



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI**

***MEDICAGO MUREX VAR. MUREX'İN (FABACEAE) IN VITRO
ANTİOKSİDAN VE BAZI ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DAMLA PAMUKCU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. YAVUZ SELİM ÇAKMAK**

AKSARAY, 2017



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI**

***MEDICAGO MUREX VAR. MUREX'İN (FABACEAE) IN VITRO
ANTİOKSİDAN VE BAZI ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DAMLA PAMUKCU

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. YAVUZ SELİM ÇAKMAK**

AKSARAY, 2017

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

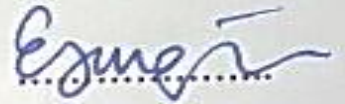
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330804 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, "Damla PAMUKCU", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "*MEDICAGO MUREX* WILLD. VAR. *MUREX* WILLD.'İN (FABACEAE) IN VITRO ANTİOKSİDAN VE ENZİM İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

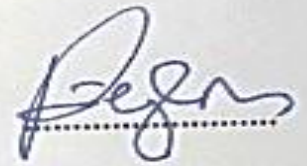
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK
Aksaray Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN
Aksaray Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Gökhan ZENGİN
Selçuk Üniversitesi



Teslim Tarihi: 11.10.2017

Savunma Tarihi: 03.11.2017

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Damla PAMUKCU



ÖNSÖZ

Medicago murex WILLD. var. *murex* tüm dünyada önemli bir hayvan yemi olup otlaklarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bitki yem olarak öneminin yanında aynı zamanda zengin protein içeriğinden dolayı insan diyetinde de protein kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkinin tıbbi kullanımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak kültüre edilmiş türü olan *Medicago sativa* dünyada en yaygın olarak yetiştirilen türlerdendir ve hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde geniş alanlarda tarımı yapılmaktadır. Günümüzde toplumlarda giderek artan sıklıkta görülen pek çok hastalık temelde beslenme ile yakından ilişkilidir. Koroner hastalıklar, kanser ve diyabet gibi yaygın olarak görülen hastalıkların diyetle alakalı olduğuna dair birçok kanıt vardır. Özellikle bitkisel ürünlerden zengin bir diyetin tercih edilmesi bu hastalıkların görülme riskini düşürdüğü bilinmektedir. Bu durumun bitkisel ürünlerin bileşimindeki polifenoller, karotenoidler, vitaminler ve minerallerden kaynaklandığı ile ilgili bulgular mevcuttur. Bitkilerin habitatlarına ve değişen çevre koşullarına adaptasyon, nesillerinin devamını sağlamak gibi amaçlarla üretmiş olduğu bu kimyasal bileşikler aynı zamanda pek çok faydalı biyolojik aktiviteye de sahiptir. Bu aktivitelerin en önemlilerinden birisi antioksidan aktivitedir. Bitki bileşimindeki fitokimyasalların büyük bir kısmı iyi birer doğal antioksidan kaynağı olarak iş görür. Vücutta özellikle oksijenin rol aldığı biyokimyasal reaksiyonlarda bile üretilen yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaller stres, radyasyon, sigara gibi etkileşimlerle savunma sisteminin başa çıkabileceğinden daha yüksek miktarlarda üretilerek oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikallerin biyomoleküllere saldırması ile oluşan hasarlar pek çok hastalığın ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle günümüzde sağlıklı diyet denildiğinde antioksidan özelliğe sahip faydalı bileşikler yüksek düzeyde içeren bitkisel ürünler önem arz etmektedir. Bu tezin deneysel çalışmaları Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi Biyoteknoloji Laboratuvarı ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını planlanmasında, deneysel çalışmaların yürütülmesinde önemli rolü olan, verdiği fikirleriyle tezin şekillenmesinde ciddi katkıları olan danışman hocam Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK'a içtelikle teşekkür ederim.

Çalışmanın ikinci bölümü kabul edebileceğimiz enzim inhibisyon aktivitelerinin laboratuvar çalışmaları ve sonuçların değerlendirilmesi konusunda destek ve tecrübelerini benden esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e teşekkür ederim.

Her zaman ve her konuda maddi ve manevi olarak beni destekledikleri ve sahip oldukları her şeyi benimle paylaştıkları için AİLEM'e teşekkürü borç bilirim.

Tezimin bitirilmesinde bana yardımcı olan ve destekleyen bütün arkadaşlarıma ve herkese yürekten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Fabaceae Familyası ve <i>Medicago</i> Cinsi	4
2.2 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	5
2.2.1 Serbest radikal kavramı	5
2.3 Antioksidanlar	9
2.4 Enzim İnhibisyonu	14
3. MALZEME VE YÖNTEM	17
3.1 Örneklerin Toplanması	17
3.2 Özütlerin Hazırlanması	18
3.3 Antioksidan Aktivite Metotları	18
3.3.1 Toplam fenolik içerik	18
3.3.2 Toplam flavonoid içerik	18
3.3.3 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)	19
3.3.4 Bakır iyonları indirgeme aktivitesi (CUPRAC)	19
3.4 Enzim İnhibisyon Testleri	19
3.4.1 Kolinesteraz inhibisyonu	19
3.4.2 α -amilaz inhibisyonu	20
3.4.3 α -glukozidaz inhibisyonu	20
3.4.4 Tirozinaz inhibisyonu	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1 Antioksidan Aktivite	21
4.1.1 Toplam fenolik ve flavonoid içerik	21
4.1.2 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)	24
4.1.3 Bakır iyonları indirgeme gücü aktivitesi (CUPRAC)	25
4.2 Enzim İnhibisyon Aktivitesi	26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	44

ÖZET

MEDICAGO MUREX VAR. MUREX'İN (FABACEAE) IN VITRO ANTIOKSİDAN VE BAZI ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Medicago türlerinin çoğu zengin protein içeriklerinden dolayı kaliteli yem bitkileri olarak kabul edilir. Kültüre edilmiş türlerinin hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde geniş bir şekilde tarımı yapılmaktadır. Bu çalışmada *Medicago murex* var. *murex* bitkisinin metanol, etil asetat ve su özütlerinin antioksidan özellikleri, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ve enzim inhibisyonları belirlendi. Farklı özütlerin antioksidan aktiviteleri demir (FRAP) ve bakır iyonları (CUPRAC) indirgeme yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri sırasıyla folin yöntemi ve $AlCl_3$ yöntemi ile belirlendi. Enzim inhibisyon aktiviteleri asetilkolinesteraz, α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaz enzimleri için test edildi. Farklı özütlerin toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin 83.70-163.93 mg GAE/g özüt ve 24.48-26.05 μg QE/g özüt arasında tespit edildi. Demir ve bakır iyonları indirgeme gücü yöntemlerinde sırasıyla su ve etil asetat özütleri en aktif özütler olmuştur. Su özütü asetilkolinesteraz enzimini en iyi inhibe eden özüt olurken etil asetat özütü çalışılan diğer üç enzimi de (α -amilaz, α -glukozidaz ve tirozinaz) en iyi inhibe eden özüt olmuştur. Elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda *Medicago murex* var. *murex*'in doğal antioksidanların ve enzim inhibitörlerinin önemli bir kaynağı olduğu görülmekte ve bitkinin gıda ve ilaç sektörleri için değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Medicago*, Enzim inhibisyon aktivitesi, Serbest radikaller, Antioksidan kapasite, Fenolik ve flavonoid içerik.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT AND INHIBITION PROPERTIES ON SOME ENZYME ACTIVITIES OF *MEDICAGO MUREX* VAR. *MUREX* (FABACEAE)

Most of the *Medicago* species are considered as good quality forage crops due to their protein rich content. Cultivated species are farmed extensively in commonly animal husbandry areas. In this study, antioxidant properties, total phenolic and flavonoid contents and enzyme inhibitions of methanol, ethyl acetate and water extracts of *Medicago murex* var. *murex* were determined. The antioxidant activities of the different extracts were evaluated using iron (FRAP) and copper ions (CUPRAC) reduction methods. Total phenolic and total flavonoid contents were determined by folin method and AlCl₃ method, respectively. The enzyme inhibition activities were tested against to acetylcholinesterase, α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase enzymes. Total phenolic and flavonoid contents of different extracts were determined between 83.70-163.93 mg GAE/g extract and 24.48-26.05 μ g QE/g extract. Water and ethylacetate extracts were the most active extracts in ferric and cupric ion reducing power methods, respectively. While the water extract was the best inhibitor of acetylcholinesterase enzyme, ethyl acetate extract was are the best inhibitors for studied other enzymes (α -amylase, α -glucosidase and tyrosinase). Considering the findings, *Medicago murex* var. *murex* can appear to be an important source of natural antioxidants and enzyme inhibitors and it can think as useful for the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Medicago*, Enzyme inhibition activity, Free radicals, Antioxidant capacity, Total phenolic and flavonoid content.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Enzimatik antioksidanların reaksiyonları (SOD, katalaz ve peroksidaz). ...9	
Şekil 2.2: Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz reaksiyonları.10	
Şekil 2.3: ω -3 ve ω -6 PUFA' ların yapısı.11	
Şekil 2.4: Vitamin ve minerallerin antioksidan aktiviteleri.12	
Şekil 2.5: Fenolün yapısı.13	
Şekil 2.6: Flavonoidlerin yapısı.13	
Şekil 2.7: Polifenollerin sınıflandırması.14	
Şekil 3.1: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i>17	
Şekil 4.1: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in toplam fenolik içeriği grafiği.23	
Şekil 4.2: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in toplam flavonoid içeriği grafiği.23	
Şekil 4.3: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in demir indirgeme antioksidan gücü grafiği.24	
Şekil 4.4: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in bakır iyonları indirgeme gücü aktivitesi grafiği.25	
Şekil 4.5: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in asetilkolin enzim inhibisyon aktivitesi.27	
Şekil 4.6: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in α -amilaz enzim inhibisyon aktivitesi.28	
Şekil 4.7: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in α -glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi.28	
Şekil 4.8: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi.29	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in farklı özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği.	22
Çizelge 4.2: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in demir indirgeme antioksidan gücü.	24
Çizelge 4.3: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in bakır indirgeme antioksidan aktivitesi.	25
Çizelge 4.4: <i>Medicago murex</i> var. <i>murex</i> ' in enzim inhibisyon aktiviteleri.	26



KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece santigrat
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ACAE	Akarboz eşdeğeri
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu)
AKSU	Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü herbaryumu
AlCl₃	Alüminyum klorür
CEQ	Kateşin eşdeğeri
ChE	Kolinesteraz
CuCl₂	Bakır (II) klorür
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeme antiokside gücü
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EPA	Eikosapentaenoik asit
Fe⁺²	Ferröz iyonu
Fe⁺³	Ferrik iyonu
FeCl₃	Demir (III) klorür
FRAP	Demir iyonu indirgeme antioksidan gücü
G	Gram
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GALAE	Galantamin eşdeğeri
GSH	Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HOCl	Hipkloröz asit
IKI	İyodin/potasyum iyodid
KAE	Kojik asit eşdeğeri
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-DOPA	Levodopa (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin)
M	Molar
M.Ö.	Milattan önce
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Na₂CO₃	Sodyum karbonat
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
O₂	Moleküler oksijen
O₂^{•-}	Süper oksit
O₂²⁻	Peroksit iyonu
OH[•]	Hidroksil radikali
PNPG	4-Nitrofenil β-D-glukopiranozid
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
QE	Kuersetin eşdeğeri
SOD	Süperoksit dismutaz
TE	Troloks eşdeğeri
TPTz	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazine
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı binlerce yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Samuelsson, 2004). Bitkilerin bu tıbbi kullanımı ilk önce bitkinin, toz, lapa, özüt gibi ham olarak kullanımını içermektedir (Balick ve Cox, 1996; Samuelsson, 2004). İnsanoğlunun bitkileri bu amaçlarla ilk kullanımları olan bu uygulamalar yazının icadından çok daha öncesine dayanmaktadır ve sözlü tarih vasıtasıyla aktarılacak antik çağlardaki ilk kayıtlara geçmiştir. Daha sonrasında bitkilerin ilaç olarak kullanımı 19. YY' ın başlarında morfinin izolasyonu ile başlayan bitkilerden aktif bileşenlerin izolasyonunu içermektedir (Kinghorn, 2001; Samuelsson, 2004). Tıbbi bitkilerden ilaç geliştirme çalışmaları morfinden sonra kinin, kokain ve kodein gibi bazıları hala kullanılan diğer etken maddelerinin izolasyonlarının yapılmasına neden oldu (Newman vd., 2000; Butler, 2004). Modernleşmenin başlangıcı ile insanlar bitkileri birçok amaç için kullanmıştır. Tarihi belgeler tıbbi bitkilerin geleneksel kullanımının M.Ö. 5000-4000 başlarında Çin' e, M.Ö. 1600' lerde Suriyeli' ler, Babil' ler, İbrani' ler ve Mısırlı' lara kadar dayanmaktadır (Dery vd., 1999). Günümüzde ise bitkilerin kimyasal ve genetik içeriklerinin belirlenerek insanların faydasına kullanımı oldukça önem kazanmıştır (Gerique, 2006). Bu bakımdan, çalışmalar modern ilaçların % 25' inden fazlasının tıbbi bitki özütlerinden türevlendiğini göstermektedir (Bannerman vd., 1983). Bitkilerin geleneksel tıpta kullanımı özellikle gelişmekte olan ülkelerde modern ilaçların yüksek fiyatlarından dolayı hala yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir (Seid ve Tsegay, 2011). Bütün bu nedenlere bağlı olarak Dünya nüfusunun %70' inden fazlası birinci derecede bitkisel tedavileri kullanmayı tercih etmektedir (Nair ve Ganapathi, 1998). Modern ilaçların içeriğindeki kimyasalların da büyük bir kısmı yine yüksek bitkilerden elde edilmektedir. Son çalışmalar bitkilerden elde edilen bu kimyasal bileşenlerin AIDS, kanser ve sıtma gibi hastalıklar ve romatizma, artrit ve astım gibi kronik rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Lee, 1999; Cecília de Fátima vd., 2006). Fabaceae familyasına ait bir cins olan *Medicago* önemli bir hayvan yemi kaynağı olarak tüm dünyada bilinmektedir. Çok yıllık bir bitki olan *Medicago sativa* (alfalfa: yonca) bu cinsin en yaygın kültüre edilmiş türü olup yılda yaklaşık 35 milyon hektarda yetiştirilmektedir. Diğer önemli

türleri *M. polymorpha*, *M. truncatula* ve *M. murex*’ tir (Howieson ve Ewing, 1986; Howieson vd., 2000; Radović vd., 2009).

