



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

**TİROZİN AZ ENZİMİNİN BAZI TIBBİ BİTKİLER
TARAFINDAN İNHİBİSYONU**

Özge CALAY

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof.Dr. Refiye YANARDAĞ

İstanbul, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS

**TİROZİN AZ ENZİMİNİN BAZI TIBBİ BİTKİLER
TARAFINDAN İNHİBİSYONU**

Özge CALAY

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof.Dr. Refiye YANARDAĞ

İstanbul, 2010

İSTANBUL

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin T-2868/11092008 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.Refiye YANARDAĞ'a en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr.Özlem SAÇAN'a teşekkür eder. Yrd.Doç.Dr. Sevim TUNALI, Ar.Gör.Dr. Mutluhan DEĞER, Ar.Gör. Bertan Boran BAYRAK ve Ar.Gör. İsmet Burcu TÜRKYILMAZ'a gösterdikleri ilgi ve anlayış için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İstanbul, 2010

Özge CALAY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	İ
İÇİNDEKİLER	İİ
ŞEKİL LİSTESİ.....	İV
TABLO LİSTESİ	V
SEMBOL LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. ENZİMLER VE GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.2. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI.....	3
2.2.1. Oksidoredüktazlar.....	5
2.3. ENZİM İNHİBİSYONU	5
2.3.1. Reversible (Geri dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu.....	6
2.3.1.1. Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu.....	6
2.3.1.2. Nonkompetitif (Yarışmsız) Enzim İnhibisyonu.....	7
2.3.1.3. Ankompetitif (Yarı Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu.....	8
2.3.2. Irreversible (Geri dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu	9
2.4. POLİFENOL OKSİDAZLAR	9
2.4.1. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Keşfi	10
2.4.1.1. Tirozinaz.....	11
2.4.1.2. Tirozinaz İçin Optimum pH ve Sıcaklık.....	16
2.5. TİROZİN AZ ENZİMİNİN UYGULAMA ALANLARI	16
2.6. TİROZİN AZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖRLERİ VE AKTİVİTÖRLERİ....	17

2.6.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen İnhibitörler	20
2.6.1.1. Yüksek Bitkilerden Elde Edilen İnhibitörler.....	21
2.6.1.2. Mantarlardan Elde Edilen İnhibitörler.....	23
2.7. TİROZİN AZ İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULAMA ALANLARI	24
2.7.1. Gıda Endüstrisi	24
2.7.2. Kozmetik Endüstrisi	25
2.7.2.1. Hidrokinon.....	28
2.7.2.2. Hidrokinon Monobenzil Eter.....	29
2.7.2.3. Arbutin.....	29
2.7.2.4. Kortikosteroidler.....	30
2.7.2.5. Tretinoin.....	30
2.7.2.6. Azelaik Asit.....	30
2.7.2.7. Kojik Asit.....	31
2.7.2.8. L-Askorbik Asit.....	31
2.7.2.9. Retinoik Asit.....	32
2.7.2.10. Elajik Asit.....	32
2.7.2.11. Niasinamid.....	32
2.7.2.12. α - ve β -Hidroksi Asitler.....	33
2.7.2.13. Diğer Ajanlar.....	33
2.7.3. Klinik Çalışmalar	34
2.7.3.1. Vitiligo Belirteci.....	34
2.7.3.2. Prodrug Tedavisi.....	35
2.7.3.3. Kanserdeki Rolü.....	35
2.7.3.4. Antioksidan Rolü.....	36
3. MALZEME VE YÖNTEM	38
3.1. DENEYDE KULLANILAN ALETLER	38
3.2. DENEYDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	38
3.3. ENZİM İNHİBİSYONU TAYİNİNDE KULLANILAN BİTKİ MATERYALİ	39
3.3.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması	39
3.3.2. Etil Alkollü Ekstrelerin Hazırlanması	40
3.3.2. Enzim İnhibisyonu Tayininde Kullanılan Kimyasal Maddeler	40

