansı 0.70 ($\pm$ 0.02) olacak şekilde % 96’lık etanol ile seyreltilmesi suretiyle hazırlandı.

3.7.3. Yapılışı

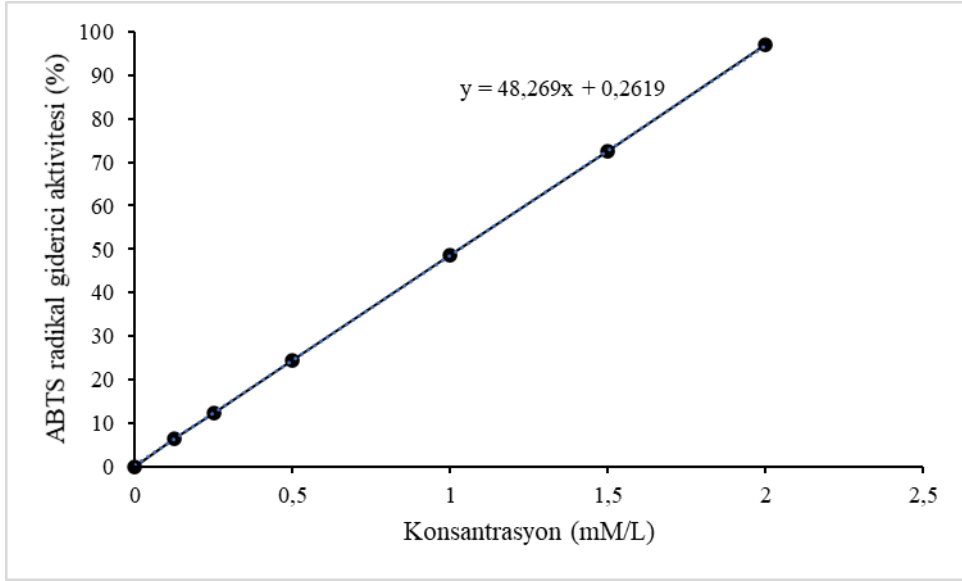
990 µl ABTS çalışma çözeltisine 10 µl ekstre (20 - 80 mg/ml) veya referans madde olarak kullanılan α-tokoferol (0,16-1,25 mg/ml), askorbik asit (0,04-0,625 mg/ml), gallik asit (0,02-0,31 mg/ml) veya Troloks ilave edilmesi ile renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 6. dakikada 734 nm’de ölçüldü. Ekstre veya standart çözeltileri yerine aynı miktarda % 96’lık etanol kullanılması suretiyle hazırlanan sırasıyla negatif ve pozitif kontroller paralel olarak çalışıldı. ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi Denklem 3-4’e göre hesaplandı.

$$\text{ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Ekstrenin 734 nm'deki absorban}}{\text{Kontrolün 734 nm'deki absorban}}\right) \times 100 \quad (3-4)$$

Troloks standart eğrisine ait değerlerle ekstrenin veya standartın inhibisyon yüzdeleri ile karşılaştırılmasıyla, 1 mM Troloks’un gösterdiği inhibisyon yüzdesine eşdeğer inhibisyon yüzdesi göstermesi için gerekli olan ekstrenin konsantrasyonu hesaplandı ve TEAC değeri olarak ifade edildi.

3.7.4. Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Troloksun 10 mmol’lük stok çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 2 mmol, 1.5 mmol, 1 mmol, 0.5 mmol, 0.25 mmol ve 0.125 mmol olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere TRAP deneyi uygulandıktan sonra renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm’de 6. dakikada ölçüldü ve troloksun ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplandı. Deney beş kez tekrarlandı ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla, regresyon denklemi elde edildi ve standart eğrisi çizildi (Şekil 3-6).

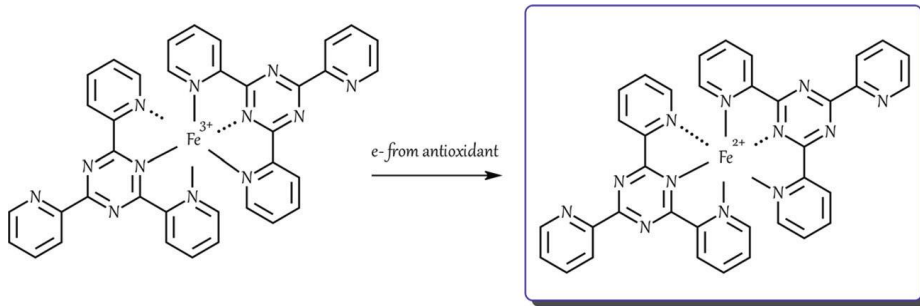
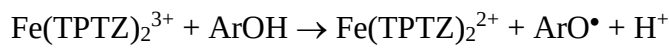


Şekil 3-6: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.8. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Deneyi

3.8.1. Prensibi

İlk olarak Benzie ve Strain (1996) tarafından plazmanın antioksidan kapasitesini belirlemek için tanıtilen ve daha sonra çay ve şarap gibi diğer matrislere uygulanmak üzere modifiye edilen FRAP deneyi, asidik pH'da Fe(II) ile mavi renkli bir kompleks oluşturan tripiridiltiazin tridentat ligandın varlığında antioksidanlar tarafından Fe(III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesine dayanır (Şekil 3-7).



Şekil 3-7: Bir antioksidan varlığında FRAP deneyin etki mekanizması (Sánchez ve ark., 2019).

3.8.2. Kullanılan Çözeltiler

FRAP Ayıracı: 2,5 ml 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinin, 2,5 ml 10 mM TPTZ'nin 40 mM HCl'deki çözeltisi ve 25 ml 0.3 M asetat tamponun (pH 3,6) karıştırılması ile hazırlandı.

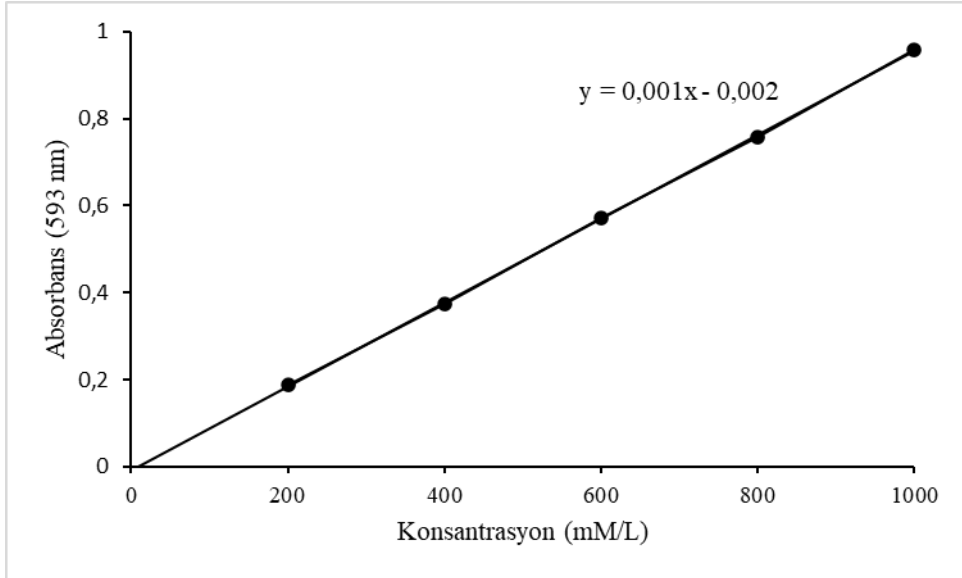
0.3 M Sodyum Asetat Tamponu (pH 3,6): 3,1 g Sodyum asetat. $3\text{H}_2\text{O}$, 800 ml distile suda çözüldü ve glasiyal asetik asit ilave edilerek pH'sı 3,6'ya ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.8.3. Yapılışı

900 μl taze hazırlanan ve 37°C 'de inkübe edilen FRAP ayıracına 90 μl distile su ve 30 μl ekstre (20 - 80 mg/ml) veya referans madde olarak kullanılan α -tokoferol (0,16-1,25 mg/ml), askorbik asit (0,02-0,625 mg/ml) ve gallik asit (0,02-0,31 mg/ml) ilave edildikten sonra 593 nm'de absorbans artışı 4. dakikada spektrofotometrede ayıraç körüne karşı ölçüldü. Ekstrenin $\Delta A_{593\text{nm}}$ değeri, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (200 - 1000 μM) ile hazırlanan standart eğrisine ait $\Delta A_{593\text{nm}}$ değerlerle karşılaştırılmak suretiyle FRAP değeri (mM/L Fe^{2+}), 1 mM Fe (III)'ün Fe (II)'e indirgenmesi olarak ifade edildi.

3.8.4. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ın 1000 μM 'lık stok çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 800 μM , 600 μM , 400 μM ve 200 μM olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere FRAP deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 4. dakikada 593 nm'de köre karşı ölçüldü ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-8).

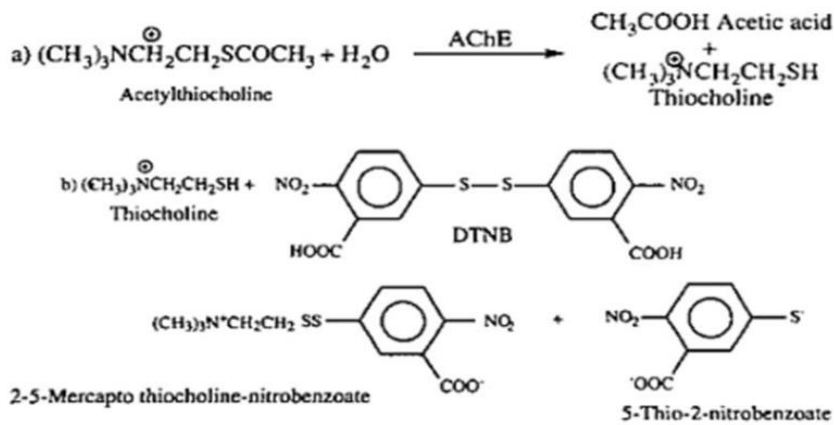


Şekil 3-8: FeSO₄.7H₂O standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.9. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibe Edici Aktivitenin İncelenmesi

3.9.1. Prensibi

Asetilkolinesteraz aktivitesi Ellman ve arkadaşlarının (1961) geliştirdiği metoda göre yapıldı. AChE aktivitesi, DTNB'nin asetiltiyokolin ile indirgenmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin (TNB) absorbansında dakikada meydana gelen artışın 412 nm'de 10 dakika süreyle mikropilaka okuyucuda ölçülmesiyle belirlendi (Şekil 3-9).



Şekil 3-9: Asetilkolin esteraz aktivite tayininde kullanılan Ellman metodun prensibi.

3.9.2. Kullanılan Çözeltiler

Ellman ayıracı: 1,5 mg sodyum bikarbonat içeren 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,5), 75 mM asetiltiyokolin iyodür veya butiriltiyokolin iyodür ve 10 mM DTNB (3,96 mg/ ml)'nin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki çözeltisi (pH 7,5), son konsantrasyonları 95 mM, 1 mM ve 0,3 mM olacak şekilde 150:2:5 oranında karıştırılması ile hazırlandı.

3.9.3. Yapılışı

İnhibitör olarak kullanılan ekstrenin metanoldeki 10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin etanol ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 5; 2,5; 1,25; 0,625 ve 0,31 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Mikroplakadaki kuyucuklara 5 µl inhibitör ve 5 µl AChE (1 U) veya BuChE (5,4 U) enzimi ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra Ellman ayıracı çözeltilerinden 190 µl ilave edildi. Paralel olarak inhibitör içermeyen negatif kontrol deneyleri, inhibitör çözeltileri yerine aynı miktarda metanol kullanılması suretiyle gerçekleştirildi. AChE inhibe edici aktivitesi Denklem 3-5'e göre hesaplandı.

$$\text{AChE inhibe edici aktivitesi (\%)} = 1 - \frac{\text{Ekstrenin 412 nm'deki absorbansı}}{\text{Kontrolün 412 nm'deki absorbansı}} \times 100 \quad (3-5)$$

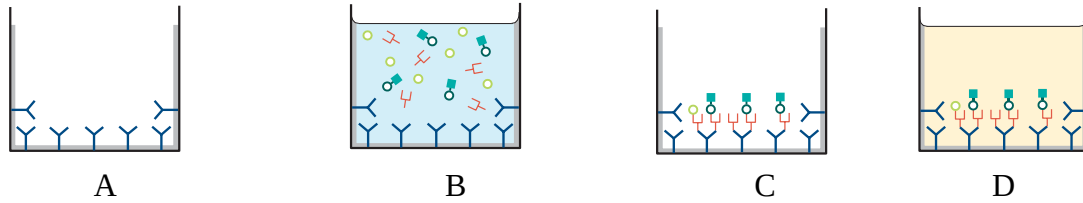
3.10. Siklooksijenaz (COX) İnhibe Edici Aktivitenin İncelenmesi

3.10.1. Prensibi

Deney, sınırlı miktarda prostaglandin (PG) antiserumu için PG'ler ve bir PG asetilkolinesteraz (AChE) konjugatı (PG izleyici) arasındaki rekabete dayanmaktadır. PG konsantrasyonu değişirken, PG izleyicinin (tracer) konsantrasyonu sabit tutulduğundan PG antiserumuna bağlanabilen PG izleyicinin miktarı kuyucuktaki PG konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Bu tavşan antiserum-PG kompleksi (serbest veya izleyici), daha önce kuyucuğa eklenmiş bir fare monoklonal anti-tavşan antikoruna bağlanır. Plaka, bağlanmamış reaktifleri uzaklaştırmak için yıkanır ve ardından AChE

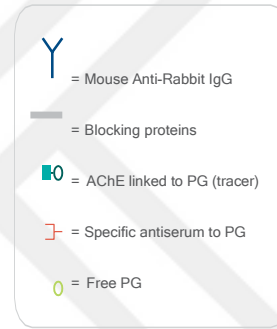
substratı içeren Ellman ayıracı eklenir. Enzimatik reaksiyonun sonunda meydana gelen ve 412 nm’de absorbiyon gösteren sarı rengin şiddeti, kuyucuğa bağlanan PG izleyici miktarı ile orantılıdır, bu da inkübasyon sırasında kuyuda bulunan serbest PG miktarı ile ters orantılıdır (Denklem 3-6) (Şekil 3-10).

$$\text{Absorbans} \times [\text{Bağlı PG tracer}] \times 1/[\text{PG}] \quad (3-6)$$



Şekil 3-10: AChE ELISA'nın şematik gösterimi.