Reaktif oksijen türleri süper oksit anyonu, hidroksil radikali ve nitrik oksit radikali gibi oksijen merkezli radikaller ile hidrojen peroksit, peroksi nitrit anyonu ve hipokloröz asit gibi radikal olmayan türevlerde bu grupta sınıflandırılmaktadır (Halliwell, 1993). Kimyasal yapılarında paylaşılmamış elektron içeren bu moleküller karakteristik olarak yüksek reaktiviteye sahiptirler. Serbest radikal üretimine bağlı oluşan oksidatif stres koşullarının kanser, alzheimer, aterosklerozis, parkinson, yaşlanma, diyabet, bağışıklık yetersizliği hastalıkları ve astım gibi pek çok dejeneratif insan hastalığının ortaya çıkışı ve gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Mimica-Dukić vd., 2010; Moein vd., 2008; Saikat vd., 2010; Elseweidy vd., 2015).

Epidemiyolojik çalışmalar bitkisel ürünlerin kansere karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bitkisel fenoller fenil halkasına eklenen hidroksil grubu içermelerinden dolayı kimyasal doğaları gereği antioksidan özelliğe sahiptirler. Bu özellik fenolik bileşiklerin kardiyovasküler ve kanser gibi hastalıkların üzerine faydalı etkilere sahip olmasını sağlamaktadır (Wattenberg, 1992; Ness ve Powles, 1997). Bitkisel fenoller geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarına rağmen pek çoğu fenil alanin amino asitinden orijinlenen sinnamik asitin anahtar rol oynadığı yolda sentezlenir (Parr ve Bolwell, 2000). Bu yol ile gerçekleşen biyosentez olayları geniş bir çeşitlilikteki bitkisel fenollerin oluşumunu sağlar. Bunlar içerisinde sinnamik asitler, benzoik asitler, flavonoidler, proantosiyanidinler, stilbenler, kumarinler, lignanlar ve lignin gibi bitkisel bileşenlerdir (Hollman, 2001). Bu fenolik bileşiklerin antioksidatif özellikleri sayesinde DNA, lipidler ve proteinler gibi yaşamsal biyomoleküllere reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarı engelleyerek kronik hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu radikallerin biyomoleküllere etkisi sonucu oluşan oksidatif hasar aterosklerozis, kanser ve kronik inflamasyonu içeren birçok patolojik şartların ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır (Halliwell, 1994).

Bu çalışmada *Medicago murex* WILLD. var. *murex* bitkisinden elde edilen metanol, etil asetat ve su özütlerinin antioksidan aktiviteleri ile enzim inhibisyon özellikleri araştırılmıştır. Ülkemizde oldukça geniş yayılışa sahip olan bu tür yem bitkisi olması dolayısıyla hayvancılık açısından da önemlidir. *Medicago murex*’ in tıbbi amaçlarla kullanımına dair çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma ile bitkinin antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri belirlenerek bitkinin tıbbi kullanım potansiyeline sahip olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Elde

edilen bilgiler doğrultusunda bitkiden elde edilen özütlerin etkili bir doğal antioksidan ve enzim inhibisyon kaynağı olduğu söylenebilir. Özellikle global hastalıklar için yeni tedavi yaklaşımlarının önemli olduğu günümüzde tez kapsamında değerlendirilen *Medicago murex*' in doğal enzim inhibitörü olarak değerlendirilme potansiyeli de ortaya çıkarılmıştır. Buna göre çalışılan enzimler üzerinde etkili inhibisyon aktiviteleri dolayısıyla bu enzimlerle ilgili hastalıkların tedavisi için kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu veriler bitkinin farmakoloji ve gıda endüstrisi gibi alanlarında değerlendirilebileceğini göstermiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Fabaceae Familyası ve *Medicago* Cinsi

Fabaceae familyası yaklaşık 751 cins ve 19500 tür ile Orchidaceae ve Asteraceae familyalarından sonra en büyük üçüncü familyadır (Christenhusz ve Byng, 2016). Familya ağaçlar, çalılar, otsu bitkiler ve sarmaşık gibi farklı bitkisel formları içeren geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Ağaçlar genellikle tropik bölgelerde sıklıkla bulunurken, çalılar ve otsu türler tropikler dışında tüm dünyada yaygın olarak dağılışı göstermektedir (Watson ve Dallwitz, 2008). Baklagiller, bolluğu ve çeşitliliği nedeniyle eski çağlardan beri tarım, gıda ve tıbbi kullanım gibi konularda insanoğlunun ilgisini çekmiş ve bunun sonucu olarak çok fazla tür kültüre edilerek oldukça büyük ekonomik değer kazanmıştır. Baklagillerin bir çok türü, çok yıllık otsu bitkilerle karşılıklı ekolojik ve besinsel tamamlayıcı özelliklerinden dolayı meraların bileşiminde oldukça yaygın bulunmaktadır (Nyfeler vd., 2011; Gaba vd., 2015). Bu familya üyelerinin geneli atmosfer azotunu fikse edebilme özelliğindeki bakterilerle girdikleri mutualist ilişkileri sayesinde azot içeriği düşük olan topraklarda bile yetişerek yüksek protein içeriğine sahip olabilmektedir (Suter vd., 2015; Vertes vd., 2015). Bu şekilde insan ve hayvan beslenmesinde zengin bir besin kaynağı olmaları yanında gübre kullanımını da azaltmaktadır.

Medicago murex' in sistematik şeması aşağıdaki gibidir;

Kingdom Plantae

Subkingdom Tracheobionta

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Subclass Rosidae

Order Fabales

Family Fabaceae

Genus *Medicago*

Species *Medicago murex* WILLD.

2.2 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

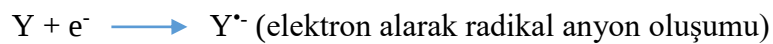
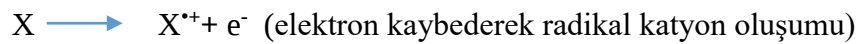
2.2.1 Serbest radikal kavramı

Serbest radikal kavramı son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron içeren atom veya bileşikler olarak tanımlanır. Bunun dışında yapısında tek sayıda elektron içeren atom veya moleküllerdir şeklinde de tanımlanabilir (Slater, 1984). Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller, genellikle biyokimyasal oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sırasında gerçekleşen elektronların bir molekülden diğerine transferi sonucu meydana gelmektedirler (Akkuş, 1995). Serbest radikaller biyolojik sistemler üzerinde faydalı ve zararlı etkiler olmak üzere iki farklı role sahiptirler. Faydalı etkileri düşük veya ılımlı konsantrasyonlarda ve fizyolojik tepkiler olan enfeksiyon ajanlarına karşı hücrel cevap ve sinyal iletim yollarında oluşmaktadır (Dröge, 2002).

Reaktif oksijen veya nitrojen türlerinin zararlı etkileri, moleküler yapılarına katılan bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektronun onları aşırı kararsız hale dönüştürmesi sonucu hücre bileşenlerine doğrudan saldırımlarıdır. Serbest radikallerin elektronları hücrede var olan diğer moleküllerle etkileşime girecek boyutlara ulaşması ile oksidatif stres denilen durum ortaya çıkmakta ve hücrede hasar meydana getirebilmektedir. Oksidatif hasarın sonucu enfeksiyonlar, inflamasyon, nörodejenerasyon, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diyabet gibi yaygın ve geniş bir hücrel patoloji olaylarıdır (Valko vd., 2007; Pham-Huy vd., 2008). Bu patolojik durumların, radikallerin proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücrenin temel bileşenlerinde önemli hasarlara yol açması ile ortaya çıktığı veya ilerlediği düşünülmektedir (Gümüş ve Yurtsever, 2007).

2.2.1.1 Serbest radikaller nasıl oluşur

Canlı sistemlerde pek çok molekül radikal özelliğe sahip olmamasına rağmen bazı reaksiyonlar sonucu doğal olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Normal biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda bile radikal olmayan bir bileşikten tek elektron kaybı ile radikal özellikteki bileşikler oluşabilmektedir.



Radikaller kovalent bağı oluşturan her bir atomun elektron çiftlerinden birisini alarak meydana gelen homolitik kırılma esnasında da oluşur (Cheeseman ve Slater, 1993). Bağın kırılması için gerekli olan enerji ısı, ultraviyole ışık, iyonize edici radyasyon

tarafından sağlanabilmektedir. Kovalent bağların kırılması genellikle 450-600 °C gibi yüksek sıcaklık gerektirmektedir. Bu nedenle gaz fazda yüksek sıcaklık uygulanan yanma olayları da serbest radikal oluşum yöntemleri arasında sayılmaktadır (Valko vd., 2007). Sigara dumanı veya yangın esnasında oluşan duman buna iyi bir örnektir. Aerobik canlıların yaşam için bağımlı olduğu oksijen (O_2) bir elektron eklenmesi ile süperoksite ($O_2^{\bullet-}$) dönüşmektedir. Süperoksite diğer bir elektronun eklenmesiyle peroksit iyonu (O_2^{2-}) oluşmaktadır. Genellikle biyolojide, oksijenin (O_2) iki elektron indirgeme ürünü hidrojen peroksittir. Reaktif oksijen türleri oksijenden türeyen fakat ondan daha reaktif olan oksijen türevlerinin genel adıdır. Bu tanımlama sadece süperoksit ve diğer oksijen radikallerini değil aynı zamanda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan oksijen türevlerini de kapsamaktadır. Süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri biyolojik moleküllerle reaksiyonlarında seçicidir ve suyun homolitik parçalanmasıyla oluşan hidroksil radikalının ($OH^{\bullet}$) tersine çoğunlukla biyomoleküllere saldırmaz (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Ancak oksijenin fazlalığı süperoksit radikalının üretiminde artışa ve buna bağlı olarak biyomoleküllere zarar veren diğer radikallerin oluşumunda artışa neden olduğu bildirilmektedir (Halliwell, 1994).

Serbest radikallerin hücrede meydana gelişleri endojen ve ekzojen kaynaklı faktörlere bağlı oluşum şeklinde iki başlık altında toplanabilir. Ekzojen kaynaklı etmenler olarak: hava kirliliği, ilaçlar veya diğer kimyasallar, sigara, radyasyon, bazı solventler, alkol ve uyuşturucu gibi çevresel etkiler sonucunda serbest radikal üretimi örnek gösterilebilmektedir. Endojen kaynaklı serbest radikal üretimi vücutta enerji metabolizması başta olmak üzere anabolik ve katabolik biyokimyasal reaksiyonlar sırasında özellikle mitokondride elektron taşıma zinciri bileşenleri en önemli kaynaklar olarak sayılmaktadır (Seifried vd., 2007).

2.2.1.2 Oksidatif stres ve etkileri

Oksidatif stres, vücutta bulunan antioksidan savunma sistemi ve prooksidan seviyesi arasındaki dengenin, prooksidanların lehine bozulması olarak tanımlanabilir (Powers ve Jackson, 2008). Oksidatif stres düzeyinin artmasıyla nükleik asit, protein ve lipid gibi biyomoleküllerin oksitlenmesi, DNA protein yapısının ve kodlanan genel bilgilerin bozulması, hücre membran bütünlüğünün bozulması ve enzim aktivitesinin engellenmesi gibi birçok etki ortaya çıkmaktadır. (Packer, 1997).

Vücutta oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması birçok hastalığa neden olmaktadır. Oksidatif stres özellikle damar sertliği, kanser, inflamasyon, obezite, romatoid artrit, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların temel kaynakları arasında görülmektedir.

Oksidatif stres değerini doğrudan ölçmek mümkün değildir, çünkü serbest radikallerin yarılanma ömürleri çok kısadır. (Close vd., 2005) Bu yüzden bazı biyo-işaretler kullanılarak protein, lipit ve DNA gibi önemli yapıların bozulup bozulmadığı veya ne seviyede bir zarara maruz kaldıkları ölçülmektedir (Fisher-Wellman ve Bloomer, 2009).

2.2.1.3 Serbest radikallerin hastalıklarla ilişkileri

Oksijen insan yaşamı için hayati derecede önemli olmasına rağmen biyokimyasal reaksiyonlar esnasında oksijenden üretilen bir kısım reaktif oksijen türleri ise vücut üzerine zarar verici etkilere sahiptir (Diplock vd., 1998). Serbest radikallerin düşük ve ılımlı konsantrasyonları fagositoz ile enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmaları, enerji üretimi, hücre gelişimi, farklı hücre sinyal sistemlerinde ve mitojenik tepkinin başlatılması gibi fizyolojik olaylarda faydalı etkiler göstermektedir (Poli vd., 2004; Davies, 2013). Reaktif oksijen radikalleri oksijen ve diğer pek çok molekül ile kıyaslandığında oldukça yüksek reaktiviteye sahip oldukları görülmektedir (Nawar, 1996). Büyük çoğunluğu serbest radikal olan bu reaktif oksijen türleri yapılarında dış atomik yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron taşıdıkları için stabil bir yapıya sahip değildirler. Eşlenmemiş olan elektron bu moleküllerin yüksek reaktivitelerinin temel sebebidir ve bu reaktivite nedeniyle canlı sistemlerde bulundukları ortamlardaki yapısal ve fonksiyonel moleküller olan proteinler, lipidler, DNA ve koenzimler gibi biyolojik moleküllerle etkileşerek yapılarının bozulmasına neden olabilmektedirler. Bu konudaki çalışmaların artmasıyla hidrojen peroksit, hidroksil ve nitrik oksit gibi canlı sistemlerde sürekli olarak oluşan reaktif oksijen türleri ile yaşlanma, sinyal iletimi ve pek çok hastalığın sebebi ve ilerlemesi arasında ciddi kanıtlar elde edilmiştir (Stadtman ve Berlett, 1997; Beckman ve Ames, 1998; Rhee, 1999; Thannickal ve Fanburg, 2000). Bu serbest radikallerin reaksiyonları proteinlerin lizin, arjinin, prolin, treonin ve glutamik asit kalıntıların gibi yan zincirleriyle etkileşerek karbonil türevlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Taborsky ve McCollum, 1973; Poston, 1988; Amici vd., 1989; Stadtman ve Berlett, 1997). Bu radikaller proteinlerin ana