3.4. TİROZİNAZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖR ETKİSİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	41
4. BULGULAR	42
4.1.BİTKİ EKSTRELERİNİN TİROZİNAZ İNHİBİTÖRÜ ETKİSİ	42
4.1.KİMYASAL MADDELERİN TİROZİNAZ İNHİBİTÖRÜ ETKİSİ	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.3.1.1.1. : Kompetitif enzim inhibisyonu	6
Şekil 2.3.1.2.1. : Nonkompetitif enzim inhibisyonu	8
Şekil 2.3.1.3.1. : Ankompetitif enzim inhibisyonu	8
Şekil 2.4.1.1.1. : Tirozinaz-Melanin	11
Şekil 2.4.1.1.2. : Monofenolden kinon oluşumu (denklemler 1, 2).....	12
Şekil 2.4.1.1.3. : Tirozinden melanin oluşumu	12
Şekil 2.4.1.1.4. : Tirozin- DOPA ve melanin ilişkisi	13
Şekil 2.6.1.2.1. : Kojik asit.....	23
Şekil 2.7.2.1. : Melanin biyosentezi.....	26
Şekil 2.7.2.6.1. : Azelaik asit	31
Şekil 2.7.2.8.1. : Askorbik asit.....	32
Şekil 4.1.1. : Karadutun sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	45
Şekil 4.1.2. : Kirazın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	46
Şekil 4.1.3. : Greyfurtun sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	46
Şekil 4.1.4. : Ayvanın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	46
Şekil 4.1.5. : Narın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği	47
Şekil 4.1.6. : Mantarın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	47
Şekil 4.1.7. : Sarmısığın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği	50
Şekil 4.1.8. : Karadutun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği	51
Şekil 4.1.9. : Havucun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	51
Şekil 4.1.10. : Ananasın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği.....	51
Şekil 4.1.11. : Ayvanın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği	52
Şekil 4.1.12. : Biberin etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği	52
Şekil 4.2.1. : Sodyum klorür % inhibisyon grafiği	54
Şekil 4.2.2. : Kuarsetinin % inhibisyon grafiği.....	55
Şekil 4.2.3. : Kojik asit % inhibisyon grafiği.....	55

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.4.1. :Monofenolaz, difenolaz ya da her ikisini de inhibe eden doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri	20
Tablo 3.3.1. : Enzim inhibisyonu tayininde kullanılan bitki materyeli	39
Tablo 3.3.3.1.: Enzim inhibisyonunda kullanılan kimyasal maddeler	40
Tablo 4.1.1. : Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerin tirozinaz % inhibisyon ve IC50değerleri	42
Tablo 4.1.2. : Çeşitli bitkilerden hazırlanan etil alkollü ekstrelerin tirozinaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC50 değerleri.....	48
Tablo 4.2.1 : Çeşitli kimyasal maddelerin tirozinaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC50 değerleri.....	53

SEMBOL LİSTESİ

DICEA	: Sodyum dietil-ditiyokarbamat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOPA	: 3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin
GHB	: γ -L-glutaminil-4-hidroksibenzen
HK	: Hidrokinon
IC ₅₀	: Aktivitenin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri
IEC	: Uluslar arası Enzim Komisyonu
PPO	: Polifenol oksidazlar
PVP	: Polivinilpirolidin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TRP-1	: Tirozinaz ilişkili protein-1
TRP-2	: Tirozinaz ilişkili protein-2
UV	: Ultraviole

ÖZET

TİROZİNAZ ENZİMİNİN BAZI TIBBİ BİTKİLER TARAFINDAN İNHİBİSYONU

Ülkemizde sağlık alanında yaygın olarak kullanılan geleneksel bitkilerle tedavi yöntemleri tabiata dönüş akımının etkisiyle son yıllarda batı dünyasında da yaygın bir biçimde kullanılmaya ve incelenmeye başlanmıştır. Bu bitkilerin sağlıklı ve verimli şekilde kullanılması için etkilerinin ve etki etme yollarının bilimsel olarak araştırılması gereklidir.