A: Plaka önceden tavşan anti-IgG ile kaplanmış ve özel bir protein formülasyonu ile bloke edilmiştir.
 B: Tracer, antiserum ile birlikte standard veya örnek inkübasyonu
 C: Bağlanmamış ayıracı yıkama ile uzaklaştırılması
 D: Ellman ayıracı ilave edilerek sarı rengin oluşması



3.10.2. Yapılışı

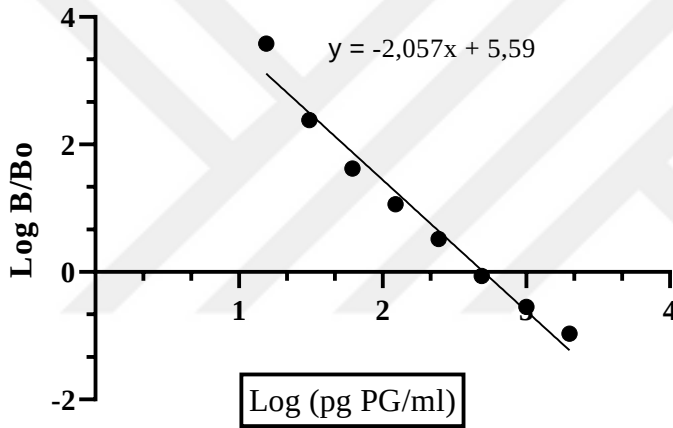
160 µl reaksiyon tampona, 10 µl Hem, 10 µl COX-1 veya COX-2 enzimi ve 10 µl ekstre (20-80 mg/ml) veya referans madde olarak indometazin (12,5 ve 50 µg/ml) ilave edildi. Reaksiyon karışımı 37°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra 10 µl araşidonik asit eklenerek reaksiyon başlatıldı. İki dakika 37 °C’de bekletildikten sonra 30 µl SnCl₂ çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Ekstrenin yerine etanol ilave edilerek hazırlanan inhibitör körü (%100 başlangıç aktivite) ve inaktif enzim içeren enzim körü (BC, background) paralel olarak çalışıldı.

Enzim körü 1:100 oranında, inhibitör körü, ekstre ve standart karışımları ise 1:2000 oranında ELISA tamponu ile seyreltildikten sonra herbirinden 50 µl mikrolarka kuyucuklarına alınarak, üzerlerine 50 µl AChE-PG ve 50 µl ELISA antiserumu eklendi. Plak, mikrolarka çalkalayıcıda 18 saat inkübe edildikten sonra boşaltılıp yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Kuyucuklara Ellman ayıracından 200 µl

eklendi ve çalkalayıcıda karanlıkta 90 dakika bekletildikten sonra gelişen sarı rengin absorbansı mikropılaka okuyucuda 412 nm’de ölçüldü.

3.10.3. Prostaglandin Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

PG’nin 2000 pg/ml’lik stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin seyreltilmesiyle konsantrasyonları 1000 pg/ml; 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, test protokolü uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile PG’nın standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-11).



Şekil 3-11: PG standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.11. İstatistiksel Değerlendirme

GraphPad Prism 9.00 programından yararlanılarak EC₅₀ değerleri hesaplandı. Test edilen ekstrelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Student’s t testinden yararlanıldı. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

3.12. A. *lividus* Tohumlarından Lektin Elde Edilmesi

3.12.1. Ham Ekstrenin Hazırlanması

30g tohum değirmende toz haline getirildi. 300 ml PBS ilave edildi ve 2 saat +4°C’de karıştırılarak bekletildikten sonra 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Çökelti atıldı ve üstteki berrak sıvı **ham ekstresi** olarak adlandırıldı.

3.12.2. A. *lividus* Tohum Lektinin % 50 Amonyum Sülfat Konsantrasyonunda Çöktürülmesi

Ortamdaki konsantrasyonu % 50 olacak şekilde ham ekstreye amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra 4°C’de 4 saat bekletildi. Karışım 13,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra, supernatant atıldı, çökelti ise çözünbileceği en az miktardaki PBS ile çözüldü ve 4°C’de PBS’e karşı diyaliz edildi. Çözünmemiş katı partikülleri uzaklaştırmak üzere çözelti tekrar 4°C’de 13,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Supernatant **% 50 amonyum sülfat kesiti** olarak adlandırıldı, hemaglutinasyon aktivitesi ve protein miktarı tayin edildikten sonra affinite kolon kromatografisine uygulandı.

3.12.3. % 4’lük Eritrosit Süspansiyonunun Hazırlanması

2 ml taze A grubu Rh+ insan kanı 6 mg sodyum oksalat içeren dereceli tüpe aktarıldı ve üzerine 3 ml % 0,9 NaCl çözeltisi ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 2,300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve çöken eritrositlerin üzerindeki plazma renksiz olana kadar santrifüj işlemi tekrarlandı. Üstteki supernatan uzaklaştırıldı ve çöken eritrosit hacmi, Denklem 3-7’den hesaplanan total hacme % 0,9 NaCl ile tamamlandı.

$$\text{Total hacim} = \frac{\text{Çöken eritrosit hacmi}}{\text{İstenen \% eritrosit konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3-7)$$

3.12.4. Hemaglutinasyon Aktivitesi Tayini

Mikrotitrasyon plağın ilk kuyucuğuna 50 µl lektin çözeltisi, diğer 9 kuyucuğa 25’er µl % 0,9 NaCl çözeltisi kondu ve yarı yarıya seyreltme yöntemi kullanılarak seyreltme oranları sırasıyla 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64; 1: 128, 1: 256 ve 1:

512 olan lektin çözeltileri hazırlandı. Her kuyucuğa % 4'lük eritrosit süspansiyonundan 25'er µl kondu ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra hemaglutinasyon aktivitesi gözle ve ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Hemaglutinasyon aktivite hemaglutinasyon birimi (HB) olarak ifade edildi. Bir hemaglutinasyon birimi, deney koşullarında belirgin (+++) hemaglutinasyon aktivitesi gösteren en az lektin miktarı olarak tanımlandı ve Denklem 3-8'e göre hesaplandı. Şekil 3-12 ve Şekil 3-13'te ışık mikroskobu ile olan görüntüleri gösterilmiştir.

$$Hb / mg = \frac{D_a \times D_b \times S}{V} \quad (3-8)$$

V) 1. kuyucuktaki lektin çözeltisinin hacmi (ml)

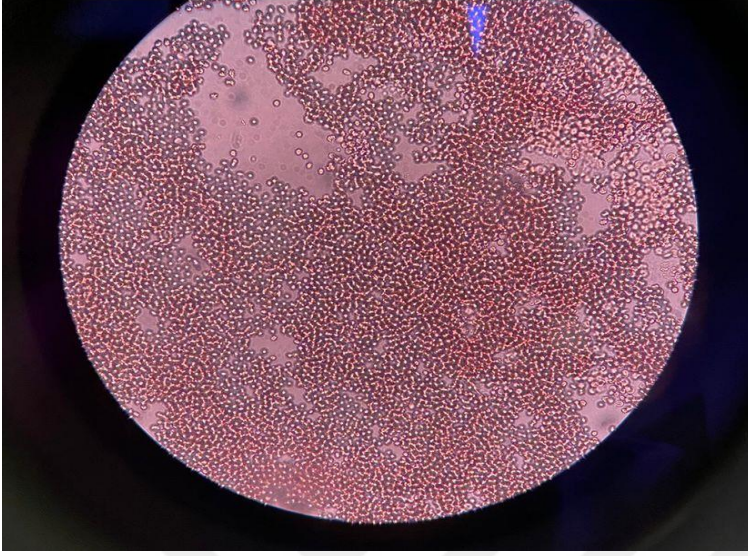
D_a) 1. kuyucuktaki lektin çözeltisinin seyreltme oranı (hiç seyreltilmemiş lektin çözeltisi, 1: 1)

D_b) 1 HB aglutinasyon aktivitesi gösteren kuyucuktaki lektin çözeltisinin seyreltme oranı.

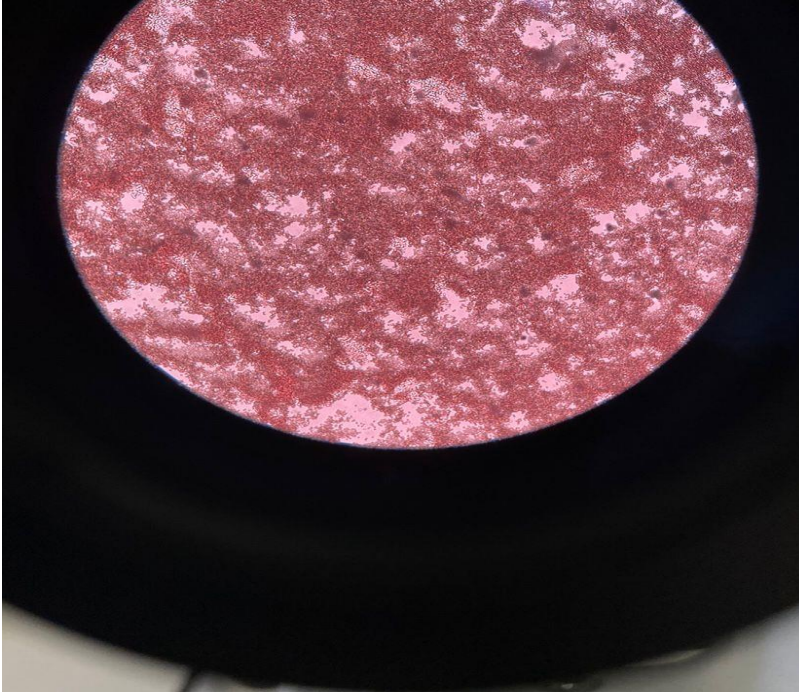
S) 1. kuyucuktaki mg/ml lektin (protein) miktarı.

3.12.5. Lektinin Özgül Karbonhidrat Biriminin Belirlenmesi - Hemaglutinasyon İnhibisyon Aktivitesi Testi

Mikrotitrasyon plağın ilk kuyucuğuna 50'er µl karbohidratlar (100 mM) veya ovalbuminin (10 mg/ml) % NaCl'deki çözeltilerinden, diğer 7 kuyucuğa 25'er µl % 0,9 NaCl çözeltisi konuldu ve yarı yarıya seyreltme yöntemi kullanılarak seyreltme oranı 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 ve 0,78 olan karbohidrat çözeltileri elde edildi. Tüm kuyucuklara 25 µl, daha önce HA titresi belirlenen lektin çözeltisi konulduktan sonra 1 saat oda ısında bekletildi. Daha sonra kuyucuklara, % 4'lük eritrosit süspansiyonundan 50'şer µl ilave edildi ve hemaglutinasyon inhibisyonu gözle ve ışık mikroskobu altında değerlendirildi.



Şekil 3-12: Hemaglutinasyon aktivitesi (HA) testi 10x ışıık mikroskobu görünümü

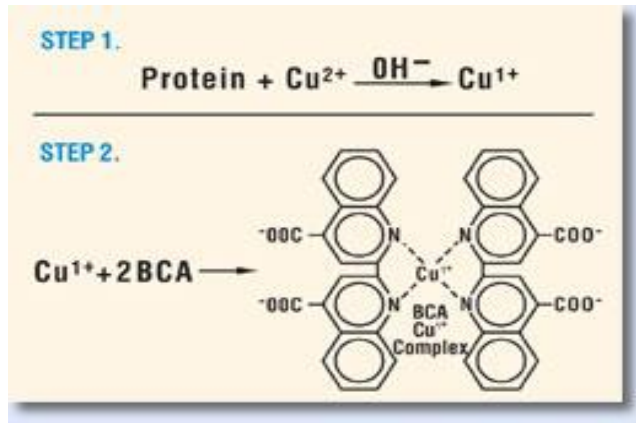


Şekil 3-13: Hemaglutinasyon aktivitesi (HA) testi 40x ışıık mikroskobu görünümü

3.13. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

3.13.1. Prensibi

Yöntem, alkali ortamda proteinlerle kompleks oluşturan Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve Cu^{+1} 'nin BCA ile reaksiyona girerek mor-mavi bir renk oluşturulması esasına dayanır (Şekil 3-14).



Şekil 3-14: BCA içeren protein tahlili için reaksiyon şeması (<http://www.qcbio.com/pierce/23221.htm> adresinden alıntıdır).