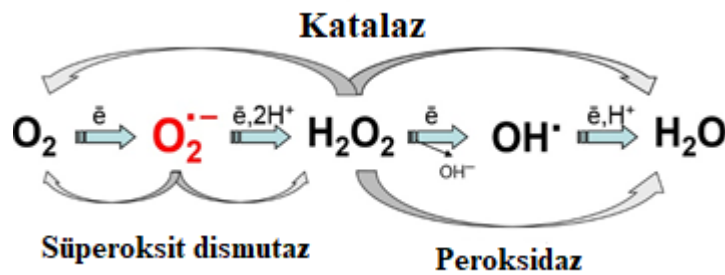
omurgasında bölünmelere ve N terminalindeki amino asidin N- α -ketoaçıl türevlerinin oluşumuna neden olabilmektedir (Amici vd., 1989). Bu nedenle karbonil türevlerinin varlığı ve miktarı insan dokularında serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Örneğin normal bireylerden alınarak kültüre edilmiş dermal fibroblastlar (Oliver vd., 1987), lens (Garland vd., 1988) ve beyin dokusu (Smith vd., 1991) hücrelerinin protein karbonil içeriğinin yaşa bağlı olarak arttığı gösterilmiştir. Oksijen türevli serbest radikallerin reaksiyonları canlı organizmlardaki neden olduğu reaksiyonlar ve etkiler sonucunda pek çok hastalığın patojenezinde rol oynamaktadır (Gupta vd., 1997; Kehler ve Smith, 1994; O'Donovan ve Fernandes, 2004; Agarwal ve Prabakaran, 2005; Pourmorad vd., 2006; Dufour vd., 2007; Valko vd., 2007; Pham-Huy vd., 2008; Sen vd., 2009). Serbest radikallerle ilişkili olan hastalıklar ve patolojiler şunlardır;

- Alzheimer, Parkinson, multiple sklerozis, amiyotrofik lateral skleroz, hafıza kaybı ve depresyon gibi nörodejeneratif hastalıklar
- Aterosklerozis, iskemik kalp hastalıkları, kardiyak hipertrofi, hipertansiyon, şok ve travma gibi kardiyovasküler sistem hastalıkları
- Astım ve Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) gibi inflamatuvar akciğer hastalıkları
- Prematüre bebeklerde görülen bronkopulmoner, displazi, periventriküler lökomalazi, intraventriküler kanama, prematüre retinopatisi ve nekrotizan enterokolit gibi hastalıklar
- Romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar
- Glomerülonefrit ve tubulointerstisyel nefrit, kronik böbrek yetmezliği, proteinüri, üremi gibi böbrek hastalıkları
- Peptik ülser, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve kolit gibi gastrointestinal sistem hastalıkları
- Akciğer, lökomi, göğüs, ovaryum kanseri veya tümörleri
- Katarakt, makulopati ve retinanın yaşlanmaya bağlı bozuklukları gibi göz hastalıkları
- Yaşlanma
- Diyabet
- Deri lezyonları
- İmmünodepresyon

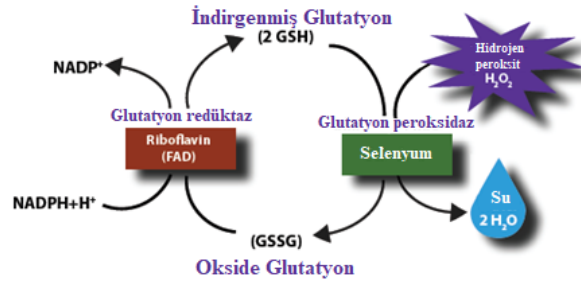
- Karaciğer hastalıkları, pankreatitis
- AIDS
- Kısırlık

2.3 Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerinin giderilmesi vücudumuzda enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar ile sağlanmaktadır. Bu temel savunma sistemleri süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve antioksidan besinlerdir (Fang vd., 2002). Glutatyon, glutamat, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Hücresel antioksidan sistemin önemli bir bileşeni olan glutatyon ince bağırsaktan emilerek ya da vücutta sentezlenerek elde edilebildiğinden hem ekzojen hemde endojen kaynaklı bir antioksidandır. Glutatyon enzimatik olarak doğrudan ve dolaylı reaksiyonlar sayesinde reaktif oksijen türlerini (lipit peroksil radikali, peroksinitrit ve hidrojen peroksit) giderir (Sies, 1999). SOD ise süper oksit radikalinden hidrojen peroksit oluşumunu katalizler. Bu reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksit katalaz ve selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz tarafından suya dönüştürülerek zararsız hale getirilir (Şekil 2.1). Bunun dışında glutatyon peroksidaz lipid hidroperoksitlerini alkollere dönüştürerek detoksifiye etmektedir (Şekil 2.2). Ayrıca glutatyon peroksidazın diğer bir tipi de membran yapısındaki fosfolipid peroksitler üzerine etkili olmaktadır (Sies, 1999). Diğer reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin giderilmesi ürik asit, salisilat, mannitol, karotenoid, ubikinon, bilirubin, lipoat, arjinin, sitrüllin, glisin, taurin, histidin, kreatin, karnosin, hidrobioplerin ve fitat gibi biyokimyasal moleküller tarafından gerçekleştirilebilir (Machlin ve Bendich, 1987; Redmond vd., 1996; Fridovich, 1999; Wu ve Meininger, 2000; Akashi vd., 2001; Lass vd., 2002; Lawler vd., 2002).



Şekil 2.1: Enzimatik antioksidanların reaksiyonları (SOD, katalaz ve peroksidaz).

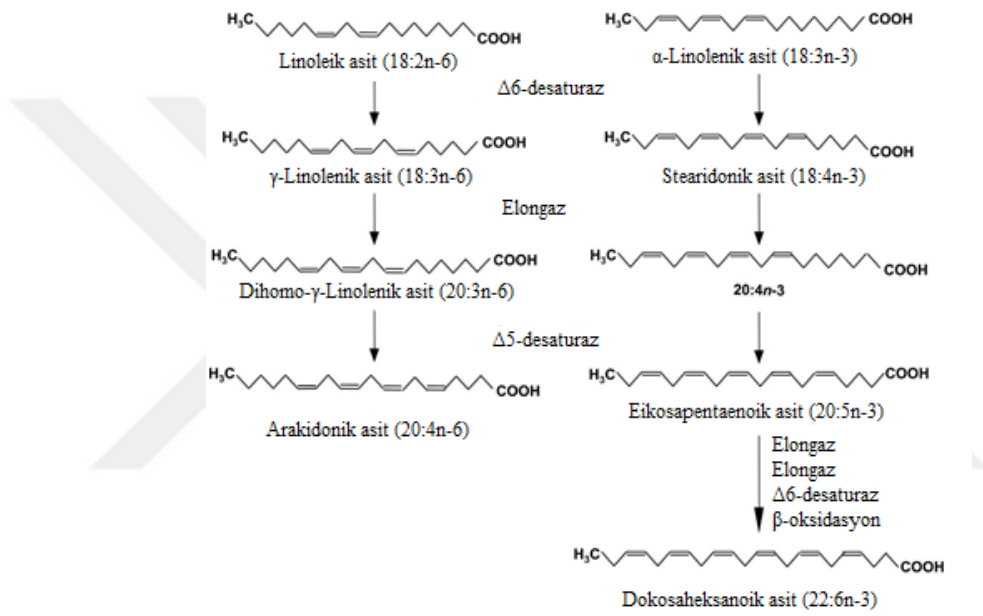


Şekil 2.2: Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz reaksiyonları.

Vücudumuzda üretilen ve antioksidan aktiviteye direk ya da dolaylı katkı sağlayan bu moleküllerin dışında diyetle alınan proteinler, lipidler, vitaminler, mineraller ve fitokimyasallar gibi bileşikler de serbest radikal giderme aktivitesine sahiptir. Bazı amino asitler (arjinin, sitrüllin, glisin, taurin, histidin), küçük peptitler (glutasyon ve karnosin) ve nitrojen metabolitleri (kreatin ve ürik asit) oksijen serbest radikallerinin giderilmesi üzerine direkt etkilere sahiptir. Ek olarak, taurine ve taurin kloraminin makrofajlar, hepatositler ve glial hücrelerde NO gen ekspresyonu ve sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Wu ve Meininger, 2002). Bu nedenle proteinlerin besinsel eksikliği sadece antioksidan enzimlerin sentezinde bozukluklara neden olmakla kalmayıp aynı zamanda antioksidanların dokudaki konsantrasyonun da azalmasına neden olmaktadır (Machlin ve Bendich, 1987; Sies, 1999). Özellikle çocuklarda kwashiorkor gibi beslenme bozukluklarında çocukların kemik iliği ve idrarında şelatlanabilir demir miktarı aşırı miktarda artmaktadır. Bu nedenle protein eksikliği olan çocuklarda anormal durumun altyapısının reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarından kaynaklandığını ileri sürülmektedirler (Brooks, 1995).

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) serbest radikaller tarafından okside edilebilir (Şekil 2.3) (Hennig vd., 2001). Bu yüzden PUFA' nın yüksek miktarda alınması organizmayı lipid peroksidasyonuna daha duyarlı hale getirebilir ve bu C vitamini, E vitamini ve karotenoidler gibi antioksidanların besinsel katkısı ile hafifletilebilir (Evans ve Halliwell, 2001; Fang vd., 2002). Epidemiyolojik çalışmalar ω -3 PUFA yönünden zengin olan balık yağının tüketiminin insanda kardiyovasküler hastalık riskini düşürdüğünü göstermiştir (Brown ve Hu, 2001). Bu etki karaciğerde lipojenezin inhibisyonu ve yağ asitlerinin oksidasyonunun uyarılmasından kaynaklanmaktadır. Ancak ilginç bir şekilde diğer PUFA' larda olduğu gibi, balık yağı kolayca hidrojen peroksit oluşturmak üzere peroksitlenebilir ve oksidatif stres artışına katkı sağlayabilir. Balık yağı ve PUFA' lar ile ilgili bu zıt durumu anlamak için yapılan

son çalışmalar, ω -6 PUFA' ların aksine, ω -3 PUFA' ların serbest radikal oluşumunu önleyici aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir (Takahashi vd., 2002; Wu ve Meininger, 2002). Bu nedenle balık yağından zengin bir diyetle beslenmek antioksidan genlerin ekspresyonunu artırmaktadır (Takahashi vd., 2002). Ayrıca ω -3 PUFA'lar (DHA, EPA ve α -linolenik asit) makrofajlar tarafından sentezlenen NO üretimini inhibe etmektedir (Khair-El-Din vd., 1996). Böylece, ω -3 PUFA kardiyovasküler fonksiyon üzerine yararlı etkisini plazma triaçilgliserol konsantrasyonunu düşürerek ve serbest radikal üretimini inhibe ederek ortaya çıkarmaktadır.

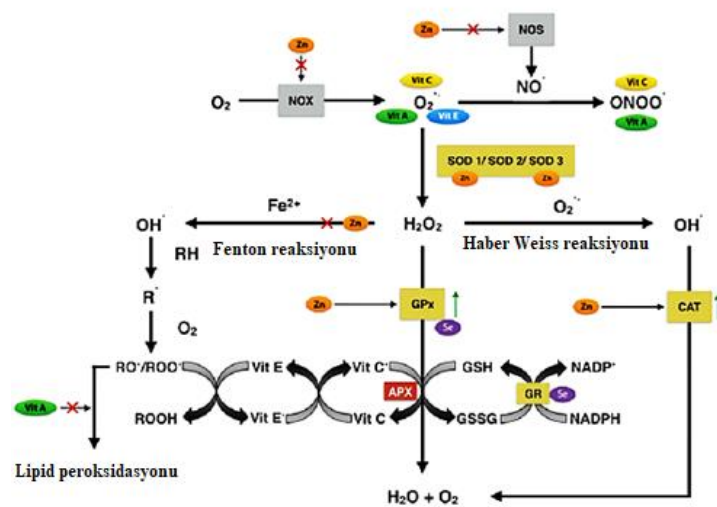


Şekil 2.3: ω -3 ve ω -6 PUFA' ların yapısı.

Pek çok vitamin özellikle NO sentezini inhibe ederek antiaterojenik ve antinöroinflamatuvar aktivite göstermektedir (Wu ve Meininger, 2002). Örneğin A vitamini vasküler düz kas hücreleri (Hirokawa vd., 1994), endotelial hücreler (Grosjean vd., 2001), kardiyak miyositler (Grosjean vd., 2001), mesangial hücrelerde (Datta ve Lianos, 1999) gen transkripsiyonunu inhibe ederek NO sentezini durdururlar. Aynı şekilde D₃ vitamini, K₂ vitamini ve niasin gen ekspresyonunu inhibe ederek beyin (Garcion vd., 1997), akciğer (Gurujeyalakshmi vd., 2000) ve vasküler düz kas hücrelerinde (Sano vd., 1999) NO üretimini önlerler. Vitaminler ayrıca doğrudan reaktif oksijen türlerini giderir ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenler (Şekil 2.4). Bunların arasında, E vitamini en önemli antioksidanlardan biri olarak kabul edilmiştir. E vitamini, reaktif oksijen türlerinin etkisiyle oluşan lipit peroksil

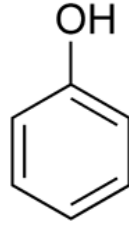
radikallerinin neden olduğu peroksidasyondan, plazma çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) oksidatif zararından, hücre proteinleri, DNA ve membranı korur (Topinka vd., 1989). C vitamininin de antioksidan rolü olduğu bilinmektedir (Aruoma, 1998). Radyasyon veya hidroksil radikaline maruz kalan DNA' da C vitamininin serbest radikal tarafından uyarılan oksidatif hasara karşı koruyucu bir etki sergilediğini tespit edilmiştir (Fischer-Nielsen vd., 1992). B₁₂ vitamini ve folik asidin besinsel takviyesi, radikal kaynaklı radyasyon hasarını azaltır (Ye-fu vd., 1982; Yunzhong vd., 1983; Yunzhong vd., 1984). B₁₂ vitamini, folik asit ve kolin DNA ve proteinlerin metilasyonu için gereklidir. Folik asit, B₆ vitamini ve B₁₂ vitamini homosistein metabolize olması için gereklidir. Homosistein endotel hücrelerinde oksidatif strese neden olurken vitaminler kardiyovasküler hastalıklar riskini düşürmeye yardımcı olmaktadır (Wu ve Meininger, 2002).