Bu çalışmada gıda ve kozmetik sektöründe önemli bir yeri olan kahverengileşme ve pigmentleşme reaksiyonlarında görevli tirozinaz enziminin inhibitör etkilerini araştırmayı hedefliyoruz. Çeşitli bitkilerden hazırlanacak sulu ve etanollü ekstraların ve bazı sentetik ilaçların enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerini inceleyeceğiz.

Elde edilen sonuçlardan, bitki ve kimyasal maddelerin tirozinaz üzerine farklı inhibitör etki gösterdikleri saptandı.

SUMMARY

INHIBITION OF TYROSINASE BY SOME MEDICAL PLANTS

In our country, the treatment methods with traditional plants which are mostly used in health area are began to be used and researched also in european countries with the effect of getting back to the nature. To use these plants in health and efficiency, the effects and effect ways have to be researched scientifically.

In this study, we plan to reasearch the inhibition effects of tyrosinase enzyme that is used in browning and pigmenting reactions which have an important value in food and cosmetics reactions. We will study the inhibition effects of synthetic medicines and extracts with ethanol and water that are prepared from diffrent plants on enzyme activity.

According to the results, it was determined that the plant extracts and chemical compounds showed different inhibibor effects on tyrosinase.

1. GİRİŞ

Canlı sistemler, farklı çeşitlilikte biyokimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla şekillenirler. Canlı sistemde bütün bu reaksiyonlar temelde protein yapılı olan ve enzimler olarak bilinen bir seri biyolojik katalizörler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Enzimler doğal ortamları dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterirler ve bu nedenle pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir.

Enzimler ve enzim inhibitörleri tıpta, gıda endüstrisinde, pestisitlerde, kozmetik sanayinde ve tarım sanayinde kullanılmaktadır (Friedman, 1996).

Tirozinaz (polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz, dihidroksi-L-fenilalanin: oksijen oksidoredüktaz (E.C 1.14.18.1)) olarak adlandırılan bir enzimdir. Memelilerde, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve mantarlarda bulunur. Bitki ve hayvanlarda geniş yer kaplayan melanin pigmentleri için gerekli bir enzim olup kofaktörü bakırdır. Tirozinaz hayvansal organizmaların özellikle deri, saç, ve göz pigmentlerinde bulunur.

Tirozinaz, fenolik bileşenlerin kinon türevlerine oksidasyonunu katalizler. Bu enzim temel olarak farklı iki reaksiyonu katalizler; (Ortonne ve Ballotti, 2000)

- Monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi)
- o-difenollerin o-kinona oksidasyonu (katekolaz aktivitesi)

Tirozinaz, melanin oluşumunda görevli enzimdir. Bazı kanser türlerinde kanserli hücrelerde tirozinaz aktivitesinin artması bu kanser türlerinin tedavisinde tirozinazın önemine dikkat çekmiştir (Maeda ve Fukuda, 1991).

Tirozinaz gıda endüstrisinde meyve ve sebzelerin ekonomik değerlerinin korunmasında anahtar bir enzimdir. Sebze ve meyvelerdeki enzimatik kahverengileşmeden sorumludur. İstenmeyen renk ve lezzetler, kinon bileşenlerinin proteinlerin amino ve sülfidril gruplarıyla arasındaki geri dönüşümsüz olarak oluşan kahverengileşme reaksiyonları sonucu oluşur. Kinon-protein reaksiyonları proteinlerin sindirimini zorlaştıran lizin ve sisteinin de içinde bulunduğu esansiyel amino asitlerin biyoyararlanımını düşüren sonuçlar doğurur. Bu bağlamda, kuvvetli tirozinaz inhibitörlerine tarım ve beslenme alanında çok ihtiyaç bulunmaktadır (Mayer, 1987; Whittaker, 1995; Friedman, 1996).

Tirozinaz haşerelerle mücadele için geliştirilen ürünlerde de önemli bir rol oynar. Tirozinaz haşerelerde melanonojenezde, yara iyileşmesinde, parazitlerin enkapsülasyonunda görevlidir (Barrett F. M.1984, Sugumaran M.1991, Sugumaran M. 1988). Tirozinaz inhibitörlerindeki gelişmeler zararlı haşerelere karşı kullanılacak alternatif bir yol olacaktır. Tüm bu sebeplerden dolayı tirozinaz inhibitörleri ilaç ve kozmetik ürünlerinde pigmentasyon rahatsızlıklarını önlemede gittikçe artan bir öneme sahiptir (Maeda ve Fukuda, 1991; Mosher ve diğ., 1983).