3.13.2. Kullanılan Çözeltiler

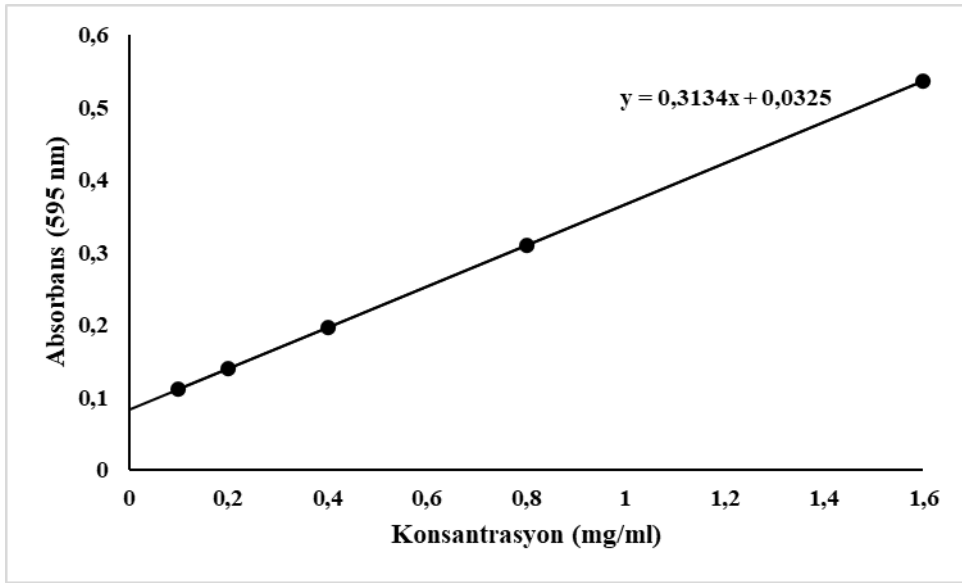
BCA Çalışma Ayıracı: 50 mL BCA solüsyonuna (pH 11,25) 1 mL % 4'lük bakır (II) sülfat pentahidrat çözeltisi eklenerek taze olarak hazırlandı.

3.13.3. Yapılışı

96 kuyucuklu mikropalak kuyucuklara 10 μL örnek ve 80 μL BCA çalışma ayıracı eklendi. Plaka oda ısısında 2 saat inkübe edildikten sonra absorbanslar 562 nm'de ayıraç körüne karşı okundu. Bu absorbans değerinin, sığır serum albumini standart eğrisine uygulanmasıyla, protein miktarı mg/ml olarak belirlendi.

3.13.4. Sığır Serum Albumini Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Sığır serum albuminin distile sudaki 1,6 mg/ml’lik stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0,8 mg/ml; 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml ve 0,1 mg/ml olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere, ayrı ayrı, BCA deneyi uygulandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler yönteminin uygulanması ile sığır serum albumini standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi (Şekil 3-15).



Şekil 3-15: BSA standart eğrisi ve regresyon denklemi.

3.14. Siyanojen Bromür (CNBr) ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Affinite Kromatografisi

3.14.1. Prensibi

Siyanojen bromürün, Sefaroz üzerindeki hidroksil gruplarıyla reaksiyona girmesi sonucunda reaktif siyanat ester grupları oluşur. Proteinler, peptitler, amino asitler veya nükleik asitler, hafif koşullar altında, birincil amino grupları veya benzer nükleofilik gruplar yoluyla CNBr ile aktive olan Sefaroz'a bağlanabilir. Aktive edilmiş gruplar, izoüre bağlantıları oluşturmak için ligand üzerindeki birincil amino gruplarıyla reaksiyona girer.

3.14.2. Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz-4B Jelin Hazırlanması

3 g Sefaroz-4B tartıldı ve 1 mM HCl'de 1 saat bekletilerek şişmesi sağlandı. Şişmiş jel, 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) birleştirici tamponu ile yıkandı.

3.14.3. Ligantın (Ovalbumin) Siyanojen Bromür ile Aktive Edilmiş Sefaroz 4B Jeline Bağlanması

Bir glikoprotein olan ovalbumin içeren tüpte hemaglutinasyon aktivitesi gözlenmediğinden affinite kromatografisi için uygun ligant olarak ovalbumin seçildi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: ALT ekstresinin özgül karbohidrat birimlerinin belirlenmesinde kullanılan hemaglutinasyon aktivite sonuçları.

	Karbohidrat/glikoprotein	Karbohidrat/glikoprotein konsantrasyonu (mM)							
		100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
1	D-Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
2	D-glukozamin hidroklorür	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Metil- α -D-mannopiranosit	+	+	+	+	+	+	+	+
4	D-Fukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
5	D-Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+
6	N-asetil-D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+
7	N-asetil-D-galaktozamin	+	+	+	+	+	+	+	+
8	4-nitrofenil- β -D-glukopiranozit	+	+	+	+	+	+	+	+
9	4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit	+	+	+	+	+	+	+	+
10	D-Rafinoz	+	+	+	+	+	+	+	+
11	D-Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Ovalbumin	-	-	-	-	-	-	-	-

Başlangıç hemaglutinasyon aktivitesi: 4 HA; +: hemaglutinasyon aktivitesi; -: hemaglutinasyon aktivitesi yok.

250 mg/ml ovalbumin 0,5 M NaCl içeren 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) birleştirici tamponunda çözüldü ve jele ilave edildikten sonra bir gece 4°C'de jelin çökmesini önlemek için düşük hızda çalkalayıcıda karıştırıldı.

3.14.4. Jelde Açıkta Kalan Aktif Grupların Bloke Edilmesi ve Jel Yıkaması

Jel, oda sıcaklığında 0,1 M Tris - HCl tamponunda (pH 8,0) 2 saat düşük hızda çalkalayıcıda karıştırılarak bekletildikten sonra üç kez, pH'sı yüksek ve düşük olan aşağıdaki tamponlarla yıkandı:

0,5 M NaCl içeren 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 4,0).

0,5 M NaCl içeren 0,1 M Tris - HCl tamponu (pH 8,0).

Son olarak jel, PBS (pH 7,4) ile yıkandı.

3.14.5. Lektinin Jele Bağlanması ve Kolondan Elüsyonu

6 ml % 50 amonyum sülfat kesiti CNBr - Sefaroz 4B - ovalbumin jeline ilave edildi ve bir gece 4°C'de düşük hızda jelin çökmesini önlemek için çalkalayıcıda karıştırıldı.

Ertesi gün jel, 1 x 30 cm boyutlarındaki kolona 14 cm yüksekliğe kadar dolduruldu ve ilk olarak 0,5 M NaCl içeren 0,05 M Tris - HCl tamponu (pH 8,0), daha sonra PBS ile yıkandıktan sonra lektin - ovalbumin 1 M Tris-HCl (pH=7,4) tamponu ile elüe edildi. Elüatlar, 1 ml/dak akış hızı ile tüplerde toplandı. Elüatların 280 nm'deki absorbanları okunarak elüsyon grafiği çizildi. Protein pikine rastlayan ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren tüplerdeki çözeltiler birleştirildi. PBS'ye karşı 4°C'de diyaliz edildi ve ultrafiltrasyon membranından geçirilerek konsantre edildi.

3.15. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PAGE hem denatüre edici hem de denatüre edici olmayan (native) ortamda gerçekleşti.

Dikey jel elektroferez aparatı (BIO-RAD)'da % 12'lik jel plaka dik bir vaziyette yerleştirildikten sonra mikropipet kullanılarak 20 µl afinite kromatografisi ile saflaştırılan lektin çözeltisinden kuyucuklara tatbik edildi. Tank bölmesi elektroferez yürütme tamponu (192 mM glisin; % 0,1 SDS; 25 mM Tris baz içeren elektroferez tamponu, pH 8,3) ile dolduruldu. Jel 100 ile 120 V arasında bir voltaj seçilerek jel başına 5 mA akım geçirildi. Bromfenol mavisi, ayırıştırma jelinin alt kısmına gelene kadar elektrofereze 2 - 3 saat devam edildi. Elektroferez bitiminde jel % 0,2' lik Coomassie brilliant blue R-250'nin metanol: su: asetik asit (45: 45: 10; v/v)

karışımındaki çözeltisinde bir gece çalkalayıcıda oda sıcaklığında boyandıktan sonra metanol: su: asetik asit (25: 65: 10; v/v) karışımından oluşan dekoloran çözeltide, çözelti sık sık değiştirilerek yıkandı ve metanol: su: asetik asit (5: 85: 10; v/v) karışımı içeren kaplara yerleştirilerek saklandı.

3.15.1. Denatüre Edici SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Tayini

SDS ortamında poliakrilamid jel elektroforez yönteminde (native) tespit edilen proteinlerin alt birim sayısı ve alt birimlerin moleküler ağırlıkları belirlendi. Jellerin uzunlukları ve protein bantlarının yerleri, dekolorasyondan sonra bromofenol mavisinin göç ettiği mesafeye kadar cm olarak ölçüldü. Buradan protein fraksiyonunun mobilite (Rf)'i Denklem 3-9'e göre hesaplandı.

$$\text{Mobilite} = \text{Protein göçme uzaklığı} / \text{Bromfenol mavisi göçme uzaklığı} \quad (3-9)$$

Bu yöntemle molekül ağırlığı tayininde, molekül ağırlıkları belli olan 12 proteinin mobiliteleri ile molekül ağırlıklarının logaritmaları arasında grafik çizildi. Molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin mobilite değeri grafikte yerine konarak tekabül eden molekül ağırlığı bulundu.

4. BULGULAR

4.1. *A. lividus* Tohumlarından (ALT) Hazırlanan Etanol Ekstrenin Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması

ALT ekstresinin ve standart olarak kullanılan α -tokoferol, askorbik asit ve gallik asidin antioksidan aktiviteleri EC_{50} , TEAC ve FRAP değeri olarak ifade edildi ve Tablo 4-2’de özetlendi.

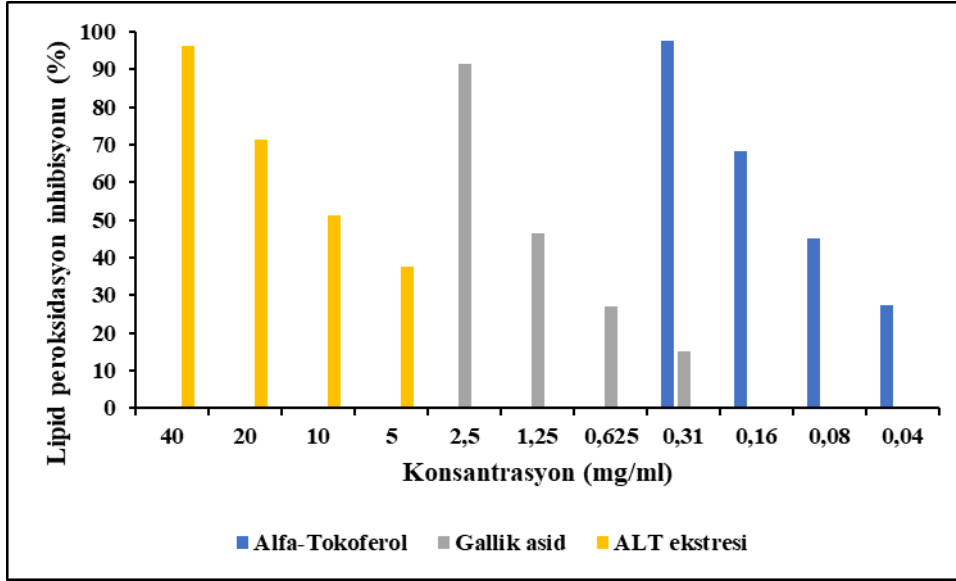
4.1.1. ALT Ekstresinin Total Ekstre Edilebilen Madde ve Fenolik Bileşiklerin Miktarının İncelenmesi

Bu çalışmada 40 g *A.lividus* tohumlarından etanol ekstresi hazırlandı ve 0,035 g/g kuru ağırlık edilebilen madde miktarı elde edildi. Fenolik bileşiklerin miktarı total ekstre edilebilen madde miktarına oranı % 8,1 tespit edildi (Tablo 4-1).

4.1.2. ALT Ekstresinin Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Lipit peroksidasyonunun inhibisyonu şeklinde yansıyan antioksidan aktivitesinin incelenmesinde, ekstrenin en düşük antioksidan aktiviteyi 10 mg/ml’de, en yüksek antioksidan aktiviteyi ise 40 mg/ml’de gösterdiği görüldü (Şekil 4-1). Ekstrenin 40 mg/ml’de gösterdiği antioksidan aktivitenin ($96,1 \pm 2,75$ %), α -tokoferolün 0,31 mg/ml’de ($97,56 \pm 0,81$ %) ve gallik asidin ($91,61 \pm 0,73$ %) 2,5 mg/ml’de gösterdiği antioksidan aktivitesine yakın ($p > 0,05$) olduğu görüldü (Şekil 4-1).

A. lividus ekstresinin ($41,74 \pm 0,18$ mg/ml), α -tokoferol’ün ($0,112 \pm 0,03$ mg/ml) ve gallik asidin ($1,31 \pm 0,02$ mg/ml) EC_{50} değerleri kıyaslandığında *A. lividus* ekstresinin antioksidan aktivitesi, α -tokoferol ve gallik asit aktivitelerinden düşük ($p < 0,05$) olduğu saptandı.