Birçok mineral enzimlerin fonksiyonlarında önemli rollere sahiptir. Vücutta en bol bulunan mineral demirdir ve neredeyse tamamı proteinlere bağlı haldedir. Bu durumun demirin suda çözünmemesinden ve serbest radikal üretiminde katkı sağlamasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Bakır, çinko ve manganez SOD enziminin aktivitesinde rol oynadıklarından bu mineraller antioksidan aktiviteye katkıda bulunmaktadır (Aruoma, 1998). Benzer şekilde selenyum glutatyon peroksidaz aktivitesi için gereklidir (Aruoma, 1998). Selenyumun eksikliği glutatyon peroksidaz aktivitesini %90 oranında düşürmekte ve bunun sonucu olarak peroksidatif hasar ve mitokondrial bozukluklar ortaya çıkmaktadır (Xia vd., 1985).

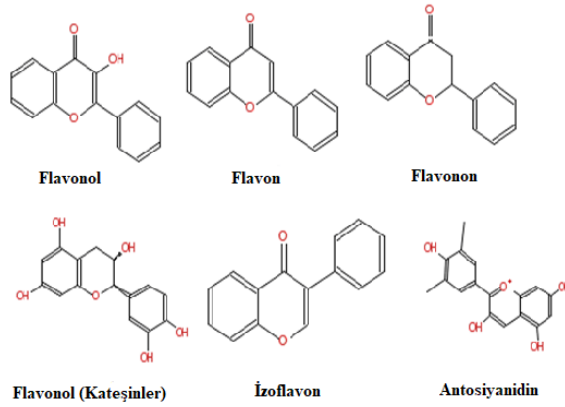


Şekil 2.4: Vitamin ve minerallerin antioksidan aktiviteleri.

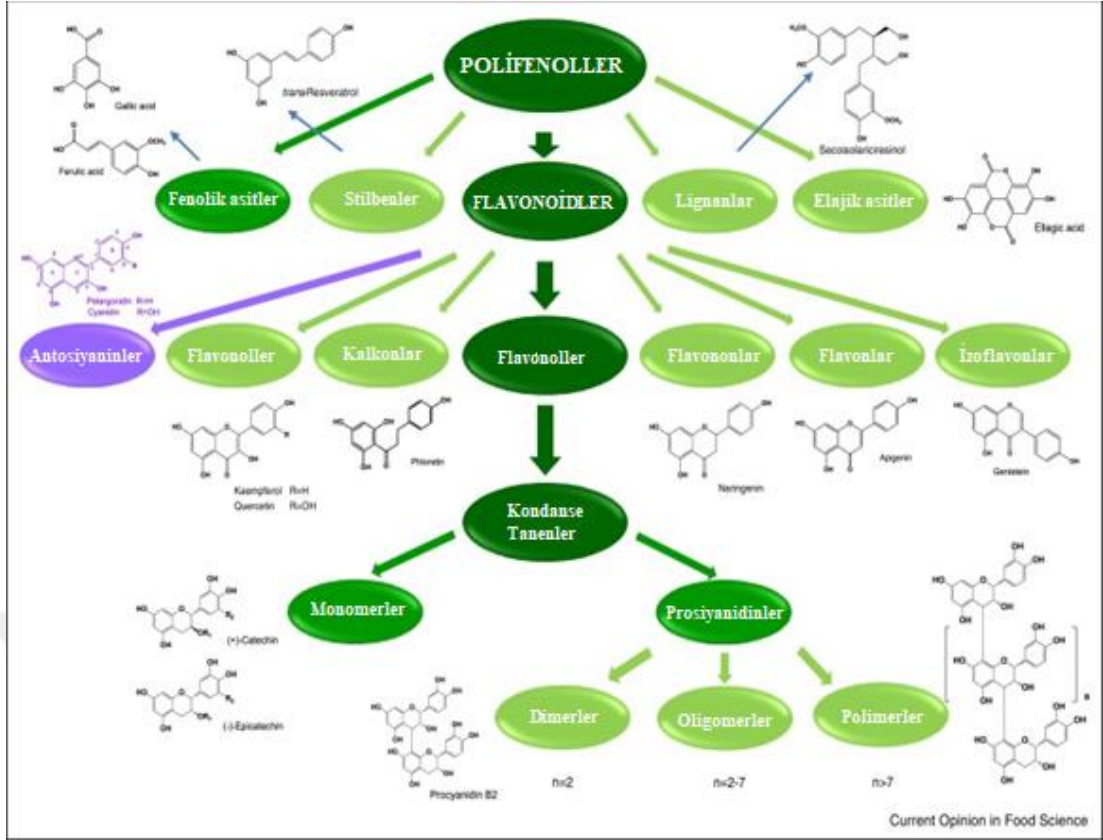
Fitokimyasallar özellikle bitkisel kaynaklı bir diyetten gelen ve önemli seviyede antioksidan aktiviteye sahip olan doğal bileşiklerdir. Bunların arasında flavonoidler ve kateşinler gibi fenolik ve polifenolik bileşikler antioksidan aktivite gösteren önemli bileşiklerdir (Şekil 2.5; 2.6 ve 2.7) (Decker, 1995; Fang vd., 2002). Polifenolik bileşiklerin faydalı etkileri üzerine pek çok çalışma onların serbest radikal giderme aktivitelerinin hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalar polifenollerin kırmızı kan hücrelerinin oksidatif strese karşı direncini artırdığını göstermiştir (Youdim vd., 2000). Ayrıca LDL' nin oksidasyonunu inhibe ederek hidroksil ve süperoksit radikallerinin giderilmesinde oldukça etkilidir (Fang vd., 1998). Buna ek olarak polifenollerin besinsel takviyesi ile insanda HDL konsantrasyonunun artarken total kolesterol seviyesinin düşmesine neden olduğu gösterilmiştir. Bunların yanında yine polifenollerin koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon ve tip 2 diyabet tedavisinde faydalı olduğu bildirilmiştir (Fang vd., 1998). Pek çok kanserli insan hücre hatlarında *in vitro* olarak büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir (Yang vd., 1998). β karoten ve diğer karotenoidler bitkisel kökenli diğer antioksidanlardır (Aruoma, 1998).



Şekil 2.5: Fenolün yapısı.



Şekil 2.6: Flavonoidlerin yapısı.



Şekil 2.7: Polifenollerin sınıflandırması (Zhang ve Tsao, 2016).

2.4 Enzim İnhibisyonu

Enzim katalizli reaksiyonların hızını etkileyen bileşikler modilatörler, moderatörler veya modifikatörler olarak adlandırılır (John ve Simons, 2005). Genellikle etki enzimin hızını düşürür ki bu durum inhibisyon düşüren madde inhibitör olarak adlandırılırken enzim reaksiyon hızının artması durumu ise aktivasyon artırıcı madde aktivatör olarak adlandırılır. Enzim inhibitörleri herbisit veya pestisit gibi kullanımlarının yanı sıra insan veya hayvan sağlığında farmasötikal ajanlar olarak kullanılmaktadır. Enzim inhibisyonu, enzim mekanizmasının aydınlatılması ve farmasötikal çalışmalarda oldukça ilgi çektiğinden yaygın olarak incelenmektedir. İnhibitörler genellikle iki gruba ayrılır. İlki enzim yüzeyinin çeşitli kısımları ile kovalent olmayan bağlarla etkileşerek geri dönüşümlü olarak gerçekleşen inhibisyonudur. İkinci grup enzim yüzeyindeki farklı fonksiyonel gruplar ile güçlü kovalent bağlar yaparak etkileşime giren geri dönüşümsüz inhibitörlerdir. İnhibitörler kullanılarak biyokimyasal reaksiyonların hızının düşürülmesi ya da tamamen durdurulması pek çok hastalığın tedavisinde umut verici bir gelişmedir.

Tirozinaz, iki fonksiyonlu bir enzimdir; monofenollerin hidroksilasyonunu katalize eder (kresolaz aktivitesi) ve katekollerin ilgili kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) (Riley, 2000; Seo vd., 2003). Kinonlar melanin gibi biyopolimerlerin oluşumuyla sonuçlanan bazı reaksiyonları takip eder (Yasunobu, 1959). Tirozinaz pigmentasyon, sklerotizasyon (böceklerde kütikulanın sertleşmesi), birincil bağışıklık yanıtı ve konukçu savunması gibi pek çok temel biyolojik fonksiyonlardan sorumludur (Sánchez-Ferrer vd., 1995). Tirozinaz meyve ve sebzelerde istenmeyen bir özellik olan enzimatik kararmayı oluşturur. İstenmeyen renk ve kokuya ek olarak bu kararma tepkimesinde üretilen kinon bileşikler proteinlerin sülfidril ve amino grupları ile geri dönüşsüz reaksiyona girebilir. Kinon-protein reaksiyonu proteinin sindirilebilirliğini ve lizin, sisteini içeren esansiyel amino asitlerden biyoyararlanımı düşürür. Bu nedenle yüksek performanslı tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi tarım ve gıda alanında önemli bir gerekliliktir (Kim ve Uyama, 2005). Ayrıca tirozinaz inhibitörleri melanin hiperpigmentasyonu ile ilgili bazı deri hastalıklarının tedavisinde klinikte de önemli kullanım alanına sahiptir. Bu inhibitörler kozmetikte deri ağartıcı etkileri için kullanılmaktadır (Maeda ve Fukuda, 1991). Tirozinaz enziminin en iyi bilinen inhibitörlerinden olan kojik asit *Aspergillus* ve *Penicillium*' un pek çok türü tarafından aerobik prosesler ile çeşitli karbon kaynaklarından üretilen bir antibiyotiktir (Lee vd., 1986). Tirozinazı inhibe ettiği için beyazlatıcı etkisinden dolayı kozmetik bir ajan olarak kullanılmaktadır.

1979 yılından beri bir dizi kolinesteraz inhibitörü Alzheimer hastalığının tedavisi amacıyla klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Davis vd., 1979). Etki mekanizmasının, beyindeki sinaptik bölgelerdeki asetilkolin hidroliz oranındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir (Giacobini, 1987). Antikolinesteraz ajanlar nispeten düşük bir terapötik indekse sahiptir ve diğer mekanizmalarla birlikte seçici olmayan bir kolinesteraz inhibitörü olumsuz etkilere neden olabilir. Koelle vd., (1976), ganglionik bütirilkolinesterazın asetilkolinesterazın bir öncüsü olarak hizmet edebileceğini ve bütirilkolinesteraz seviyesinin asetilkolinesteraz sentezi oranını düzenleyebileceğini gösteren kanıtlar sağlamıştır. Bu iki enzimin inhibisyonu sonucu bu enzimlerin substratı olan asetilkolinin sinir doku (özellikle beyindeki) konsantrasyonunun artmasına ve buna bağlı olarak Alzheimer hastalığının oluşmasının önlenmesine neden olmaktadır (Murray vd., 2013).

Karbohidrat sindiriminde rol alan enzimler olan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibisyonu karbohidrat içeren bir diyetten sonra kan glukozunun artışını

önemli derecede düşürebilir ve bu nedenle tip 2 diyabet hastaları veya hastalık sınırında olanlar için yemek sonrası kan glukoz seviyesinin yönetilmesinde önemli bir strateji olabilir (Ali vd., 2006). Bu nedenle diyabet ve obezitenin tedavi ve önlenmesinde fizyolojik etkileri düzenleyen fonksiyonel gıdalar ve bitki temelli ilaçlar tekrar ilgi çekmeye başlamıştır. Dolayısıyla α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin *in vitro* inhibisyonu gibi çalışmalar günümüzde giderek yaygınlaşmaktadır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen α -glukozidaz ve α -amilaz inhibitörleri postprandial (yemek sonrası) hipergliseminin kontrolü için uygun bir strateji olarak görülmektedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Örneklerin Toplanması

Medicago murex var. *murex* örnekleri Aksaray ili, Karkın-Yuva kasabaları civarından 02.07.2015 tarihinde vejetasyon döneminde toplanmıştır (Şekil 3.1). Herbaryum örnekleri Aksaray Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü herbaryumunda (AKSU) BE-2226 toplayıcı numarası ile saklanmaktadır. Araziden toplanan bitkilerin tür teşhisleri Yrd. Doç. Dr. Bülent Eskin ve Mustafa Keskin tarafından yapılmıştır.



Şekil 3.1: *Medicago murex* var. *murex*.

3.2 Özütlerin Hazırlanması

Medicago murex var. *murex*' in topraküstü kısımları oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda preslenerek kurutuldu. Tamamen kuruyan örnekler laboratuvar tipi ticari blender kullanılarak iyice toz hale gelinceye kadar öğütüldü. Toz haline getirilen örneklerden metanol, etil asetat ve su özütleri elde etmek için 15' er g tartıldı. Methanol ve etil asetat özütleri Soxhlet aparatı kullanılarak 6-8 süreyle ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Su özütü ise demleme yöntemiyle kaynayan suda 30 dakika süreyle tutularak gerçekleştirildi. Ekstraksiyondan işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen özütler Whatmann süzgeç kağıdı ile süzölmüş ve Rotary Evaporatör ile vakum altında 60-70 °C' de çözücülerini tamamen uçuruldu. Tamamen kurutulan örneklerin toplam verimleri hesaplanmış ve örnekler analiz yapılincaya kadar -20°C' de depolandı. Analiz öncesi bu özütlerden 2 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı.

3.3 Antioksidan Aktivite Metotları

3.3.1 Toplam fenolik içerik

Farklı çözücüler ile elde edilen özütlerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlendi (Juranović Cindrić vd., 2011; Agbor vd., 2014). Buna göre, 2 mg/ml konsantrasyondaki farklı özütlerin 0.2 ml' si 1.5 ml distile su ve 0.5 ml %7' lik Na_2CO_3 ile karıştırıldı ve birkaç dakika beklendi. Daha sonra bu karışıma Folin-Ciocalteu (1 ml) eklendi. Karışım oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 2 saat inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 760 nm' de absorbansları okundu. Aynı işlemler standard olarak kullanılan farklı konsantrasyonlardaki (100, 50, 25, 12.5 µg/ml) Gallik asit çözeltilerine de uygulandı. Metotta kör olarak örnek yerine 0.2 ml methanol konularak hazırlanan karışım kullanıldı. Örnekler her bir özüt için 3' er örnek olacak şekilde 3 tekrarlı olarak okundu. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarının absorbansı kullanılarak elde edilen grafiğin denklemi yardımıyla örneklerin fenolik içerikleri Gallik asite eşdeğer olarak belirlendi (mg GAE/g özüt).