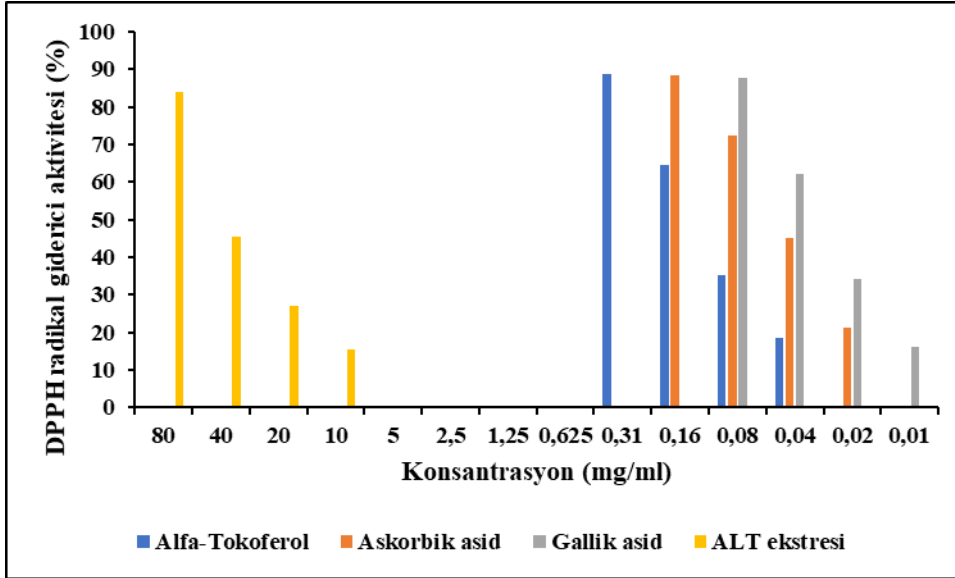


Şekil 4-1: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak lipid peroksidasyonu inhibisyon yüzdeleri.

4.1.3. DPPH Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi

80 mg/ml konsantrasyonda ALT etanol ekstresinin DPPH• giderici aktivitesi (% $84,04 \pm 4,97$), α -tokoferolün 0,31 mg/ml'de (% $88,66 \pm 1,62$), askorbik asidin 0,16 mg/ml'de (% $88,22 \pm 0,96$) ve gallik asidin 0,08 mg/ml'de gösterdikleri DPPH• giderici aktivitesine yakın olduğu saptandı ($p > 0,05$) (Şekil 4-2).

Ekstrenin ve standartların EC_{50} değerleri kıyaslandığında gallik asidin en yüksek DPPH radikal giderici aktivitesi ($0,032 \pm 0,003$ mg/ml) gösterdiği, onu askorbik asit ($0,050 \pm 0,004$ mg/ml) ve α -tokoferol ($0,141 \pm 0,012$ mg/ml) takip ettiği ve en düşük ($p < 0,05$) aktiviteyi ise ekstrenin ($48,25 \pm 1,63$ mg/ml) gösterdiği görüldü.

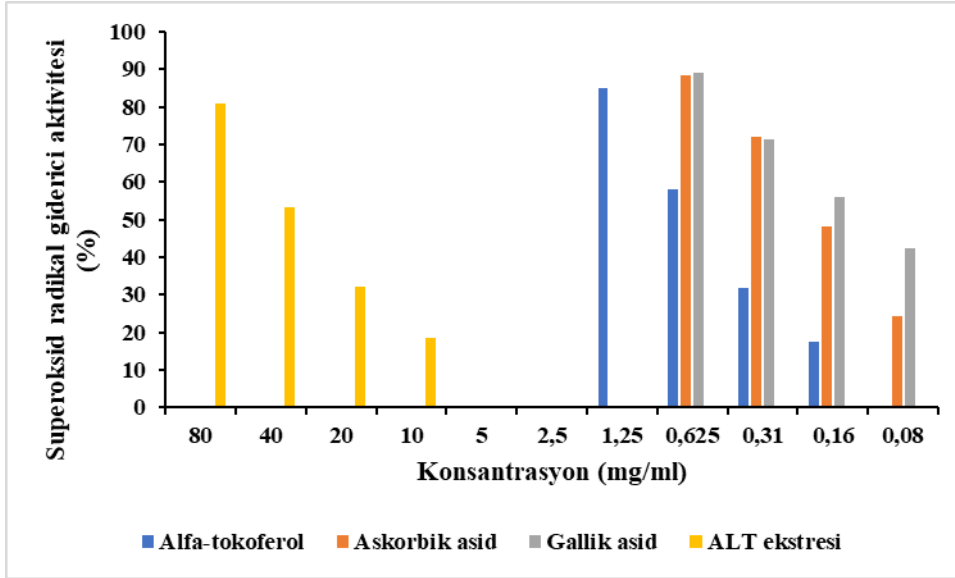


Şekil 4-2: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak DPPH radikal giderici aktivite yüzdeleri.

4.1.4. Süperoksit Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi

Ekstrenin süperoksit radikali giderici aktivitesi ($80,78 \pm 1,06$) 80 mg/ml konsantrasyonunda, α -tokoferolün ($84,51 \pm 2,12$) 1,25 mg/ml, askorbik asidin ($88,41 \pm 0,80$) ve gallik asidin ($89,02 \pm 0,12$) 0,625 mg/ml konsantrasyonunda gösterdiği aktivitesine yakın ($p > 0,05$) bulundu (Şekil 4-3).

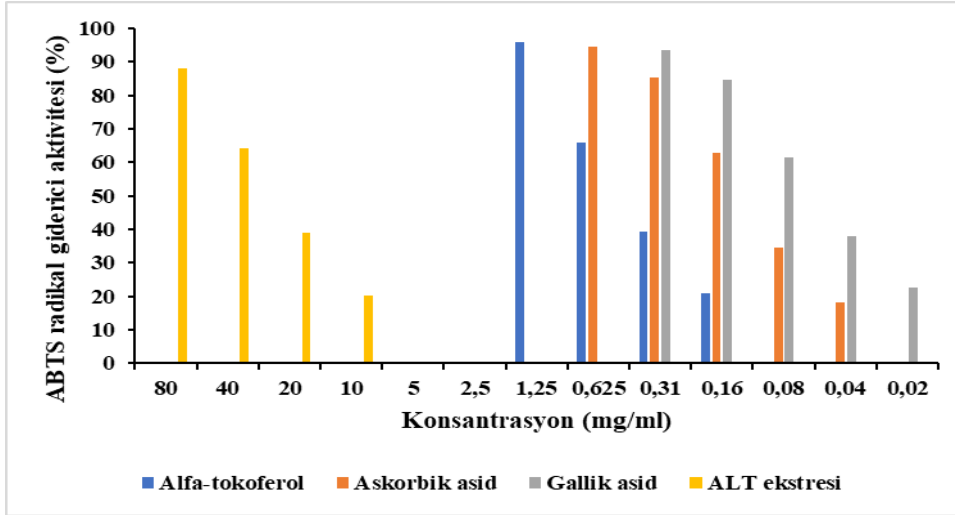
EC_{50} değerleri kıyaslandığında ise ALT etanol ekstresinin ($41,79 \pm 0,91$ mg/ml), α -tokoferol ($0,623 \pm 0,01$ mg/ml), askorbik asit ($0,195 \pm 0,19$ mg/ml) ve gallik asit ($0,112 \pm 0,016$ mg/ml)'e göre daha zayıf ($p < 0,05$) süperoksit radikali giderici aktivitesi gösterdiği görüldü.



Şekil 4-3: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak superoksid radikal giderici aktivite yüzdeleri.

4.1.5. Troluks Ekvalean Antioksidan Kapasitesinin İncelenmesi

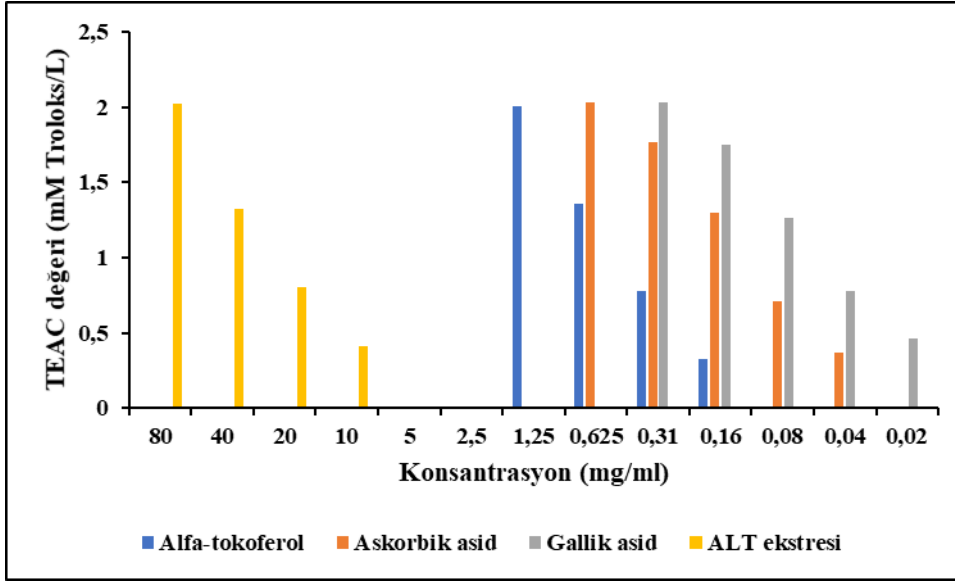
Bu çalışmada ALT etanol ekstresinin ABTS^{•+} giderici aktivitesine sahip olduğu belirlendi. 80 mg/ml konsantrasyonda ALT etanol ekstresinin ABTS^{•+} giderici aktivitesi (% 92,78 ± 1,99), α -tokoferolün (% 95,88 ± 2,60) 1,25 mg/ml, askorbik asidin (% 98,41 ± 0,18) 0,625 mg/ml ve gallik asidin (98,35 ± 1,93) 0,31 mg/ml konsantrasyonunda gösterdikleri aktiviteye yakın olduğu saptandı ($p > 0,05$) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak ABTS radikal giderici aktivite yüzdeleri.

ALT ekstrenin EC_{50} değeri ($34,39 \pm 0,10$ mg/ml), α -tokoferol'ün ($0,428 \pm 0,084$), askorbik asidin ($0,146 \pm 0,009$) ve gallik asidin ($0,063 \pm 0,007$ mg/ml) EC_{50} değerlerinden yüksek olduğu için antioksidan aktivitesinin standartlara kıyasla düşük ($p < 0,05$) olduğu sonucuna varıldı.

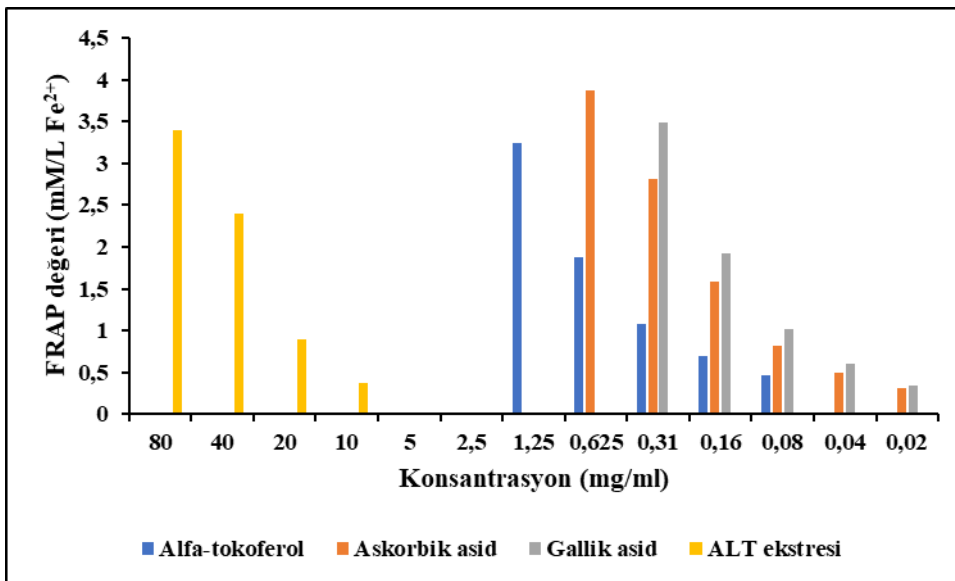
Ekstrenin ve standartların antioksidan aktivitesi TEAC değeri olarak değerlendirildiğinde, 80 mg/ml'de ALT etanol ekstresi ($2,02 \pm 0,04$ mM/L), α -tokoferolün ($2,00 \pm 0,05$ mM/L) 1,25 mg/ml, askorbik asidin ($2,03 \pm 0,003$ mM/L) 0,625 mg/ml ve gallik asidin ($2,02 \pm 0,02$ mM/L) 0,31 mg/ml'deki TEAC değerine yakın değer gösterdiği görüldü ($p > 0,05$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak TEAC değerleri.

4.1.6. Ferri İyonu Redükleyici Antioksidan Potansiyelinin İncelenmesi

ALT ekstrenin ve standartların FRAP değeri olarak değerlendirilen indirgeyici gücü incelendiğinde, 80 mg/ml konsantrasyonunda ALT ekstrenin ($3,40 \pm 0,019$ mM/L Fe^{2+}), a-tokoferolün ($3,24 \pm 0,05$ mM/L Fe^{2+}) 1,25 mg/ml, askorbik asidin ($3,86 \pm 0,12$ mM/L Fe^{2+}) 0,625 mg/ml ve gallik asidin ($3,48 \pm 0,32$ mM/L Fe^{2+}) 0,31 mg/ml konsantrasyonunda gösterdikleri indirgeyici gücüne yakın ($p > 0,05$) indirgeyici güç gösterdiği belirlendi (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: ALT ekstrenin ve standartların doza bağlı olarak FRAP değerleri.

Tablo 4-1: ALT etanol ekstresinin içerdği total ekstre edilebilir madde (EC) ve gallik asit ekivalanı olarak fenolik bileşik (PC) miktarları.

Ekstre	EC (g /g kuru ağırlık)	PC (mg /g ekstre)	PC (mg/g kuru ağırlık)	PC/EC (%)
ALT etanol ekstresi	0,035	2,91 ± 0,28	0,103	8,12

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Tablo 4-2: ALT etanol ekstresinin ve standard olarak kullanılan α -tokoferolün, askorbik asit ve gallik asidin EC₅₀, TEAC ve FRAP değeri olarak ifade edilen antioksidan aktiviteleri.

Extract	LP	DPPH [•]	Superoksid [•]	ABTS [•]	TEAC ^b	FRAP ^c
	EC ₅₀ (mg/ml) ^a					
ALT etanol ekstresi	10,06 ± 0,16 ^a	48,25 ± 1,630 ^b	41,79 ± 0,910 ^d	34,39 ± 0,102 ^c	2,02 ± 0,04 ^a	3,40 ± 0,01 ^a
α-Tokoferol	0,112 ± 0,01 ^b	0,141 ± 0,012 ^a	0,623 ± 0,013 ^c	0,428 ± 0,080 ^d	2,00 ± 0,05 ^a	3,24 ± 0,05 ^a
Askorbik asid	-	0,050 ± 0,004 ^c	0,191 ± 0,003 ^a	0,146 ± 0,009 ^b	2,03 ± 0,01 ^a	3,86 ± 0,12 ^b
Gallik asid	1,31 ± 0,03 ^c	0,032 ± 0,003 ^d	0,112 ± 0,016 ^b	0,063 ± 0,007 ^a	2,02 ± 0,02 ^a	3,48 ± 0,32 ^a

^aEC₅₀ değeri: % 50 LP inhibisyonu ve DPPH, superoksid anyon ve ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı olarak ifade edildi.

^bFRAP değeri: ALT etanol ekstresi 80 mg/ml; α -tokoferol 1,25 mg/ml; askorbik asit 0,625 mg/ml, gallik asit 0,31 mg/ml konsantrasyonunda mM Fe (II) iyonları ekivalanı olarak ifade edildi.

^cTEAC değeri: ALT etanol ekstresi 80 mg/ml; α -tokoferol 1,25 mg/ml; askorbik asit 0,625 mg/ml, gallik asit 0,31 mg/ml konsantrasyonunda mM Troloks ekivalanı olarak ifade edildi:

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak p < 0.05 kabul edildi. Aynı sütun veya satır içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir.

4.2. ALT Etanol Ekstresinin ve Lektinin Anti-Kolinerjik Etkisinin İncelenmesi

ALT etanol ekstresinin doza bağılı olarak AChE ve BuChE enzimleri inhibe ettiği görüldü. ALT etanol ekstresinin 20 mg/ml’de gösterdiği AChE ve BuChE inhibisyon aktivitelerinin, galantaminin 0,1 mg/ml’de gösterdiği aktiviteye yakın olduğu belirlendi. EC₅₀ değerleri kıyaslandığında ise ALT etanol ekstresinin, AChE ve BuChE enzimlerinin geri dönüşümlü inhibitörü olan galantamine göre daha zayıf ($p < 0.05$) aktivite gösterdiği saptandı (Tablo 4-3 ve 4-4). Lektin anti-kolinerjik aktivite göstermedi.

Tablo 4-3: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan galantaminin AChE inhibe edici aktiviteleri.

Ekstre	20 mg/ml	5 mg/ml	1,25 mg/ml	IC ₅₀
	İnhibisyon %			
ALT ekstresi	79,82 ± 1,02	49,16 ± 1,18	30,99 ± 1,56	2,46 ± 2,38 ^a
Galantamin	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,025 mg/ml	0,025 ± 0,02 ^b
	İnhibisyon %			
	97,62 ± 0,48	66,64 ± 1,25	47,98 ± 1,27	

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Aynı sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir

Tablo 4-4: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan galantaminin BuChE inhibe edici aktiviteleri.

Ekstre	20 mg/ml	5 mg/ml	1,25 mg/ml	IC ₅₀
	İnhibisyon %			
ALT	80,12 ± 1,84	50,32 ± 1,08	35,43 ± 1,16	2,54 ± 0,06 ^a
Galantamin	0,1 mg/ml	0,05 mg/ml	0,025 mg/ml	0,039 ± 0,03 ^b
	İnhibisyon %			
	94,25 ± 0,15	61,74 ± 0,58	40,92 ± 0,18	

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Aynı sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir

4.3. ALT Etanol Ekstresinin ve Lektinin COX-1 ve COX-2 İnhibe Edici Etkisinin İncelenmesi

ALT etanol ekstresinin doza bağlı olarak COX-1 ve COX-2 enzimleri inhibe ettiği görüldü. ALT etanol ekstresinin 20 mg/ml’de gösterdiği COX-1 ve COX-2 inhibisyon aktivitelerinin, indometazinin COX-1 için 0,004 mg/ml’de ve COX-2 için 0,04 mg/ml’de gösterdiği aktiviteye yakın olduğu belirlendi. EC₅₀ değerleri kıyaslandığında ise ALT etanol ekstresinin, COX-1 ve COX-2 enzimlerinin indometazine göre daha zayıf ($p < 0.05$) aktivite gösterdiği saptandı (Tablo 4-5 ve 4-6). Lektin COX-1 ve COX-2 inhibe edici aktivite göstermedi.

Tablo 4-5: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan indometazinin COX-1 inhibe edici aktivitesi.

Ekstre	20 mg/ml	5 mg/ml	1,25 mg/ml	IC ₅₀ (mg/ml)
	İnhibisyon %			
ALT	95,54 ± 2,01	57,03 ± 1,45	36,36 ± 1,34	4,95 ± 2,12 ^a
İndometazin	0,004 mg/ml	0,002 mg/ml	0,001 mg/ml	0,0019 ± 0,0002 ^b
	İnhibisyon %			
	96,35 ± 1,25	52,59 ± 0,99	29,15 ± 1,02	

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Aynı sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir

Tablo 4-6: ALT etanol ekstresinin ve standart olarak kullanılan indometazinin COX-2 inhibe edici aktivitesi.

Ekstre	20 mg/ml	5 mg/ml	1,25 mg/ml	IC ₅₀ (mg/ml)
	İnhibisyon %			
ALT	92,26 ± 1,54	50,88 ± 0,99	33,26 ± 1,75	5,16 ± 1,58 ^a
İndometazin	0,040 mg/ml	0,020 mg/ml	0,010 mg/ml	0,013 ± 0,003 ^b
	İnhibisyon %			
	98,65 ± 1,18	66,58 ± 1,25	41,66 ± 1,89	

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Aynı sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir

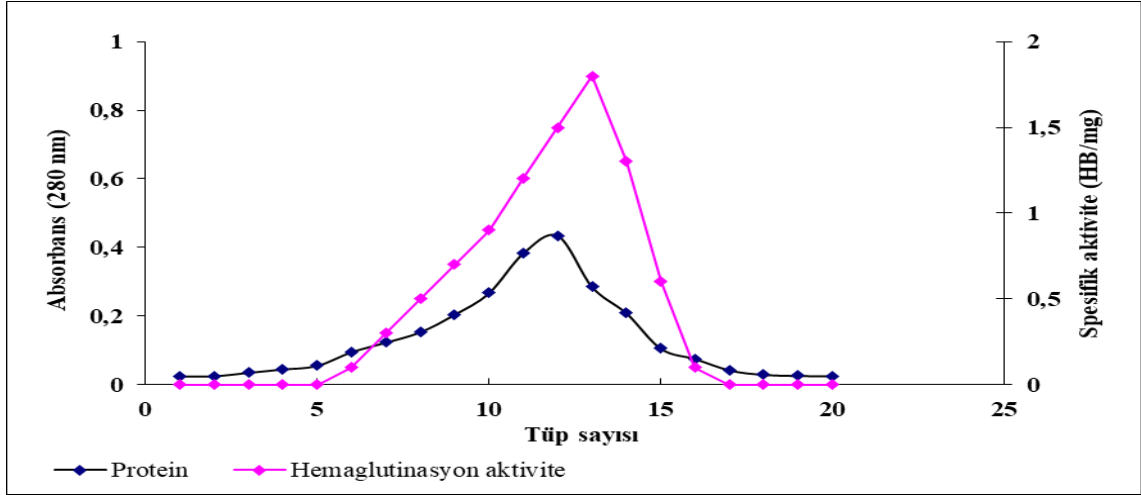
4.4. *A. lividus* Tohumlarından Hazırlanan Ham Ekstreden Lektinin Saflaştırılması

A. lividus tohumlarından hazırlanan ham ekstreden % 50 amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek suretiyle elde edilen ve hemaglutinasyon aktivitesi gösteren 8,2 mg protein içeren 6 ml hacimdeki fraksiyon 60 ml/saat akış hızıyla CNBr-Sefaroz-4B affinite kromatografisine uygulandı ve 1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) ile gerçekleştirilen elüsyon sonucu lektin elde edildi. Lektinin elüsyon grafiğini çizmek için her bir tüpteki elüatın hemaglutinasyon aktivitesi ve 280 nm'deki absorpsiyonu ölçüldü. Ham ekstre % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği Şekil 4-7'de gösterildi.

A. lividus tohumlarından lektinin elde edilme sürecindeki işlem basamakları Tablo 4-7'de özetlendi.

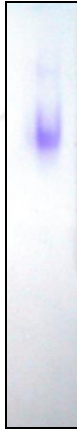
Tablo 4-7: *A. lividus* tohumlarından (30 g) hazırlanan ham ekstreden lektinin elde edilme basamakları.

<i>Saflaştırma evresi</i>	<i>Hacim (ml)</i>	<i>Protein (mg/ml)</i>	<i>Total protein (mg)</i>	<i>HA titresi</i>	<i>HB/mg</i>	<i>Saflaştırma oranı</i>
Ham ekstre	245	2,03	497,3	2	162,4	1
% 50 Amonyum sülfat kesiti	6,0	1,37	8,22	8	438,4	2,18
Affinite kromatografisi	0,9	1,50	1,35	32	1920	11,82



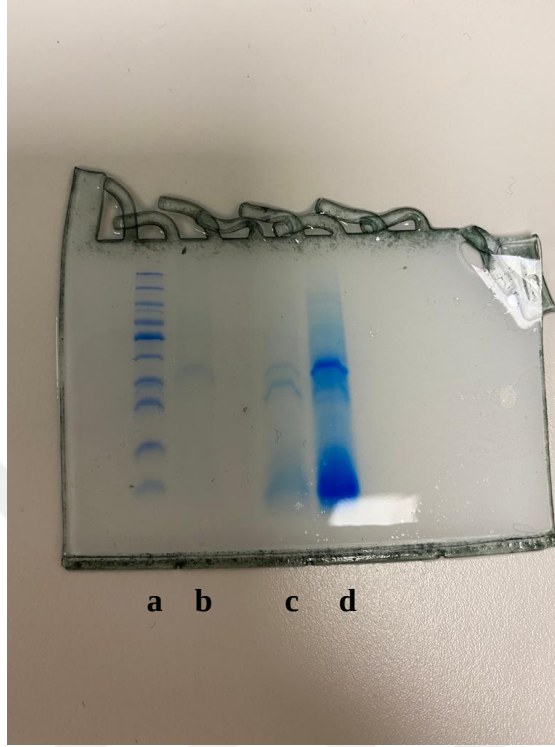
Şekil 4-7: A. lividus tohumları ham ekstresi % 50 amonyum sülfat kesitinin affinite kolon kromatografisi elüsyon grafiği.

ALT lektinin affinite kromatografisi ile elde edilen elüatının doğal poliakrilamid jel elektroforezindeki tek protein bandı Şekil 4-8’de görülmektedir.



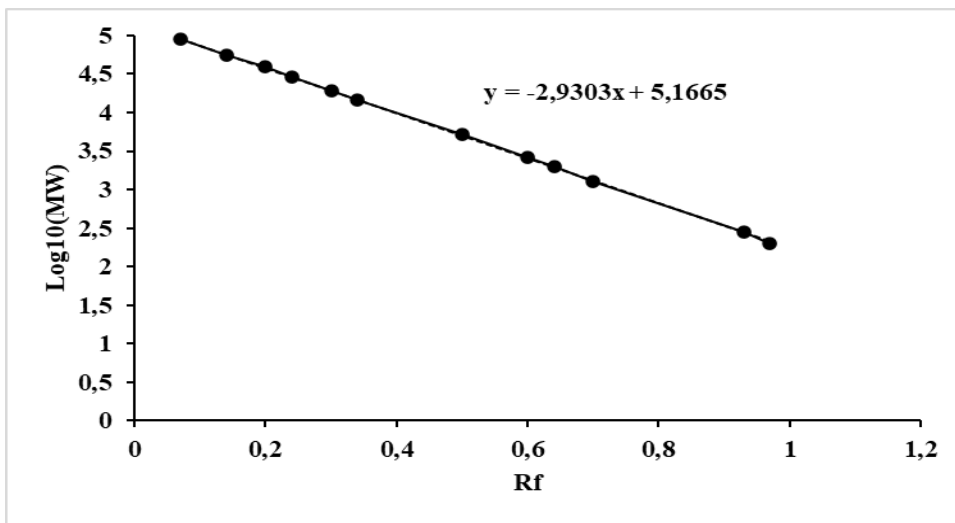
Şekil 4-8: ALT lektininin affinite kromatografisiyle elde edilen elüatın doğal poliakrilamid jel elektroforezindeki tek protein bandı.