3.3.2 Toplam flavonoid içerik

Toplam flavonoid içerikler Arvouet-Grand vd., (1994)' nin yöntemine göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metotta özetle, %2' lik AlCl_3 ' ün 1 ml' si ile 1 ml özüt bir tüpte karıştırıldı. Bu şekilde hazırlanan örnekler yaklaşık 10 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra 415 nm' de köre karşı absorbansları okundu. Kör,

araştırılan örnekten alınan 1 ml özüt ve 1 ml metanolden oluşmaktadır. Farklı konsantrasyonlardaki Quercetin çözeltileri standart olarak kullanıldı. Standarttan elde edilen absorbans-konsantrasyon grafiğinin denklemi kullanılarak örneklerin toplam flavonoid içerikleri Quercetin eşdeğeri cinsinden belirlendi (mg QE/g özüt).

3.3.3 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)

Demir iyonlarını indirgeme antioksidan gücü Aktumsek vd., (2013b)' e göre gerçekleştirildi. Metot için öncelikle 10 ml distile suya 50 µl hidroklorik asit eklenerek 31.2 mg TPTz bu karışım iyice çözüldü. Ayrı bir kapta 10 ml distile su içerisinde 32 mg FeCl₃ çözüldü. Üçüncü bir kapta 250 ml distile su ile 4.1 ml asetik asit (%80) karıştırılarak bu karışımda 0.66 g sodyum asetat tamamen çözülerek tampon çözeltisi elde edildi. Bu üç karışım (tampon, TPTz ve FeCl₃) hacim olarak 10/1/1 oranları sağlanacak şekilde karıştırılarak bir karışım elde edildi. Elde edilen karışımdan 2 ml 0.1 ml özüt ile karıştırılarak 30 dakika 30 °C' de inkübe edildi. Troloksun farklı konsantrasyonları (25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µg/ml) standart olarak kullanılmıştır. Bu süre sonunda spektrofotometrede 593 nm' de örneklerin absorbansı okundu. Sonuçlar troloks eşdeğeri olarak verildi (mg TE/g özüt).

3.3.4 Bakır iyonları indirgeme aktivitesi (CUPRAC)

Örneklerin bakır iyonu indirgeme gücü Apak vd., (2006)' nin metodu kullanılarak belirlendi. Metot için amonyum asetat, CuCl₂ ve neocuproine çözeltilerinin her birinden 1' er ml alındı. Üzerine farklı konsantrasyonlardaki bitki özütlerinden 0.5 ml eklendi. Daha sonra tüplere 1' er ml distile su eklendi. Örnekler 30 dakika, karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm' de absorbansları okundu.

3.4 Enzim İnhibisyon Testleri

3.4.1 Kolinesteraz inhibisyonu

Kolinesteraz (ChE) inhibitör aktivitesi Ellman metodu kullanılarak Aktumsek vd., (2013a)' e göre ölçüldü. 50 µL örnek çözeltisi, 125 µL DTNB ve 25 µL asetilkolinesteraz (veya bütirilkolinesteraz) çözeltileri pH 8.0' daki Tris-HCl tamponu içerisinde karıştırıldı. Daha sonra mikropate (96 kuyucuklu) içerisinde 25 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon asetilkolin iyodinin veya bütirilkolin klorid eklenmesiyle başlatıldı. Enzim içermeyen kör benzer şekilde hazırlandı. Kör ve örnekler 10 dakika 25 °C' de inkübe edildikten sonra absorbansları 405 nm' de

okundu. Kolinesteraz enzimi inhibitör aktivitesi galanthamine eşdeğer olarak verildi (mg GALAE/g özüt).

3.4.2 α -amilaz inhibisyonu

α -amilaz inhibitör aktivitesi Yang vd., (2012)' nin geliştirdiği Caraway-Somogyi iyodin/potasyum iyodid (IKI) metodu kullanılarak belirlendi. Buna göre 25 μ L örnek çözeltisi ile 50 μ L α -amilaz çözeltisi fosfat tamponunda (pH 6.9, 6 mM sodyum klorid) mikropate (96 kuyucuklu) içerisinde karıştırıldı. Karışım 37 °C' de 10 dakika inkübe edildi. Bu ön inkübasyonu takiben 50 μ L nişasta çözeltisi (%0.05) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Kör olarak enzim içermeyen benzer şekilde hazırlanan karışım kullanıldı. Karışım 37 °C' de 10 dakika inkübe edildi ve 25 μ L, 1 M HCl eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra 100 μ L iyodin-potasyum iyodid çözeltisi eklendi. Kör ve örneklerin absorbansları 630 nm' de okundu. α -amilaz inhibitör aktivitesi sonuçları akarboz eşdeğeri olarak verildi (mm ACAE/g özüt).

3.4.3 α -glukozidaz inhibisyonu

Örneklerin α -glukozidaz enzimi inhibitör aktiviteleri Palanisamy vd., (2011)' e göre uygulandı. 50 μ L örnek çözeltisi, 50 μ L glutatyon, 50 μ L α -glukozidaz çözeltisi, pH 6.8 olan fosfat tamponu ve 50 μ L PNPG çözeltileri mikropate (96 kuyucuklu) içinde karıştırılarak 37 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Kör olarak enzim içermeyen benzer şekilde hazırlanan karışım kullanıldı. Reaksiyon 50 μ L, 0.2 M sodyum karbonat çözeltisi eklendiğinde durduruldu. Kör ve örneklerin absorbansları 405 nm' de okundu. α -glukozidaz inhibitör aktivitesi akarboz eşdeğeri olarak verildi (mm ACAE/g özüt).

3.4.4 Tirozinaz inhibisyonu

Örneklerin tirozinaz enzimi inhibitör aktiviteleri L-DOPA' nın substrat olarak kullanıldığı dopachrome metodu ile gerçekleştirildi (Orhan vd., 2012). 25 μ L örnek, 40 μ L tirozinaz ve 100 μ L, pH 6.8 olan fosfat tamponu ile mikropate (96 kuyucuklu) içerisinde karıştırıldı ve 25 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 40 μ L L-DOPA eklenmesiyle başlatıldı. Kör olarak enzim içermeyen benzer şekilde hazırlanan karışım kullanıldı. 25 °C' de 10 dakika inkübe edildikten sonra kör ve örneklerin absorbansları 492 nm' de okundu. Tirozinaz inhibitör aktivitesi sonuçları kojik asit eşdeğeri olarak verildi (mg KAE/g özüt).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada *Medicago murex* var. *murex*' den elde edilen farklı özütlerin antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Araştırılan aktiviteler metanol, etil asetat ve su özütleri için *in vitro* testler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece meraların kompozisyonunda oldukça yaygın bulunduğu için hayvan beslemede oldukça önemli olan, hatta bazı ülkelerde yüksek protein içeriğinden dolayı insan diyetine de katkı olarak girebilen bitkinin önemli bazı biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Bu sayede bitkinin hangi alanlarda kullanılabileceği konusunda öneriler sunulabilmektedir.

4.1 Antioksidan Aktivite

Medicago murex var. *murex*' in farklı özütlerinin antioksidan aktiviteleri FRAP ve CUPRAC testleri kullanılarak belirlenmiştir. Bunun yanında özütlerin antioksidan kapasitesi üzerine etkili olan toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri de belirlenmiştir. Böylece farklı yöntemler kullanılarak toplam antioksidan kapasitenin farklı özütlerdeki durumu hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Çalışma bitkinin farklı özütlerinin karşılaştırılabileceği şekilde metanol, etil asetat ve su özütlerinin araştırılması üzerine odaklanmıştır. Elde edilen bulgular farklı özütlerin farklı aktivitelere sahip olabileceği düşüncesini desteklemiştir.

4.1.1 Toplam fenolik ve flavonoid içerik

Medicago murex var. *murex*' den elde edilen özütlerin toplam fenolik içerikleri 83.70-163.93 mg GAE/g özüt arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1). En yüksek fenolik içerik 163.93 mg GAE/g özüt değeri ile su özütünde görülürken bunu 95.98 mg GAE/g özüt ile metanol ve 83.70 mg GAE/g özüt ile etil asetat özütü takip etmektedir. Pakistan' da günlük diyetle yaygın olarak tüketilen yeşil bitkilerden birisi olan *Medicago polymorpha* 85.75±4.30 mg GAE/g yaş bitki oranında toplam fenolik madde içeriği ile en yüksek fenolik madde içeren bitkilerdendir (Khan vd., 2016). Dünyanın pek çok ülkesinde yaygın olarak yetişen ve özellikle yüksek kaliteli içeriğinden dolayı hayvancılığın gelişmiş olduğu ülkelerde önemli bir yem bitkisi olan *Medicago* türleri Portekiz' de zengin protein içeriğinden dolayı insan diyetinde de

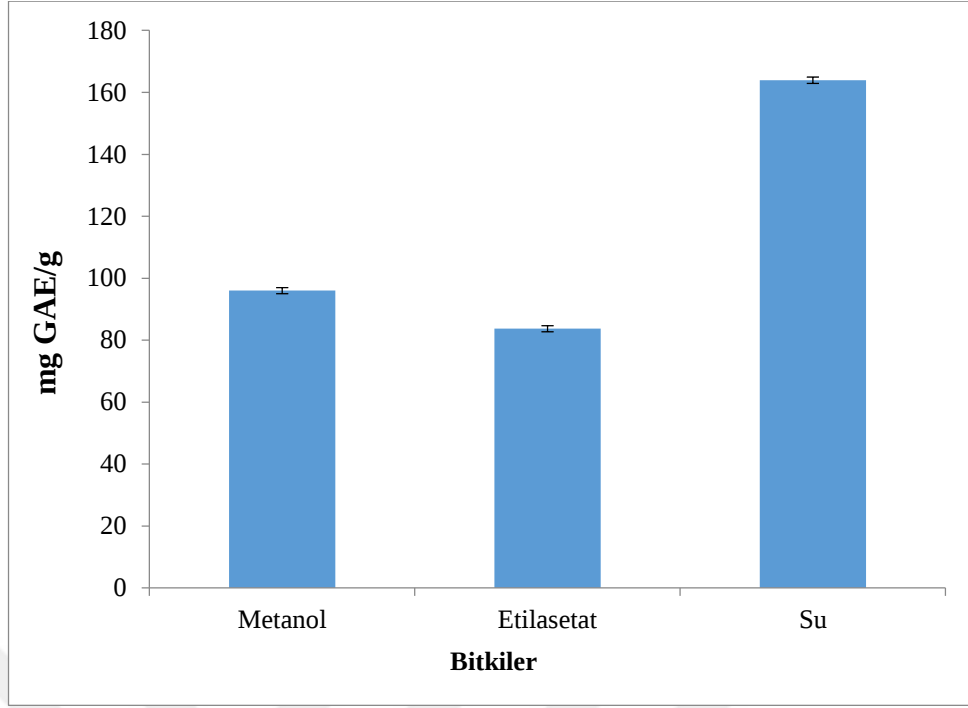
gıda katkı maddesi olarak yer almaktadır. Rodrigues vd., (2013) bu ülkede yayılış gösteren *M. minima*, *M. tornata*, *M. truncatula*, *M. rigidula*, *M. scutellata*, *M. segitalis* ve *M. sativa* türlerinden elde edilen hidroalkolik özütlerin (%50 etil alkol) içeriklerini araştırmış ve bu türlerin yaklaşık 20-40 mg GAE/ g kuru bitki oranları arasında değişen fenolik madde içeriklerine sahip olduğunu göstermiştir. Ülkemizde doğal yayılışa sahip olan *Medicago rigidula* ise 79.61 mg GAE/g özüt düzeyinde toplam fenolik içeriğe sahiptir (Çakmak vd., 2017).

Flavonoid içeriklerinin araştırılması sonucunda metanol özütünde 26.05 µg QE/g özüt oranında su özütünde ise 24.48 µg QE/g özüt oranında toplam flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Etil asetat özütünde ise flavonoid içerik tespit edilememiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2). Bu içerik *Medicago rigidula*’ da 27.38 µg QE/g özüt olarak (Çakmak vd., 2017), *M. minima*, *M. tornata*, *M. truncatula*, *M. rigidula*, *M. scutellata*, *M. segitalis* ve *M. sativa* türlerinde 5-12 mg CEQ/ g kuru bitki olarak (Rodrigues vd., 2013) bulunmuştur. Bu çalışmalar ile kıyaslandığında *M. rigidula* bizim çalışmamızda kullanılan *M. murex*’ ten daha yüksek fenolik maddeye sahiptir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler rakamsal olarak Rodrigues vd., (2013)’ e göre her ne kadar yüksek çıkmış görünse de bu araştırmacılar standart olarak kateşin kullandıklarından bu şekilde bir kıyaslama mümkün olmamaktadır. Ancak genel itibari ile *M. murex*’ in iyi düzeyde flavonoid içerdiği söylenebilir.

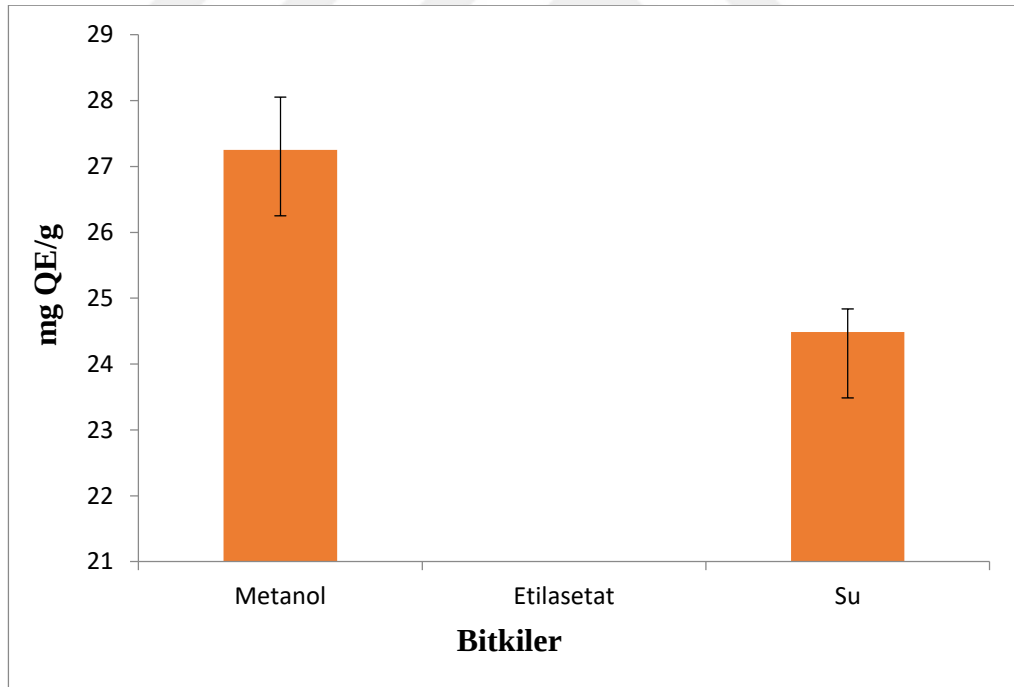
Çizelge 4.1: *Medicago murex* var. *murex*’ in farklı özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği.