ALT lektinin molekül ağırlığı 68 kDa olduğu belirlendi ve SDS – PAGE’de her birinin molekül ağırlığı 34 kDa olan iki alt birimden oluştuğu sonucuna varıldı (Şekil 4-9). Alt birimlerin molekül ağırlığı standart proteinlerin regresyon denkleminde hesaplandı (Şekil 4-10).



Şekil 4-9: ALT ham ekstreden affinite kromatografisi ile elde edilen lektin elüatının, standart proteinlerle karşılaştırmalı olarak çalışılan SDS-PAGE'deki protein bandı.

a) Protein marker b) Lektin c) Amonyum sülfat kesiti d) Ham ekstre



Şekil 4-10: Standart proteinlerin SDS-PAGE standart eğrisi ve regresyon denklemini.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, kronik rahatsızlıklara karşı nutrasötik ve doğal koruyucu olarak *Amaranthus* türlerine olan ilginin arttığı görülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmaların literatür özeti, *Amaranthus* türlerin büyük ölçüde güçlü antioksidan aktiviteden ileri gelen koruyucu ve iyileştirici özelliklere sahip olduklarını göstermiştir. Birçok *Amaranthus* türünün, serbest radikalleri giderme yeteneklerinden dolayı oksidatif stres kaynaklı bozuklukların gerilemesinde önemli roller oynadığı ve böylece dejenere edici sonuçlarını nötralize ettiği bildirilmiştir (Peter ve Gandhi, 2017).

Anabilim Dalımızda *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada *A. lividus* bitkisinin sulu, etanol ve etil asetat ekstrelerinin potansiyel antioksidan olarak, superoksit, DPPH, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini giderdikleri ve tabii antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır (Ozsoy ve ark., 2009). *A. lividus* üzerindeki çalışmalarımızın bir devamı olan bu çalışmada, *A. lividus* tohumlarının antioksidan, anti-kolinerjik ve COX inhibe edici etkileri incelenmiştir.

A. caudatus (Li ve ark., 2008; Karamać, ve ark., 2019), *A. cruentus* (Paško ve ark., 2009; Li ve ark., 2008), *A. hypochondriacus* (Li ve ark., 2008; Lopez-Mejía ve ark., 2014), *A. graecizan* (Ishtiaq ve ark., 2015), *A. viridis* (Alvarez-Jubete ve ark., 2010; Jin ve ark., 2013; Ahmed ve ark., 2013) ve *A. spinosum* (Tatiya ve ark., 2002; Kumar ve ark., 2010; Bulbul ve ark., 2013; Barku ve ark., 2013) gibi birçok *Amaranthus* türü, antioksidan aktivite ve içerdikleri flavonoid, tanen, fenolik bileşik, saponin ve glikozidler (Barba de la Rosa ve ark., 2009; Paško ve ark., 2009) bakımından incelenmiş ve günümüzde tüketiciler tarafından talep edilen “yeni” doğal bileşenlere yönelik eğilimler nedeniyle *Amaranth*’ı potansiyel bir antioksidan kaynağı olarak görmenin çok önemli olduğu vurgulanmıştır. *Amaranth*’ın, sebze mahsulleri arasında en iyi beş antioksidan kapasiteden birine sahip olduğu kabul edilmiştir.

Amaranth tahılı, geleneksel tahıllardan daha üstün olan amino asit bileşimi nedeniyle değerlidir. Ayrıca *Amaranth* tohumu önemli miktarda mineral tuzlar, vitaminler ve lif, doymamış yağ asitleri ve skualen açısından zengin yağ, polifenoller, antosiyaninler ve flavonoidler, tokoferoller ve tokotrienoller içerdiği bildirilmiştir (Peter ve Gandhi, 2017). *Amaranth* tohumu, deney hayvan çalışmalarında hiperkolesterolemi tedavisini (Czerwieński ve ark., 2004) veya çölyak hastalığı olan kişilerin beslenmesini

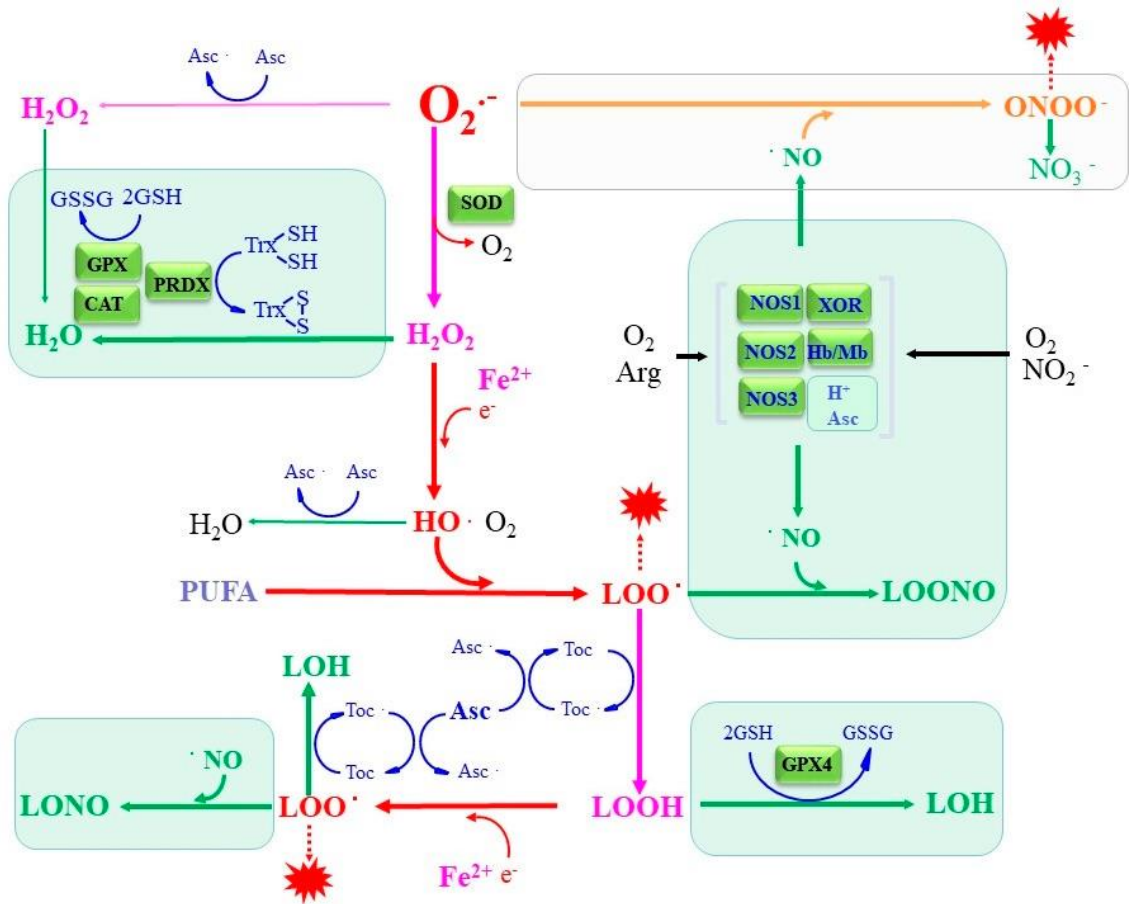
(Thompson, 2001) olumlu etkilediği, ancak Amaranth ürünlerinin bu olumlu etkilerini açıkça doğrulayan hiçbir klinik araştırma olmadığı için tartışmalıdır.

Bu çalışmada *A. lividus* tohum ekstresinin içerdiği total fenol bileşikler miktarının Gorinstein ve ark. (2007)'ın *A. hypochondriacus* (40,5 mg GAE/100 g kuru ağırlık), *A. hybridus* (40,5 mg GAE/100 g kuru ağırlık) ve *A. cruentus* (43 mg GAE/100 g kuru ağırlık) tohumlarından asidik metanol ile gerçekleşen ekstrasyon sonucunda elde edilen ekstreleri için bildirdiği miktarlarından daha yüksek, Paško ve ark. (2009)'ın *A. cruentus* v. Aztek (2,95 mg GAE/g kuru ağırlık) ve *A. cruentus* v. Rawa (3 mg GAE/g kuru ağırlık), Aguilar-Felices ve ark. (2019)'ın ise beş *A. cruentus* alt türünün çimlenmiş tohum (19-35 mg GAE/ g kuru ağırlık) ekstreleri için bildirdiği miktarından daha düşük olduğu görüldü. Gorinstein ve arkadaşlarının elde ettikleri sonuçlara yakın bulgular Akin-Idowu ve ark. (2017) tarafından *A. caudatus* (27,52 mg GAE/100 g), *A. cruentus* (30,48 mg GAE/100 g), *A. hybrid* (29,65 mg GAE/100 g), *A. hypochondriacus* (30,03 mg GAE/100 g) ve *A. hybridus* (30,79 mg GAE/100 g) türlerinin tohumlarından hazırlanan metanol ekstreleri için bildirilmiştir.

Serbest radikaller, hücre membranlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına neden olarak kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen lipid peroksidasyonunu indükleyebilirler. Hücre membranlarında yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması sonucunda oluşan lipid ve lipid peroksit radikaller ($LOO^{\bullet}$) hücresel makromoleküllere, hidroksil radikalinden daha etkin olarak hasar oluşturabilirler, ksenobiyotik metabolizması, inflamatuvar süreçler, iskemik reperfüzyonu, ateroskleroz ve kanser gibi kronik hastalıklar sonucu oluşan oksidatif hasara katkıda bulunurlar. Antioksidan vitaminler ve fenolik bileşikler, oksijen serbest radikallerine bir hidrojen atomu veya bir elektron vererek onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birçok fenolik bileşiğin lipid peroksidasyon süreçleri üzerinde güçlü bir inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu etki, metal iyonlarını kelatlayarak lipid peroksidasyon olayını başlatan radikal oluşumunu önleme, lipid-alkoksil ve lipid-peroksil radikallerini giderme yeteneklerine dayanır (Ayala ve ark., 2014).

E ve C vitaminlerin sinerjik etkileri ile de LDL oksidasyonu baskılanabilir. Bu sistem içinde E vitamini fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline ($ROO^{\bullet}$) transfer etmek suretiyle oksitlendiğinde tokofenoksi radikali oluşur. Bu radikal C vitamini ile

etkileşerek antioksidan özellik kazanırken, C vitamini askorbil radikaline dönüşür ve redüklenmiş glutatyon (GSH) sayesinde tekrar antioksidan özellik kazanır. Okside olan glutatyon ise glutatyon redüktaz enzimi sayesinde redüklenmiş durumuna geri döner. Bu zincirde suda çözünebilen radikaller C vitamini ve glutatyon ile zararsız duruma getirilir. Yağda çözünen radikaller ise temel olarak E vitamini tarafından durdurulur ve lipid yapıların peroksidasyonu engellenmiş olur. Oluşan peroksitler peroksidaz enzimin etkisiyle kendilerine tekabül eden alkollere indirgenerek nötralize edilir (Fujii ve ark., 2022) (Şekil 5-1).



Şekil 5-1: In vivo olarak ROS/lipid radikalleri ile antioksidanlar arasındaki etkileşim (Fujii ve ark., 2022).

Bu çalışmada ALT etanol ekstresinin lipid peroksidasyonu inhibe edici etkisi, α -tokoferol ve bir polifenolik bileşik olan gallik asidin etkisi ile karşılaştırılarak incelenmiş ve ekstrenin antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar

Amaranthus türlerinin lipid peroksidasyonunu inhibe edici yüksek potansiyele sahip olduklarını rapor eden diğer çalışmalar ile aynı yöndedir (Klimczak ve ark., 2002).

Süperoksit anyon radikali, bir oksijen molekülünün enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlar yoluyla bir elektron alarak oluşan ilk radikaldir. Biyolojik moleküllere karşı hafif reaktif olmasına rağmen, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarında daha reaktif ve zarar verici hidroksil radikaline dönüşebilir. Süperoksit radikalin ana kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ) olması yanı sıra, NADPH oksidaz (NOX), ksantin oksidaz (XO) ve sitokrom P450 (CYP)/sitokrom P450 redüktaz (POR) gibi birçok enzim, moleküler oksijeni süperoksit radikaline dönüştürebilir (Fujii ve ark., 2022).

Süperoksit anyon radikali iki ucu keskin kılıç gibidir, bir taraftan NFκB gibi transkripsiyon genlerin aktivasyonuna, hücre büyümesi ve farklılaşmasına ve apoptozun inhibisyonuna yol açarken, diğer taraftan apoptoza yol açan oksidatif strese neden olmaktadır (Wu ve ark., 2010). Sağlıklı hücre, süperoksit radikalının üretim ve inaktivasyon dengesini koruyabilir. Nöronal ve humoral uyaranlara yanıt olarak hücrel metabolizma sonucunda meydana gelen süperoksit radikalının üretimi inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi patolojik koşullar altında artmaktadır. Normalde elektron alıcısı olarak NAD'i kullanan ksantin dehidrojenaz, iskemi-reperfüzyon koşulları altında oksijeni substrat olarak kullanan ksantin oksidaza dönüştürülür. Aşırı ATP tüketimi, pürin katabolizma ürünleri olan hipoksantin ve ksantin birikmesine ve daha sonraki reperfüzyon ve oksijen girişinde bunların ksantin oksidaz tarafından büyük miktarlarda süperoksit ve hidrojen peroksit verecek şekilde metabolize edilmesine yol açar (Fujii ve ark., 2022) (Şekil 5-2).

ekstresinin Fe (III)' ü redükleme ve dolayısıyla elektron verici yeteneğine ve lipit peroksidasyonu sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme özelliğine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular literatür ile uyumlu olarak bulundu (Adegbola ve ark., 2020).