Özütler	GAE (mg/g)	QE (µg/g)
Metanol	95.98±0.64	26.05±2.16
Etil asetat	83.70±3.36	-
Su	163.93±0.64	24.48±0.35

GAE: Gallik asit eşdeğeri
QE: Kuersetin eşdeğeri



Şekil 4.1: *Medicago murex* var. *murex*' in toplam fenolik içeriği grafiği.



Şekil 4.2: *Medicago murex* var. *murex*' in toplam flavonoid içeriği grafiği.

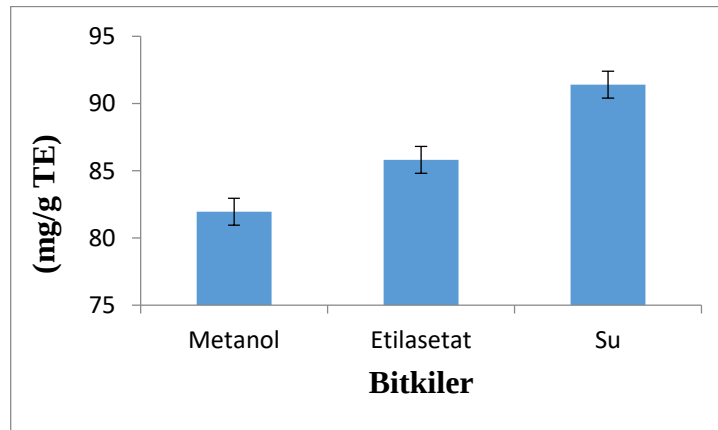
4.1.2 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)

Demir indirgeme antioksidan gücü testi, antioksidanların varlığında ferrik demirin (Fe^{+3}) ferröz iyonuna (Fe^{+2}) indirgenmesinin ölçülmesi üzerinedir. Çünkü antioksidanlar indirgeme potansiyeline sahip olan redüktan görevi gören bileşiklerdir. Çalışılan türün farklı özütlerinin FRAP testine göre antioksidan güçleri troloksa eşdeğer olarak Çizelge 4.2. ve Şekil 4.3.' te verilmiştir. *Medicago murex*' ten elde edilen farklı özütler oldukça yakın değerlerde aktiviteye sahiptir. Buna göre metanol özütü 81.94 mg TE/g özüt, etil asetat özütü 85.81 mg TE/g özüt ve su özütü 91.41 mg TE/g özüt oranlarında demir indirgeme antioksidan gücüne sahip oldukları görülmüştür. Çalışılan türle aynı cinse ait olan *M. rigidula* türünün metanol özütü için bu oran 67.01 mg TE/g özüt düzeyindedir (Çakmak vd., 2017). *Medicago lupulina*' nın farklı fraksiyonlarının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı çalışmada FRAP testinde 0.2 mmol Fe^{2+} /g kuru ağırlık şeklinde aktivite göstermiştir (Kicel ve Olszewska, 2015). Farklı *Medicago* türlerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada çalışılan türlerin FRAP testinde yüksek aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir (Rodrigues vd., 2013). Bizim sonuçlarımızı da göz önüne aldığımızda genel olarak *Medicago* türlerinin iyi birer demir indirgeme aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.2: *Medicago murex* var. *murex*' in demir indirgeme antioksidan gücü.

Bitkiler	TE (mg/g)
Metanol	81.94±1.74
Etil asetat	85.81±0.05
Su	91.41±2.22

TE: Troloks eşdeğeri



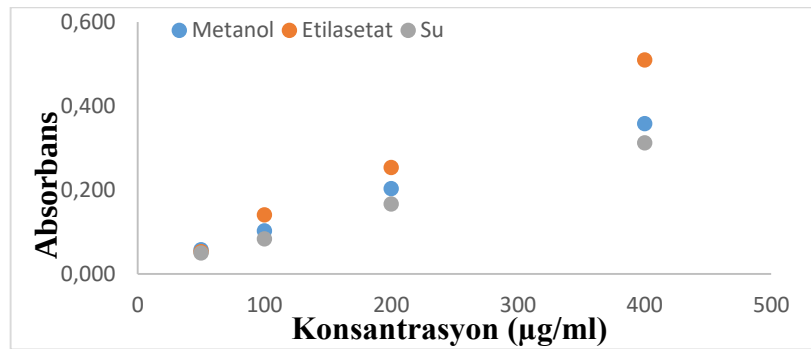
Şekil 4.3: *Medicago murex* var. *murex*' in demir indirgeme antioksidan gücü grafiği.

4.1.3 Bakır iyonları indirgeme gücü aktivitesi (CUPRAC)

Çalışılan özütlerin bakır iyonlarını indirgeme gücünü belirlemek için uygulanan CUPRAC testinin sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4’ te verilmiştir. Buna göre çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 400 µg/ml konsantrasyonda etil asetat özütü 0.510 absorbansa sahipken metanol özütü 0.358 ve su özütü 0.313 absorbans değeri ile bunu takip etmektedir. Bu oranlar yine ülkemizde yayılış gösteren *Medicago rigidula*’ da 400 µg/ml konsantrasyonda 0.733 olarak bulunmuştur (Çakmak vd., 2017). *Medicago* türleri ile ilgili bakır indirgeme gücünün çalışıldığı başka bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak çalışılan tür ile aynı familyada bulunan bazı türlerin bakır indirgeme güçlerini belirleyen bazı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan Sharma ve Vig (2014)’ in çalışmasında Fabaceae familyasından *Parkinsonia aculeata* türünün bütanol ve hekzan özütlerinin bakır indirgeme gücü bizim çalışmamızda en yüksek konsantrasyon olan 400 µg/ml’ de 0.2’ nin altında absorbans değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Sabudak vd., (2013) *Trifolium echinatum*’ dan elde edilen fenoliklerin bakır indirgeme güçlerini araştırmışlar ve 0.5 absorbans gösteren konsantrasyonlarını ($A_{0.50}$) belirlemişlerdir. Araştırmacılar çalıştıkları farklı bileşiklerin $A_{0.50}$ değerlerinin 6.36-401.82 µM arasında değiştiğini bulmuşlardır.

Çizelge 4.3: *Medicago murex* var. *murex*’ in bakır indirgeme antioksidan aktivitesi.

Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans		
	Metanol	Etil asetat	Su
400	0.358	0.510	0.313
200	0.204	0.254	0.167
100	0.102	0.141	0.083
50	0.057	0.053	0.050



Şekil 4.4: *Medicago murex* var. *murex*’ in bakır iyonları indirgeme gücü aktivitesi grafiği.

4.2 Enzim İnhibisyon Aktivitesi

Enzim inhibisyon çalışmaları günümüzde küresel birçok hastalığın tedavisi konusunda gelecek vadetmektedir. Özellikle metabolik hastalıklar en sık görülen hastalık gruplarındandır. Bu hastalıklar biyokimyasal ve fizyolojik bir takım olayların rutin işleyişinin genetik veya çevresel bazı faktörlerin etkisi ile bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Diyabet, Alzheimer ya da deride pigmentasyondaki bozukluklar sonucu oluşan hastalıklar giderek yaygınlaşmakta ve bu yönüyle de oldukça ilgi çekmektedir. Enzim inhibisyon çalışmaları bu tür hastalıkların tedavisinde yeni ve güncel bir alternatif oluşturmaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar ile bulunan inhibitörleri çoğunlukla sentetik maddelerden oluşmaktadır ve bu maddeler ya kendileri sitotoksik aktiviteye sahiptir ya da reaksiyonları sonucunda yüksek reaktiviteye sahip yeni ürün oluşumuna neden olmak gibi zararlı etkilere neden olmaktadır (Heikkila ve Cohen, 1973). Ayrıca böbrek ve karaciğer gibi organlarda hasara ve renal tümör insidensinin artışı gibi olumsuz etkilere yol açarak akut böbrek ve karaciğer yetmezliğine yol açabilmektedir. Bu nedenle bitkisel kaynaklı doğal enzim inhibitörlerinin diğerlerinden daha güvenilir olduğu bildirilmiştir (Hiroyuki vd., 2001; Matsui vd., 2001). Bitkilerde bulunan fitokimyasalların potansiyel enzim inhibitörü araştırmaları giderek yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada *Medicago murex* var. *murex*' den elde edilen metanol, etil asetat ve su özütlerinin enzim inhibisyon aktiviteleri asetilkolinesteraz, amilaz, glukozidaz ve tirozinaz enzimleri için araştırılmış ve Çizelge 4.4' teki sonuçlar elde edilmiştir.

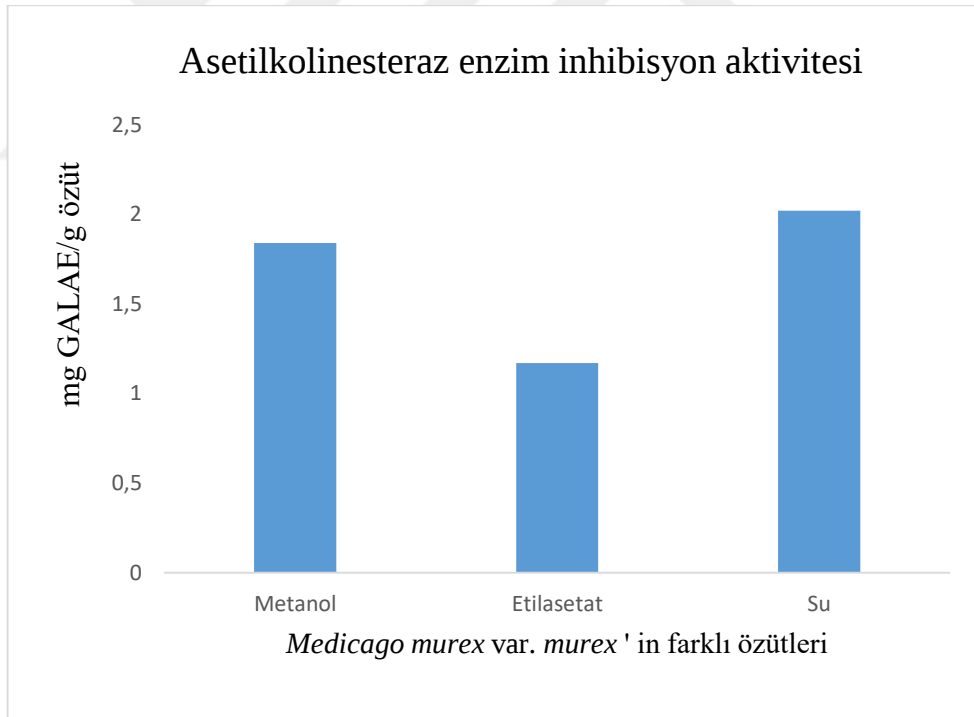
Çizelge 4.4: *Medicago murex* var. *murex*' in enzim inhibisyon aktiviteleri.

Bitkiler	AChE	Amilaz	Glukozidaz	Tirozinaz
	İnhibisyonu	İnhibisyonu	İnhibisyonu	İnhibisyonu
	(mg GALAE/g özüt)	(mmol ACAE/g özüt)	(mmol ACAE/g özüt)	(mg KAE/g özüt)
Metanol	1.84±0.06	0.82±0.03	4.28±0.31	17.92±0.18
Etil asetat	1.17±0.14	1.01±0.02	6.34±0.17	28.29±1.02
Su	2.02±0.16	0.41±0.02	2.70±0.16	4.23±0.56

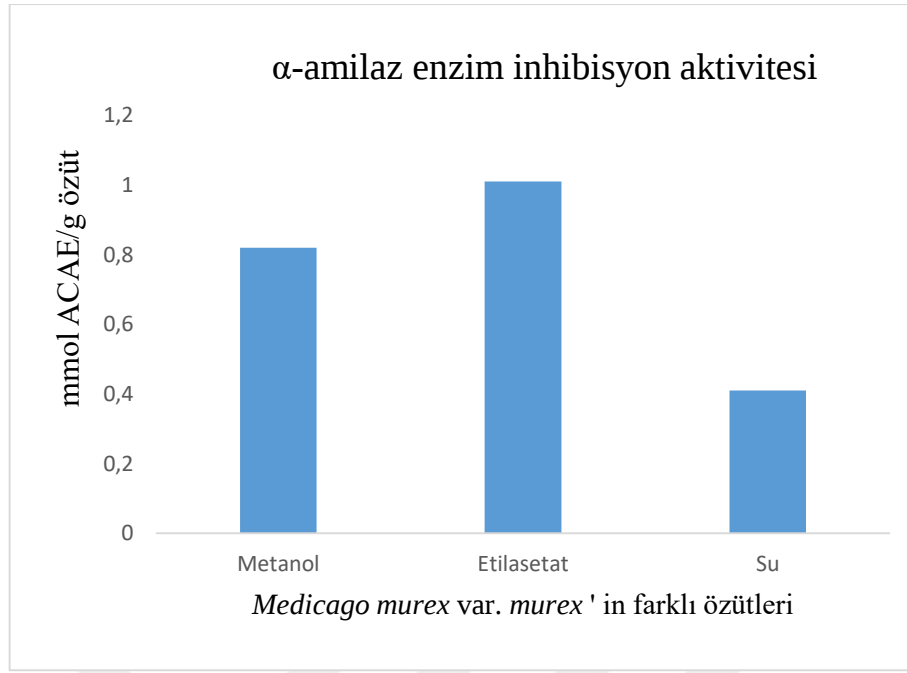
*Üç paralel ölçüm ± S.D.

GALAE: Galantamin eşdeğeri; ACAE: Akarboz eşdeğeri; KAE: Kojik asit eşdeğeri.