Serbest radikallerin serebral iskemi-reperfüzyonu, kafa travması, Parkinson hastalığı (PD), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Down sendromu (DS) ve Alzheimer hastalığı (AH)'nda rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Merkezi sinir sistemi (CNS), beynin yüksek oksijen tüketim hızı, yüksek miktarda lipit içeriği ve diğer dokulara kıyasla antioksidan enzimlerin azlığı nedeniyle serbest radikal hasarına karşı özellikle savunmasızdır.

Alzheimer hastalığı (AH), kolinerjik sistemdeki eksiklikler ve nörofibriler yumaklar ve amiloid plaklar şeklinde beta amiloid (Ab) birikimi ile karakterize olan ve demans ile seyreden ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır (Anand ve Singh, 2013). Serbest radikallerin nöron dejenerasyonu ve ölümüne aracılık edebildiğini gösteren çok sayıda çalışma, AH beyinde, lipit peroksidasyonu ve lipit peroksidasyonun son aldehit ürünleri olan 4-hidroksinonenal ve malondialdehidin (MDA), protein ve DNA oksidasyon ürünlerin, nörofibriler yumakta ve senil plklarda glikozilasyon son ürünleri (AGE), gibi oksidatif stres biyobelirteçlerinin yükseldiğini bildirmişlerdir (Markesbery, 1997).

Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolini hidrolize eden asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe ederek doğrudan kolinerjik iletimi arttırır. BuChE, AChE ile yakından ilişkili bir enzimdir ve asetilkolini hidrolize ederek kolinerjik nörotransmisyonun ortak düzenleyicisi olarak hizmet eder. Çalışmalar, AH gelişimi sırasında temporal korteks ve hipokampus gibi en çok etkilenen bölgelerde BuChE aktivitesinin arttığını (%40-90) göstermiştir. Ayrıca, artan bir BuChE aktivitesi de senil plak oluşumunun erken evrelerinde beta amiloid agregasyonunda önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu nedenle, AChE ve BuChE, nörodejeneratif hastalıklar ve demansta klinik iyileşmeler sağlamak için de önemli bir hedef olarak kabul edilmiştir (Anand ve Singh, 2013).

Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde başarı oranının elde edildiği tek mekanizma AChE ve BuChE inhibisyonu olduğunu göz önünde bulundurarak, bu çalışmada elde edilen sonuçların, AChE aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibitör etki

sergileyen polifenoller içeren ALT etanol ekstresinin demansa karşı terapötik ajan olarak kullanılabileceği bildiren diğer çalışmalarla uyumludur (Roseiro ve ark., 2012).

Non-steroidal antiinflatuar ilaç (NSAID)'ların ortak özellikleri COX-1 ve COX-2 enzimlerini bloke ederek araşidonik asidin inflamatuvar mediatörlere dönüşmesini engellemeleridir. COX-2'nin yukarı doğru düzenlenmiş ifadesi, inflamasyon ile insan karsinogenezi ve kanser ilerlemesi ile ilişkili olduğu ve bu nedenle COX-2 inhibitörleri, farklı insan kanserlerinde antitümör aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Li ve ark., 2020). Bu nedenle, COX-2 inhibitörleri ile kemoterapötik ajanların kombinasyonunun, insan kanserleri üzerindeki terapötik etkileri iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, *A. lividus* tohum ekstresinin her iki enzimi inhibe ederek antiinflatuar etki gösterdiği ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde klasik NSAID ilacları önemli bir alternatif sağlayabileceği sonucu, diğer çalışmalarla uyumludur (Jayaprakasam ve ark., 2004; Li ve ark., 2020).

Bu çalışmada, yapılan literatür taramaları sonucunda, *A. lividus* lektinin saflaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması gözönünde bulundurularak, *A. lividus* tohumlarından ham ekstresinden affinite kromatografisi ile lektin saflaştırıldı, moleköl ağırlığı ve lektine spesifik olan bir karbonhidrat birimi belirlendi. Zenteno and Ochoa (1988) *A. leucocarpus* tohumlarından kan stroması kullanarak affinite kromatografisi ile lektin izole etmişler ve herbirinin moleköl ağırlığı 45 kDa olan iki alt birimden oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Amaranthus caudatus tohumlarından, DEAE sellüloz ve ardından T-antijeni boncukları (Gal β 1–3GalNAc) üzerinde uygulanan affinite kromatografisi olmak üzere iki basamaklı kromatografi protokolün uygulanması ile hedefi T-antijeni olan amarantin adlı lektin izole edilmiştir (Rinderle ve Goldstein, 1989) ve her birinin moleköl ağırlığı 33-36 kDa olan iki alt biriminden oluştuğu, doğal PAGE'de moleköl ağırlığı 54 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Hernández ve ark. (1999), kan grubu O eritrosit stroması, küçükbaş, sığır submaksiller bez müsinleri ve fetuin gibi ligandların arasında en ekonomik olanı desiale eritrosit stroması kullanarak affinite kromatografisi yolu ile *A. leucocarpus syn. hypocondriacus* tohumlarından lektini saf olarak izole etmişlerdir.

Bu çalışmada, tek basamaklı affinite kromatografisi ile saflaştırılan lektinin molekül ağırlığı daha önceki çalışmalarda bildirilenlere yakın bulundu.

Sonuç

Bu çalışmada, ALT etanol ekstresinin redükleyici ve dolayısıyla hidrojen ve elektron verici etkilerinden dolayı oksidatif stresin yol açtığı patolojik süreçlerin üzerinde güçlü bir inhibitör etki sağlayabileceği,

AChE ve BuChE'ı inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ve Alzheimer hastalığının semptomlarını iyileştirme potansiyeline sahip olabileceği,

COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiği ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde klasik NSAİD ilaçlara önemli bir alternatif sağlayabileceği,

A. lividus tohumlarından ilk kez saflaştırılan lektinin lektinoloji bilginin gelişmesine katkıda bulunabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

Adegbola, P.I., Adetutu, A., Olaniyi, T.D. (2020). Antioxidant activity of *Amaranthus* species from the Amaranthaceae family-A review. *South African Journal of Botany*, 133, 111-117.

Agrawal, B.B. ve Goldstein, I.J. (1965). Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochemical Journal*, 96, 23c-35c.

Aguilar-Felices, E.J., Romero-Viacava, M., Enciso-Roca, E., Herrera-Calderon, O., Común-Ventura, P., Yuli-Posadas, R.A., Chacaltana-Ramos, L., Pari-Olarte, B. (2019). Antioxidant activity of the germinated seed of four varieties of *Amaranthus caudatus* L. from Peru. *Pharmacognosy Journal*, 11(3), 588-593.

Ahmed, S.A., Hanif, S., Iftkhar, T. (2013). Phytochemical profiling with antioxidant and antimicrobial screening of *Amaranthus viridis* L. leaf and seed extracts. *Open Journal of Medical Microbiology*, 3, 164-171.

Akin-Idowu, P.E., Ademoyegun, O.T., Olagunju, Y.O., Aduloju, A.O., Adebo, U.G. (2017). Phytochemical content and antioxidant activity of five grain Amaranth species. *American Journal of Food Science and Technology*, 5, 249-255.

Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K. ve Gallagher, E. (2009). Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 240-57.

Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E.K., Gallagher, E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119, 770-778.

Anand, P. ve Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, 36, 375-399.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 6, 593-597.

Aub, J.C., Tieslau, C., Lankester, A. (1963). Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 50, 613-619.

Aub, J.C., Sanford, B.H., Cote, M.N. (1965). Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54, 396-399.

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 360438, 1-31.

Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999). Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 59 (9), 2083-2090.

Barba de la Rosa, A.P., Fomsgaard, I.S., Laursen, B., Mortensen, A.G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J., De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49, 117-121.

Barku, V., Yaw, O.-B., Owusu-Ansah, E., Mensah, A. (2013). Antioxidant activity and the estimation of total phenolic and flavonoid contents of the root extract of *Amaranthus spinosus*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3, 69-74.

Barondes, S.H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*, 13, 480-482.

Barrio, D.A. ve Añón, M.C. (2010). Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European Journal of Nutrition*, 49, 73-82.

Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Bezsinna, N., de Matos, M.B.C., Walther, J., Heyder, C., Hildebrandt, E., Leneweit, G., Mastrobattista, E., Kok, R.J. (2018). Quantitative analysis of receptor-mediated uptake and pro-apoptotic activity of mistletoe lectin-1 by high content imaging. *Scientific Reports*, 8 (1), article 2768, 2018.

Bhutia, S.K., Panda, P.K., Sinha, N., Praharaj, P.P., Bhol, C.S., Panigrahi, D.P., Mahapatra, K.K., Sarbari, S., Srimanta, P., Mishra, S.R., Behera, B.P., Pati, S., Maiti, T. (2019). Plant lectins in cancer therapeutics: targeting apoptosis and autophagy dependent cell death. *Pharmacological Research*, 144, 8-18.

Boland, C.R., Chen, Y.F., Rinderle, S.J., Resau, J.H., Luk, G.D., Lynch, H.T., Goldstein, I.J. (1991). Use of the lectin from *Amaranthus caudatus* as a histochemical probe of proliferating colonic epithelial cells. *Cancer Research*, 51, 657-665.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.

Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.

Bulbul, I.J., Nahar, L., Ripa, F.A., Haque, O. (2011). Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of chloroform, n-hexane and ethyl acetate extract of plant *Amaranthus spinosus*. *International Journal of PharmTech Research*, 33, 1675-1680.

Cagliari, R., Kremer, F.S., Pinto, L.S. (2018). Bauhinia lectins: biochemical properties and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 811-820.

Chen, C., Gao, H., Su, X. (2021). Autophagy-related signaling pathways are involved in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22, 710-723.

Cheng, L.Y., Bian, H.-J., Bao, J.-K. (2014). Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneura* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 5 (2), 253-255.

Choi, S. H., Lyu, S.Y., Park, W.B. (2004). Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. *Archives of Pharmacol Research*, 27 (1), 68-76.

Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Lima, V.L.M., Pontual, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleao, T.H., Correia, M.T.S. (2017). Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/ pharmacological and therapeutic applications. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 1594074, 1-22.

Coelho, L.C.B.B., Silva, P.M.S., Oliveira, W.F., Moura, M.C., Pontual, E.V., Gomes, E.V., Paiva, P.M.G., Napoleao, T.H., Correia, M.T.S. (2018). Lectins as antimicrobial agents. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 1238-1252.

Czerwieński J., Bartnikowska E., Leontowicz H., Lange E., Leontowicz M, Katrich H., Trakhtenberg, S., Gorinstein S. (2004). Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterolcontaining diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 622-629.

Dang, L., Rougé, P., Van Damme, E.J.M. (2017). Amaranthin–like proteins with aerolysin domains in plants. *Frontiers in Plant Sciences*, 8, ID 1368, 1-15.

Duh, P.-D., Tu, Y.-Y. & Yen, G.-C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology*, 32, 269-277.

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, 88-95.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Escudero, N.L., Alabarracín, G.J., Lopez, L. and Gimenez, M.S. (2011). Antioxidant activity and phenolic content of flour and protein concentrate of *Amaranthus cruentus* seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 1327-1341.

François, K.O. ve Balzarini, J. (2012). Potential of carbohydrate-binding agents as therapeutics against enveloped viruses. *Medicinal Research Review*, 32, 349-387.

Fujii, J., Homma, T., Osaki, T. (2022). Superoxide radicals in the execution of cell death. *Antioxidants*, 11, 501-532.

Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3-12.

Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66.

Gondim, A. C. S., Romero-Canelón, I., Sousa, E. H. S., Blindauer, C.A., Butler, J.S., Romero, M.J., Sanchez-Cano, C., Sousa, B.L., Chaves, R.P., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Sadler, P.J. (2017). The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175, 179-189.

Gorinstein, S., Medina-Vargas, O.J., Jaramillo, N.O., Arnao-Salas, I., Martinez-Ayala, A.L., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Katrich, E., Trakhtenberg, S. (2007). The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*, 225, 321-328.

Gump, J.M. ve Thorburn, A. (2011). Autophagy and apoptosis- what's the connection? *Trends in Cell Biology*, 21(7), 387-392.

Güneş, N., Sipahioğlu, H.M., Gümüş, M. (2018). Ribozom inaktive eden proteinlerin bitki virüs hastalıklarının kontrolünde kullanılma olanakları. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32(3), 594-600.

Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C., Gabius, H.-J. (1990). Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Research*, 50(11), 3322-3326.

Hashim, O.H., Jayapalan, J.J., Lee, C.S. (2017). Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *The Journal of Life and Environmental Sciences (PeerJ)*, 5, e3784-3814.

Hernández, P., Bacilio, M., Porras, F., Juarez, S., Debray, H., Zenteno, E., Ortiz, B. (1999). A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 29(3), 219-234.

Iqbal, M.J., Hanif, S., Mahmood, Z., Anwar, F. Jamil, A. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of Chowlai (*Amaranthus viridis* L.) leaf and seed extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(27), 4450-4455.

Ishtiaq, S., Ahmad, M., Hanif, U., Akbar, S., Kamran, S.H. (2014). Phytochemical and in-vitro antioxidant evaluation of different fractions of *Amaranthus graecizan* subsp. *silvestris* Vill. Brenan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 412, 965-971.

Jayaprakasam, B., Zhang, Y., Nair, M.G. (2004). Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6939-6943.