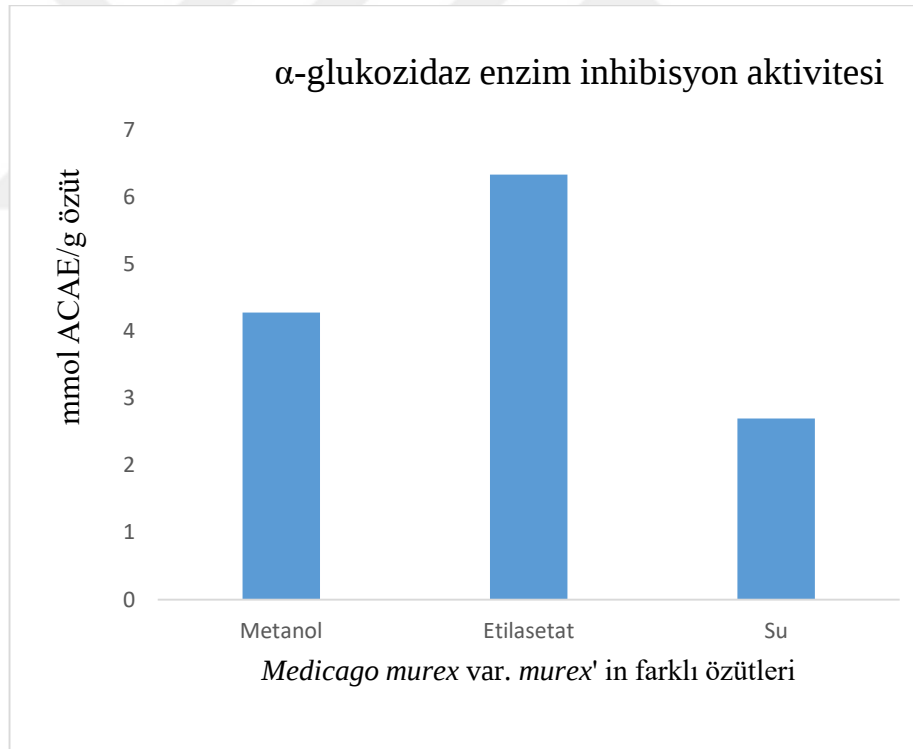
Elde edilen sonuçlara göre asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu bakımından en yüksek aktivite 2.02 mg GALAE/g özüt değeriyle su özütünde saptanırken bunu 1.84 mg GALAE/g özüt ile metanol özütü ve 1.17 mg GALAE/g özüt ile etil asetat özütü takip etmektedir (Şekil 4.5.). Çalışmamızda araştırılan ve glukoz metabolizması üzerine etkili enzimler olan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu aktivitesi her iki enzim için de etil asetat özütünde gözlemlenmiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.). α -amilaz için bu değer 1.01 mmol ACAE/g özüt iken α -glukozidaz için 6.34 mmol ACAE/g özüt olarak tespit edilmiştir. Bunu yine her iki enzimde de benzer şekilde metanol ve su özütleri takip etmiştir. Ancak çalışılan özütlerin hepsinin glukozidaz üzerine amilaz üzerinde sahip olduklarında daha yüksek inhibisyon aktivitesi gösterdikleri görülmüştür. Tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesine baktığımızda ise yine etil asetat özütünün metanol ve su özütünden oldukça yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8.). Etil asetat özütü 28.29 mg KAE/g özüt, metanol özütü 17.92 mg KAE/g özüt ve su özütü ise 4.23 mg KAE/g özüt düzeyinde aktivite göstermiştir.



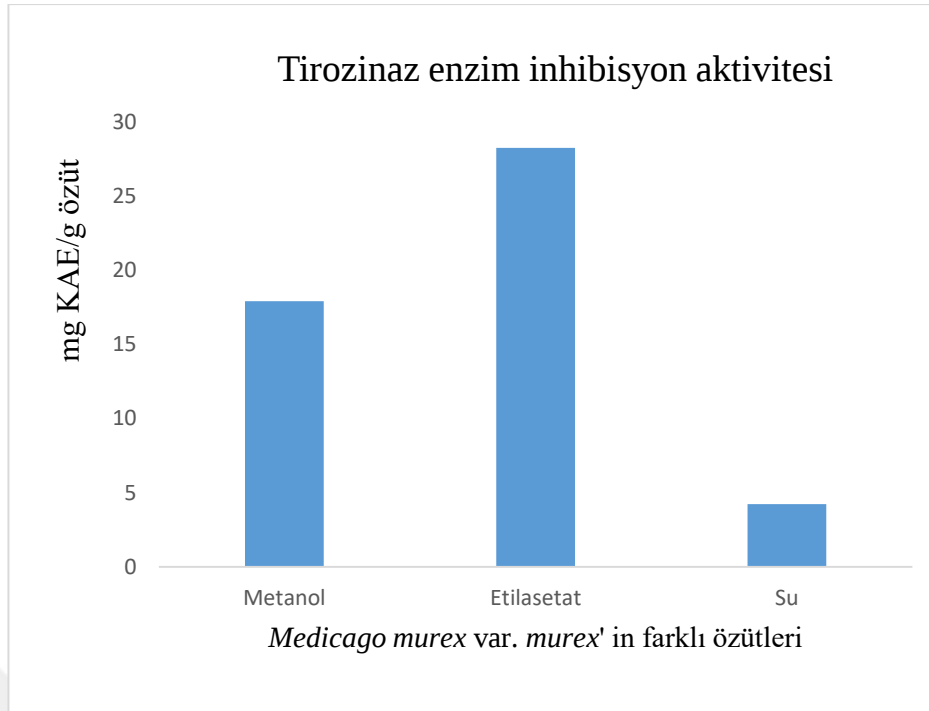
Şekil 4.5: *Medicago murex* var. *murex* ' in asetilkolin enzim inhibisyon aktivitesi.



Şekil 4.6: *Medicago murex* var. *murex*' in α -amilaz enzim inhibisyon aktivitesi.



Şekil 4.7: *Medicago murex* var. *murex*' in α -glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi.



Şekil 4.8: *Medicago murex* var. *murex*' in tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi.

Medicago rigidula L.'nin metanol özütünün enzim inhibisyon aktivitesi çalışmasında asetilkolin esterase, bütirilkolin esterase, amilaz, glukozidaz ve tirozinaz enzim inhibisyonları sırasıyla 2.05 mg GALAE/g özüt, 0.94 mg GALAE/g özüt, 0.73 mmol ACAE/g özüt, 1.30 mmol ACAE/g özüt ve 16.36 mg KAE/g özüt olarak bulunmuştur (Çakmak vd., 2017). Bu oranlar bizim çalışmamızda elde edilen asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonu sonuçları ile kıyaslandığında daha yüksek aktivite göstermişken amilaz, glukozidaz ve tirozinaz enzimlerinin su özütünde gözlemlenen inhibisyon değerleri dışında diğer özütler için bizim bulgularımızdakinden daha düşük aktivite göstermiştir. *Centaurea* türleri ile yapılan bir diğer çalışmada Türkiye' de yayılış gösteren üç farklı türün metanol ve su özütlerinin asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerinin 0.71-1.29 mg GALAE/g özüt arasında değiştiği görülmüştür (Aktumsek vd., 2013a). *Ononis natrix* subsp. *hispanica* (Fabaceae) metanol, etil asetat ve su özütlerinin enzim inhibisyon aktiviteleri araştırılmış ve asetilkolin için etil asetat özütünün 1.46 mg GALAE/g özüt, amilaz enzimi için yine etil asetat özütü 0.74 mmol ACAE/g özüt, glukozidaz enzimi için metanol özütü 19.94 mmol ACAE/g özüt ve tirozinaz için su özütü 52.81 mg KAE/g özüt değerleri ile en yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren özütler olmuştur (Yerlikaya vd., 2017). Bu sonuçlara göre *Medicago murex* var. *murex* özütlerinin asetilkolin ve amilaz enzimlerini *Ononis natrix* subsp. *hispanica* özütlerinden daha iyi inhibe edebildiği görülürken glukozidaz

ve tirozinaz inhibisyon aktivitesi açısından *Ononis natrux* subsp. *hispanica* ztlerinden bizim ztlerimizden daha yüksek aktiviteler de gözlemlenmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ülkemiz ve dünyada oldukça yaygın bir yayılışa sahip bir bitki olan *Medicago murex* var. *murex*' in antioksidan kapasitesi ve enzim inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Seçilen bitki ülkemizde yaygın dağılıma sahip olması bazı ülkelerde insanların diyetinde yer alması dolayısıyla sağlık üzerine sahip olabileceği potansiyel etkilerin belirlenmesini daha da önemli kılmaktadır. Artık bilinmektedir ki diyetle aldığımız besinlerin bileşimi sağlığımız üzerine de olumlu ya da olumsuz pek çok etkiye neden olmaktadır. Bugün tıpta gelinen nokta günümüzdeki kanser, koroner hastalıklar ve diyabet gibi hemen hemen her toplumda yüksek sıklıkta görülen hastalıkların nerdeyse tamamı diyet ve yaşam tarzı ile doğrudan ilişkilidir. Bitkilerin bileşimlerinde sahip oldukları fitokimyasallar denilen bileşiklerin büyük bir çoğunluğu önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bunlarda antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antikanser gibi aktiviteler ilgi çekmekte ve son zamanlarda etkin olarak çalışılmaktadır. Bitkinin habitatu, iklim, çevre koşulları gibi pek çok etken bitkinin bileşimindeki bu fitokimyasalların bileşim ve miktarları üzerine etkili olmaktadır. Bu bileşimi oluşturan maddelerin sahip oldukları özel biyolojik altiviteler de bitkinin potansiyel kullanım alanları konusunda fikir yürütmemize yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda incelen bitkinin antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri yanında toplam fenolik madde içeriği ve flavonoid içerikleri de belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarına göre bitkinin iyi bir fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Buna bağlı olarak bitki aynı zamanda iyi bir antioksidan aktiveye de sahip olarak bulunmuştur. Bunun yanında asetilkolin, amilaz, glukozidaz ve tirozinaz enzimlerini de iyi düzeylerde inhibe etmektedir. Özellikle glukozidaz enzim inhibisyonunun yine glukoz metabolizmasında glukozidazla birlikte iş gören amilaz enzimine kıyasla oldukça yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Amilaz ve glukozidaz enzimlerinin özellikle etil asetat özütü ile bu düzeyde yüksek inhibisyonu bitkinin tip 2 diyabet tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğunun göstegesı olarak kabul edilebilir. Yine aynı özütü tirozinaz enzimini de metanol ve su özütlerine kıyasla daha yüksek oranda inhibe etmesi bu özütün içeriğinin daha detaylı çalışmalarla aydınlatılması ve bu özütün daha

ileri *in vitro* ve *in vivo* testlerle aktivitelerinin daha iyi incelenmesi için yeni planlamaların yapılabilmesi konusunda cesaret vermektedir. Yaygın bir tür olduğu ve cinse ait bazı türlerin uzun zamandan beridir kültüre ediliyor olması bu çalışmalardan elde edilebilecek olası faydaların etkisinin de yüksek olmasına neden olabilecektir. Sağlık sektörü başta olmak üzere, yem ve gıda katkısı özelliklerinden dolayı gıda sektöründe de değerlendirilebilecek olan *Medicago murex* var. *murex* ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar planlanmalı, bitkinin bileşimi detaylı bir şekilde incelenerek sahip olabileceği diğre önemli biyolojik aktiviteleri de araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Agarwal, A. ve Prabakaran, S.A., 2005. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology.
- Agbor, G.A., Vinson, J.A. ve Donnelly, P.E., 2014. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int J Food Sci Nutr Diet* 3, 147-156.
- Akashi, K., Miyake, C. ve Yokota, A., 2001. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *Febs Letters* 508, 438-442.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya 1.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. ve Duran, A., 2013a. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food and Chemical Toxicology* 55, 290-296.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. ve Duran, A., 2013. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea L.* taxa from Turkey. *Food chemistry* 141, 91-97.
- Ali, H., Houghton, P. ve Soumyanath, A., 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 449-455.
- Amici, A., Levine, R., Tsai, L. ve Stadtman, E., 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *Journal of Biological Chemistry* 264, 3341-3346.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S. ve Erçağ, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 57, 292-304.
- Aruoma, O.I., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society* 75, 199-212.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A. ve Legret, P., 1994. Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. *Journal de pharmacie de Belgique* 49, 462-468.

- Balick, M.J. ve Cox, P.A., 1996. Plants, people, and culture: the science of ethnobotany. Scientific American Library.
- Bannerman, R.H., Burton, J., Chen, W.-C. ve Foster, G., 1983. Traditional medicine and health care coverage: a reader for health administrators and practitioners.
- Beckman, K.B. ve Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* 78, 547-581.
- Brooks, S., 1995. Ultrastructure of voluntary muscle in childhood malnutrition. *The West Indian medical journal* 44, 133-139.
- Brown, A.A. ve Hu, F.B., 2001. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition* 73, 673-686.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products* 67, 2141-2153.
- Cecília de Fátima, C., De Amorim, E.L.C., De Albuquerque, U.P. ve Maia, M.B.S., 2006. Medicinal plants popularly used in the Xingó region—a semi-arid location in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2, 15.
- Cheeseman, K. ve Slater, T., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin* 49, 481-493.
- Christenhusz, M.J. ve Byng, J.W., 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261, 201-217.
- Close, G.L., Ashton, T., McArdle, A. ve Maclaren, D.P., 2005. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 142, 257-266.
- Çakmak, Y.S., Zengin, G., Eskin, B., Yıldırım, K., Topal, M., Aydın, G.H., Ünlü, E., Baydemir, M. ve Erten, K., 2017. *Medicago rigidula* (L.) ALL.'nın Antioksidan ve Enzim İnhibisyon Aktiviteleri ve Fenolik Bileşiminin İncelenmesi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21, 522-529.
- Datta, P.K. ve Lianos, E.A., 1999. Retinoic acids inhibit inducible nitric oxide synthase expression in mesangial cells. *Kidney international* 56, 486-493.
- Davies, K.J., 2013. Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects. Elsevier.
- Davis, K., Mohs, R. ve Tinklenberg, J., 1979. Enhancement of memory by physostigmine. *The New England journal of medicine* 301, 946.