Jiang, Q.L., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S.Y., Xie, T., Chen, D.Y., Chen, Y.J., He, J., Liu, J., Ouyang, L., Jiang, X. (2015). Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*, 48, 17-28.

Jiang, S.Y., Ma, Z., Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 79-103.

Jin, Y., Xuan, Y., Chen, M., Chen, J., Jin, Y., Piao, J., Tao, J. (2013). Antioxidant, antiinflammatory and anticancer activities of *Amaranthus viridis* L. extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 25, 8901-8904.

Karamać, M., Gai, F., Longato, E., Meineri, G., Janiak, M.A., Amarowicz, R., Peiretti, P.G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) during plant growth. *Antioxidants*, 8, 173-187.

Keyaerts, E., Vijgen, L., Pannecouque, C., Van Damme, E., Peumans, W., Egberink, H., Balzarini, J., Van Ranst, M. (2007). Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, 75, 179-187.

Kim, W.-H., Park, W.B., Gao, b., Jung, M.H. (2004). Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, 66(6), 1383-1396.

Klimczak, I., Małecka, M. ve Pacholek, B. (2002). Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Die Nahrung*, 46, 184-186.

Kocourek, J. ve Horejsi, V. (1983). A note on the recent discussion on definition of the term 'lectin'. In: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* Vol. 3, pp. 3-6, Walter De Gruyter, Berlin, Germany.

Kumar, B.S.A., Lakshman, K., Jayaveera, K.N., Shekar, D.S., Kumar, A.A., Manoj, B. (2010). Antioxidant and antipyretic properties of methanolic extract of *Amaranthus spinosus* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 702-706.

Lagarda-Diaz, I., Guzman-Partida, A.M., Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1242-1260.

Landsteiner, K., Raubitschek, H. (1907). Beobachtungen über hämolyse und hämagglutination. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 45, 660-667.

Leal, R. B., Pinto-Junior, V.R., Osterne, V.J.S, Wolin, I., A., V., Nascimento, a.P.M., Neco, A.H.B., Araripe, D.A., Welter, P.G., Neto, C.C., Correia, J.L.A., Rocha,

C.R.C., Nascimento, K.S., Cavada, B.S. (2018). Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 64-76.

Lee, J.Y., Kim, J.Y., Lee, Y.G., Byeon, S.E., Kim, B.H., Rhee, M.H., Lee, A., Kwon, M., Hong, S., Cho, J.Y. (2007). In vitro immunoregulatory effects of Korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2043-2051.

Lei, H.-Y. ve Chang, C.-P. (2007). Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy*, 3(4), 402-404.

Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT Food Science and Technology*, 41, 385-390.

Li, S., Jiang, M., Wang, L., Yu, S. (2020). Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110389, 1-10.

Lin, P. ve Ng, T.B. (2008). Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10481-10486.

Liu, B., Bian, H.J., Bao, J.K. (2010a). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287, 1-12.

Liu, B., Cheng, Y. Bian, H.-J., Bao, J.-K. (2014). Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneura* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy*, 5(2), 253-255.

Liu, B., J. M. Wu, J.-m., Li, J., Liu, J.-j., Li, W.-w., Li, C.-y., Xu, H.-l., Bao, J.-k. (2010b). *Polygonatum cyrtoneura* lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis and autophagy via blocking Ras–Raf and PI3K–Akt signaling pathways. *Biochimie*, 92(12), 1934-1938.

Liu, B., Li, C.Y., Bian, H.J., Min, M.W., Chen, L.F., Bao, J.K. (2009a). Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 482 (1-2), 1-6. Liu, B., Min, M.W., Bao, J.K. (2014). Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy*, 5(3), 432-433.

Liu, B., Peng, H., Yao, Q., Li, J., van Damme, E., Balzarini, J., Ba0, J.-k. (2009b). Bioinformatics analyses of the mannose-binding lectins from *Polygonatum cyrtonema*, *Ophiopogon japonicus* and *Liparis novversa* with antiproliferative and apoptosis-inducing activities. *Phytomedicine*, 16(6-7), 601-608.

Liu, T., Wu, L., Wang, D., Wang, H., Chen, J., Yang, C., Bao, J., Wu, C. (2016). Role of reactive oxygen species-mediated MAPK and NF- κ B activation in *Polygonatum cyrtonema* lectin-induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Journal of Biochemistry*, 160(6), 315-324.

Lopez, V.R., Razzeto, G.S., Giménez, M.S., Escudero, N.L. (2011). Antioxidant properties of *Amaranthus hypochondriacus* seeds and their effect on the liver of alcohol treated rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 157-162.

Lopez-Mejía, O.A., Lopez-Malo, A., Palou, E. (2014). Antioxidant capacity of extracts from amaranth *Amaranthus hypochondriacus* L. seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*, 53, 55-59.

Lubkowski, J., Durbin, S.V., Silva, M.C.C., Farnsworth, D., Gildersleeve, J.C., Oliva, M.L.V., Wlodawer, A. (2017). Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth, *The FEBS Journal*, 284(3), 429-450.

Lyu, S.Y., Choi, S.H., Park, W.B. (2002). Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research*, 25(1), 93-101.

Maciel, E.V.M., Ara'ujo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M.L., Coelho, C.B.B., Correia, M.T.S. (2004). Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32(1), 57-60.

Markesbery, W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1), 134-147.

Mazalovska, M. ve Kouokam, J.C. (2020). Plant-derived lectins as potential cancer therapeutics and diagnostic. *BioMed Research International*, 1631394, 1-13.

Melo, C.M.L., Melo, H., Correia, M.T.S.L., Coelho, C.B.B., da Silva, M.B., Pereira, V.R.A. (2011). Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 73(2), 112-121.

Monteiro, J.T. ve Lepenies, B. (2017). Myeloid C-type lectin receptors in viral, recognition and antiviral immunity. *Viruses*, 9, 59-81.

Nascimento, A.P.M., Knaut, J.L., Rieger, D.K., Wolin, I.A.V., Heinrich, I.A., Mann, J., Juarez, A.V., Sosa, L.D.V., de Paul, A.L., Nascimento, C.G., Cavada, B.S., Leal, R.B. (2018). Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, Part A, 566-577.

Nascimento, A.S.F., Gondim, A.C.S., J. B. Cajazeiras, J.B., Correia, I.L.A., Pires, A.F., Nascimento, K.S., Silva, A.L.C., Nagano, C.S. (2012). Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects, *Journal of Molecular Recognition*, 25(12), 657-664.

Nsimba, R.Y., Kikuzaki, H., Konishi, Y. (2008). Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food Chemistry*, 106, 760-766.

Oliveira, P.S.S., Rêgo, M.J.B.M., Silva, R.R., Cavalcanti, M.B., Galdino, S.L., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.R. (2013). *Cratylia mollis* 1,4 lectin: A new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory. *BioMed Research International*, 263968, 1-6.

Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A., Yanardag, R. *In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*, 116, 867-872 (2009).

Pardoe, G. I., Bird, G. W. C., Uhlenbruck, G., Sprenger, I., Heggen, M. (1970). Heterophile agglutinins with a broad-spectrum specificity. The nature of cell surface receptors for the agglutinins present in seeds of *Amaranthus caudatus*, *Maclura aurantica*, *Datura stramonium*, *Viscum album*, *Phaseolus vulgaris* and *Moluccella laevis*. *Zeitschrift fur Immunitatsforschung, Allergie und Klinische Immunologie*, 140(4), 374-394.

Paško, P.; Bartoń, H.; Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fořta, M., Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115, 994-998.

Peter, K. ve Gandhi, P. (2017). Rediscovering the therapeutic potential of *Amaranthus* species: A review. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4, 196-205.

Peumans, W.J. ve Van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109, 347-352.

Peumans, W.J. ve Van Damme, E.J.M. (1998). Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15, 199-228.

Poiroux, G., Barre, A., Van Damme, E.J.M., Benoist, H., Rougé, P. (2017). Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1232-1262.

Quiroga, A.V., Barrio, D.A., Añón, M.C. (2015) Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT Food Science and Technology*, 60, 478-485.

Quiroga, A.V., Barrio, D.A., Añón, M.C. (2015). Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 478-485.

Raina, A. ve Dutta, A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89, 11774-11778.

Rastogi, A ve Shukla, S. (2013). Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 109-125.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Rinderle, S.J. and Goldstein, I.J., Matta, K.L., Ratcliffell, R.M. (1989). Isolation and Characterization of Amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or Cryptic T)-antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (27), 16123-16131.

Roseiro, L.B., Rauter, A.P., Serralheiro, M.L.M. (2012). Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutrition and Aging*, 1, 99-111.

Roy, B., Pattanaik, A. K., Das, J., Bhutia, S.K., Behera, B., Singh, P., Maiti, T.P. (2014). Role of PI3K/Akt/m- TOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 96-102.

Santaella-Verdejo, A., Gallegos, B., Pérez-Campos, E., Hernández, P., Zenteno, E. (2007). Use of *Amaranthus leucocarpus* lectin to differentiate cervical dysplasia (CIN). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37, 219-228.

Schötterl, S., Huber, S.M., Lentzen, H., Mittelbronn, M., Naumann, U. (2018). Adjuvant therapy using mistletoe containing drugs boosts the T-cell-mediated killing of

glioma cells and prolongs the survival of glioma bearing mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20, ID 3928572, 1-12.

Sharon, N. ve Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, 53R–62R.

Silva, F.O., Santos, P.S., Melo, C.M.L., Teixeira, E.H., Cavada, B.S., Arruda, F.V.S., Cajazeiras, J.B., Almeida, A.C., Pereira, V.A.R., Porto, A.L.F. (2011). Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. *Cell and Tissue Research*, 346, 237-244.

Silva, H.C., Pinto, L.S., Teixeira, E.H., Nascimento, K.S., Cavada, B.S. ve Silva, A.L.C. (2014). BUL: a novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. *Process Biochemistry*, 49(2), 203-209.

Silva, N.R.G. (2021). Antibacterial activity of plant lectins: a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, e21200631, 1-14.

Silva-Sánchez, C., De La Rosa, A.B., León- Galván, M.F., De Lumen, B.O., de Leon-Rodriguez, A. & De Mejía, E.G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233-1240.

Sindhura, B.R., Hegde, P., Chachadi, V.B., Inamdar, S.R., Swamy, B.M. (2017). High mannose N-glycan binding lectin from *Remusatia vivipara* (RVL) limits cell growth, motility and invasiveness of human breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 654-665.

Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.-Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5080843, 1-13.

Sumner, J.B. (1919). The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*. *Journal of Biological Chemistry*, 37, 137-142.

Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936). The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 32, 227-237.

Tatiya, A.U., Surana, S.J., Khope, S.D., Gokhale, S.B., Sutar, M.P. (2007). Phytochemical investigation and immunomodulatory activity of *Amaranthus spinosus* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 444, 337-341.

Thompson, T. (2001). Case Problem: Questions regarding the acceptability of buckwheat, amaranth, quinoa, and oats from a patient with celiac disease. *Journal of the American Dietetic Association*, 101, 586-587.

Transue, T.R., Smith, A.K., Mo, H., Goldstein, I.J., Saper, M.A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nature Structural Biology*, 4, 779-783.

Tripathi, S. ve Maiti, T.K. (2005). Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(2), 451-462.

Tsaneva, M. ve Van Damme, E.J.M. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate Journal*, 37, 533-551.

Watkins, W.M., Morgan, W.T.J. (1952). Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. *Nature*, 169, 825-826.

Wu, A.M., Wu, J.H., Yang, Z., Singh, T., Goldstein, I.J., Sharon, N. (2008). Differential contributions of recognition factors of two plant lectins, *Amaranthus caudatus* lectin and *Arachis hypogaea* agglutinin, reacting with Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal1–3GalNAc1-Ser/Thr). *Biochimie*, 90, 1769-1780.

Wu, Z., Zhao, Y., Zhao, B. (2010). Superoxide anion, uncoupling proteins and Alzheimer's diseases. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 46, 187-194.

Yang, Y., Xu, H.-I., Z. T. Zhang, Z.-t., Liu, J.-j., Li, W.-w., Ming, H., Bao, J.-k. (2011). Characterization, molecular cloning, and in silico analysis of a novel mannose-binding lectin from *Polygonatum odoratum* (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities. *Phytomedicine*, 18(8-9), 748-755.

Yi, M.-R., Kang, C.-H., Bu, H.-J. (2017). Anti-inflammatory and Tyrosinase Inhibition Effects of Amaranth (*Amaranthus* spp L.) seed extract. *Korean Journal of Plant Research*, 30(2), 144-151.

Yu, L.G., Milton, J.D., Fernig, D.G., Rhodes, J.M. (2001). Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedenreich antigen-binding lectins. *Journal of Cellular Physiology*, 186, 282-287.

Zambrana, S., Lundqvist, L.C., Veliz, V., Catrina, S.B., Gonzales, E., Östenson, C.G. (2018). *Amaranthus caudatus* stimulates insulin secretion in Goto- Kakizaki rats, a model of diabetes mellitus Type 2. *Nutrients*, 10(1), 94-111.

Zenteno, E. ve Ochoa, J.-L. (1988). Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry*, 27(2), 313-317.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AMARANTHUS LİVİDUS L. TOHUMLARINDAN HAZIRLANAN
ETANOL EKSTRESİNİN VE HAM EKSTREDEN SAFLAŞTIRILAN
LEKTİNİN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%20	%17	%2	%11
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%4
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%2
4	Submitted to Middle East Technical University Öğrenci Ödevi	%1
5	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
8	stringfixer.com İnternet Kaynağı	<%1