- Decker, E.A., 1995. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews* 53, 49-58.
- Dery, B., Ofsynia, R. ve Ngatigwa, C., 1999. Indigenous Knowledge of Medicinal Trees and Setting priorities for their Domestication. Shiryanga region, Tanzania, ICRAF Nairobi, Kenya.
- Diplock, A., Charuleux, J.-L., Crozier-Willi, G., Kok, F., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W. ve Vina-Ribes, J., 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British journal of nutrition* 80, S77-S112.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.
- Dufour, D., Pichette, A., Mshvildadze, V., Bradette-Hébert, M.-E., Lavoie, S., Longtin, A., Laprise, C. ve Legault, J., 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 22-28.
- Elseweidy, M., Younis, N., Elswefy, S., Abdallah, F., El-Dahmy, S., Elnagar, G. ve Kassem, H., 2015. Atheroprotective potentials of curcuminoids against ginger extract in hypercholesterolaemic rabbits. *Natural product research* 29, 961-965.
- Evans, P. ve Halliwell, B., 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British journal of nutrition* 85, S67-S74.
- Fang, Y.-Z., Sun, C.-P., Tian, X.-H. ve Cong, J.-H., 1998. Effect of Lu-Duo-Wei on scavenging superoxide and hydroxyl radicals *in vitro*. *The American journal of Chinese medicine* 26, 153-158.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. ve Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Fischer-Nielsen, A., Poulsen, H.E. ve Loft, S., 1992. 8-Hydroxydeoxyguanosine *in vitro*: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 13, 121-126.
- Fisher-Wellman, K. ve Bloomer, R.J., 2009. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic medicine* 8, 1.
- Fridovich, I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences* 893, 13-18.
- Gaba, S., Lescourret, F., Boudsocq, S., Enjalbert, J., Hinsinger, P., Journet, E.-P., Navas, M.-L., Wery, J., Louarn, G. ve Malézieux, E., 2015. Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 607-623.

- Garcion, E., Nataf, S., Berod, A., Darcy, F. ve Brachet, P., 1997. 1, 25-Dihydroxyvitamin D 3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Molecular Brain Research* 45, 255-267.
- Garland, D., Russell, P. ve Zigler Jr, J.S., 1988. The oxidative modification of lens proteins, *Oxygen radicals in biology and medicine*. Springer, pp. 347-352.
- Gerique, A., 2006. Integrative assessment and planning methods for sustainable agroforestry in humid and semiarid regions. *An introduction to ethnobotany and ethnoecology*, 1-20.
- Giacobini, E., 1987. Modulation of brain acetylcholine levels with cholinesterase inhibitors as a treatment of Alzheimer disease. *The Keio journal of medicine* 36, 381-391.
- Grosjean, S., Devaux, Y., Seguin, C., Meistelman, C., Zannad, F., Mertes, P.-M., Kelly, R.A. ve Ungureanu-Longrois, D., 2001. Retinoic acid attenuates inducible nitric oxide synthase (NOS2) activation in cultured rat cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33, 933-945.
- Gupta, S., Sujata, J., Velpandian, T., Len, A. ve Prakash, J., 1997. An update on pharmacological prospectives for prevention and development of cataract. *Indian journal of Pharmacology* 29, 3.
- Gurujeyalakshmi, G., Wang, Y. ve Giri, S.N., 2000. Suppression of bleomycin-induced nitric oxide production in mice by taurine and niacin. *Nitric Oxide* 4, 399-411.
- Gümüş, A. ve Yurtsever, E., 2007. Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) Tohumu ekstresinin, akut karbon tetraklorür uygulanan albino sıçanlarda plazma ve karaciğer lipid peroksidasyonu ile glutatyon düzeylerine etkisi. MÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi İstanbul.
- Halliwell, B., 1993. Free radicals and vascular disease: how much do we know? *BMJ: British Medical Journal* 307, 885.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet* 344, 721-724.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M., 1985. *Free radicals in biology and medicine*. Pergamon.
- Heikkila, R.E. ve Cohen, G., 1973. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science* 181, 456-457.
- Hennig, B., Toborek, M. ve McClain, C.J., 2001. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: implications for atherosclerosis. *Journal of the American College of Nutrition* 20, 97-105.

- Hirokawa, K., O'shaughnessy, K., Ramrakha, P. ve Wilkins, M., 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. *British journal of pharmacology* 113, 1448-1454.
- Hiroyuki, F., Tomohide, Y. ve Kazunori, O., 2001. Efficacy and safety of Touchi extract, an α -glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin-dependent diabetic mellitus. *The Journal of nutritional biochemistry* 12, 351-356.
- Hollman, P.C.H., 2001. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 842-852.
- Howieson, J. ve Ewing, M., 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*–*Medicago* symbiosis. *Crop and Pasture Science* 37, 55-64.
- Howieson, J., O'Hara, G. ve Carr, S., 2000. Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Field Crops Research* 65, 107-122.
- John, H.S. ve Simons, C., 2005. *Enzymes and their inhibition: drug development*. CRC Press.
- Juranović Cindrić, I., Kunštić, M., Zeiner, M., Stingeder, G. ve Rusak, G., 2011. Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices. *Croatica chemica acta* 84, 435-438.
- Kehler, J. ve Smith, C., 1994. Free radical in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human disease. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press, San Diego, 25-62.
- Khair-El-Din, T., Sicher, S.C., Vazquez, M.A., Chung, G.W., Stallworth, K.A., Kitamura, K., Miller, R.T. ve Lu, C.Y., 1996. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *Journal of Experimental Medicine* 183, 1241-1246.
- Khan, H., Jan, S.A., Javed, M., Shaheen, R., Khan, Z., Ahmad, A., Safi, S.Z. ve Imran, M., 2016. Nutritional composition, antioxidant and antimicrobial activities of selected wild edible plants. *Journal of food biochemistry* 40, 61-70.
- Kicel, A. ve Olszewska, M.A., 2015. Evaluation of antioxidant activity, and quantitative estimation of flavonoids, saponins and phenols in crude extract and dry fractions of *Medicago lupulina* aerial parts. *Natural product communications* 10, 483-486.
- Kim, Y.-J. ve Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 1707-1723.

- Kinghorn, A.D., 2001. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 135-148.
- Koelle, W.A., Koelle, G.B. ve Smyrl, E.G., 1976. Effects of persistent selective suppression of ganglionic butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of acetylcholinesterase: Implications regarding function of butyrylcholinesterase and regulation of protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2936-2938.
- Lass, A., Suessenbacher, A., Wölkart, G., Mayer, B. ve Brunner, F., 2002. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Molecular pharmacology* 61, 1081-1088.
- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W. ve Demaree, S., 2002. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and biophysical research communications* 290, 47-52.
- Lee, K.-H., 1999. Anticancer Drug Design Based on Plant-Derived Natural Products1. *Journal of biomedical science* 6, 236-250.
- Lee, L., Parrish, F. ve Jacks, T., 1986. Substrate depletion during formation of aflatoxin and kojic acid on corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* 93, 105-107.
- Machlin, L.J. ve Bendich, A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1, 441-445.
- Maeda, K. ve Fukuda, M., 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 42, 361-368.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N. ve Matsumoto, K., 2001. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 1948-1951.
- Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E. ve Couladis, M., 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules* 15, 2759-2770.
- Moein, M.R., Moein, S. ve Ahmadizadeh, S., 2008. Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayanii* subfractions. *Molecules* 13, 2804-2813.
- Murray, A.P., Faraoni, M.B., Castro, M.J., Alza, N.P. ve Cavallaro, V., 2013. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Current Neuropharmacology* 11, 388-413.
- Nair, M. ve Ganapathi, N., 1998. Medicinal plants: cure for the 21st century: biodiversity, conservation and utilization of medicinal plants. *Proceedings of the Seminar UPM, Serdang, Malaysia, October 15--16*, in.

- Nawar, W., 1996. Lipids. Dalam: Fennema OR. Food chemistry, 255-264.
- Ness, A.R. ve Powles, J.W., 1997. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of epidemiology* 26, 1-13.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. ve Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports* 17, 215-234.
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E. ve Lüscher, A., 2011. Grass–legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, ecosystems & environment* 140, 155-163.
- O'Donovan, D.J. ve Fernandes, C.J., 2004. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxidants and redox signaling* 6, 169-176.
- Oliver, C.N., Ahn, B.-W., Moerman, E.J., Goldstein, S. ve Stadtman, E.R., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry* 262, 5488-5491.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M. ve Sener, B., 2012. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food chemistry* 130, 882-888.
- Packer, L., 1997. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of sports sciences* 15, 353-363.
- Palanisamy, U.D., Ling, L.T., Manaharan, T. ve Appleton, D., 2011. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food chemistry* 127, 21-27.
- Parr, A.J. ve Bolwell, G.P., 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 985-1012.
- Pham-Huy, L.A., He, H. ve Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS* 4, 89.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. ve Chiarotto, E., 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry* 11, 1163-1182.
- Poston, J., 1988. Detection of oxidized amino-acid residues using para-amino benzoic-acid adducts, *Faseb Journal*. Federation Amer Soc Exp Biol 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3998, pp. A1763-A1763.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. ve Shahabimajd, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African journal of biotechnology* 5.

- Powers, S.K. ve Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews* 88, 1243-1276.
- Radović, J., Sokolović, D. ve Marković, J., 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25, 465-475.
- Redmond, H.P., Wang, J.H. ve Bouchier-Hayes, D., 1996. Taurine attenuates nitric oxide—and reactive oxygen intermediate—dependent hepatocyte injury. *Archives of Surgery* 131, 1280-1288.
- Rhee, S.G., 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31, 53-59.
- Riley, P.A., 2000. Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *Journal of theoretical biology* 203, 1-12.
- Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., das Neves, J., Sarmiento, B., Amaral, M.H. ve Oliveira, M.B., 2013. Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Industrial crops and products* 49, 634-644.
- Sabudak, T., Demirkiran, O., Ozturk, M. ve Topcu, G., 2013. Phenolic compounds from *Trifolium echinatum* Bieb. and investigation of their tyrosinase inhibitory and antioxidant activities. *Phytochemistry* 96, 305-311.
- Saikat, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. ve Biplab, D., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res* 3, 91-100.
- Samuelsson, G., 2004. Alkaloids. *Drugs of Natural Origin-A textbook of Pharmacognosy*. Kristenstad, Sweden: Swedish Pharmaceutical Society, 473-571.
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. ve García-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1247, 1-11.
- Sano, M., Fujita, H., Morita, I., Uematsu, H. ve Murota, S.-i., 1999. Vitamin K2 (Menatetrenone) Induces iNOS in Bovine Vascular Smooth Muscle Cells: No Relationship between Nitric Oxide Production and γ -Carboxylation. *Journal of nutritional science and vitaminology* 45, 711-723.
- Seid, M.A. ve Tsegay, B.A., 2011. Ethnobotanical survey of traditional medicinal plants in Tehuledere district, South Wollo, Ethiopia. *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 6233-6242.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I. ve Milner, J.A., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry* 18, 567-579.

- Sen, S., Chakraborty, R., De, B. ve Mazumder, J., 2009. Plants and phytochemicals for peptic ulcer: An overview. *Pharmacognosy Reviews* 3, 270.
- Seo, S.-Y., Sharma, V.K. ve Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 2837-2853.
- Sharma, S. ve Vig, A.P., 2014. Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of *Parkinsonia aculeata* Linn. *BioMed research international* 2014.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 916-921.
- Slater, T.F., 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal* 222, 1.
- Smith, C., Carney, J.M., Starke-Reed, P., Oliver, C., Stadtman, E., Floyd, R. ve Markesbery, W., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 10540-10543.
- Stadtman, E.R. ve Berlett, B.S., 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical research in toxicology* 10, 485-494.
- Suter, M., Connolly, J., Finn, J.A., Loges, R., Kirwan, L., Sebastià, M.T. ve Lüscher, A., 2015. Nitrogen yield advantage from grass–legume mixtures is robust over a wide range of legume proportions and environmental conditions. *Global change biology* 21, 2424-2438.
- Taborsky, G. ve McCollum, K., 1973. Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. Effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products. *Biochemistry* 12, 1341-1348.
- Takahashi, M., Tsuboyama-Kasaoka, N., Nakatani, T., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H. ve Ezaki, O., 2002. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282, G338-G348.
- Thannickal, V.J. ve Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279, L1005-L1028.
- Topinka, J., Binkova, B., Sram, R. ve Erin, A., 1989. The influence of α -tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research Letters* 225, 131-136.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. ve Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.

- Vertes, F., Jeuffroy, M.-H., Louarn, G., Voisin, A.-S. ve Justes, E., 2015. Légumineuses et prairies temporaires: des fournitures d'azote pour les rotations. Fourrages 223, 221-232.
- Watson, L. ve Dallwitz, M., 2008. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 10th April 2008. Available via DIALOG.
- Wattenberg, L.W., 1992. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. Cancer Research 52, 2085s-2091s.
- Wu, G. ve Meininger, C.J., 2000. Arginine nutrition and cardiovascular function. The Journal of nutrition 130, 2626-2629.
- Wu, G. ve Meininger, C.J., 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. Annual review of nutrition 22, 61-86.
- Xia, Y., Hill, K.E. ve Burk, R.F., 1985. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-induced glutathione release from the isolated perfused rat heart. The Journal of nutrition 115, 733-742.
- Yang, G.-Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E.J. ve Yang, C.S., 1998. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. Carcinogenesis 19, 611-616.
- Yang, X.-W., Huang, M.-Z., Jin, Y.-S., Sun, L.-N., Song, Y. ve Chen, H.-S., 2012. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. Fitoterapia 83, 1169-1175.
- Yasunobu, K., 1959. Mode of action of tyrosinase. Pigment cell biology, 583-609.
- Ye-fu, L., Yun-zhong, F., Rong, W. ve Wei-qun, C., 1982. Studies on the effect of vitamin B₁₂ and folic acid on radiation damage 1. Urinary Excretion of Formiminoglutamic Acid [J]. Acta Nutrimenta Sinica 2, 011.
- Yerlikaya, S., Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M.C., Altunoglu, Y.C. ve Aktumsek, A., 2017. A Multidirectional Perspective for Novel Functional Products: *In vitro* Pharmacological Activities and In silico Studies on *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. Frontiers in Pharmacology 8.
- Youdim, K., Shukitt-Hale, B., MacKinnon, S., Kalt, W. ve Joseph, J., 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1523, 117-122.
- Yunzhong, F., Ycfu, L., Bin, H., Shafei, H., Weiqun, C., Lijun, W. ve Rong, W., 1984. Studies on the effect of vitamin B₁₂ and folic acid on radiation damage 4. Body weight, leucocyte counts and mortality of rats. Acta Nutrimenta Sinica 1, 010.

- Yunzhong, F., Yefu, L. ve Weiqun, C., 1983. The effect of vitamin B(12) and folic acid on radiation damage 3. nitrogen metabolism. *Acta Nutrimenta Sinica* 4, 008.
- Zhang, H. ve Tsao, R., 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science* 8, 33-42.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Damla PAMUKCU

Doğum Tarihi ve Yeri : 16.08.1989 – Nevşehir

E-posta adresi : damlaoral_4@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Erciyes Üniversitesi, 2007-2012.

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2013-