Tirozinaz inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçların toksik olması nedeniyle bazı doğal tirozinaz inhibitörlerinin önemi ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada çeşitli bitkilerden hazırlanan bitki ekstraktlarının ve kimyasal maddelerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENZİMLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Enzimler hücrelerdeki biyokimyasal olayların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve protein yapısında olan biyokimyasal katalizörlerdir.

Enzimler, diğer kimyasal katalizörlerden birçok açıdan farklıdır. Her şeyden önce katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazladır. Enzimler son derece spesifiktirler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimler de vardır. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrede bile aynı anda pek çok sayıda biyokimyasal reaksiyon meydana gelir. Hücredeki reaksiyonlarda yan ürün oluşturmazlar, reaksiyonlar % 100 verimle sonuçlanır. Enzimatik reaksiyonlar fizyolojik pH'da ve canlılığın vücut sıcaklığında gerçekleşir. Biyokimyasal reaksiyonlar az enerji ve düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Normal laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren pek çok reaksiyon, enzimlerin kullanılmasıyla daha düşük sıcaklıkta ve enerjide gerçekleştirilebilir (Tüzün, 1997).

2.2. ENZİMLERİN ADLANDIRILMASI

1970'li yıllara kadar pek çok enzim ile çalışılmış, saf kristal formda elde edilen enzimlerin sayısı artmış ve zamanla adlandırmada karışıklıklar oluşmuştur. Biyokimya Cemiyeti tarafından bir Uluslar arası Enzim Komisyonu (IEC) kurulmuştur. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında uygulanacak kuralları tespit etmek üzere

oluşturulan IEC katalizledikleri reaksiyon tipinin sonuna "-az,, eki getirerek enzimleri altı ana grupta toplamışlardır.

Bunlar:

1-Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir. Oksidoredüktazlar ayrıca dehidrojenazlar ve sitokromlar, oksidazlar, oksijenazlar olmak üzere de alt sınıflara ayrılabilir. Solunum ve fermantasyon olaylarıyla ilgili enzimlerin yanı sıra tirozinaz enzimi de oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir.

2-Transferazlar: Fonksiyonel grupların transferinin olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Tek karbonlu grupları, aldehit ve keton gruplarını, açıl gruplarını, glikozil gruplarını, fosfat gruplarını, kükürt içeren grupları aktaranlar olmak üzere farklı alt sınıflara ayrılırlar.

3-Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını, suyun H^+ ve OH^- iyonları yardımıyla moleküllerin yıkılmasını, katalizleyen enzimlerdir. Hidrolazlar, ester bağlarına, glikozil bileşiklerine, eter bağlarına, peptit bağlarına, diğer C-N bağlarına, asetanhidrit bağlarına, C-C, C-P, C-halojen, C-S, P-N, S-S bağlarına etki edenler olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar.

4-Liyazlar: Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik veya oksidatif olmayarak ayrılmasını kataliz ederler. C-C, C-O, C-N gibi gruplar arasında çift bağ oluşturarak substrattan bazı grupların ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir, veya tam tersini bir yolla etkenlik gösterirler.

5-İzomerazlar: Substratın molekül içi değişikliklerini katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir. Rasemazlar ve epimerazlar, Cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksido redüktazlar, intramoleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar ve diğer liyazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar.

6-Ligazlar (Sentazlar): Ligazlar iki molekülün birleşmesini kataliz ederler. Bu birleşme için gerekli enerji ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır. Altı farklı alt grubu vardır. (Tekman ve Öner, 1981; Can ve Akev, 2008).

2.2.1 Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar substratların indirgenmesini yada yükseltgenmesini katalizleyen enzim sınıfıdır (Whitaker, 1994). Oksidoredüktazları; Dehidrojenazlar ve Sitokromlar, Oksidazlar, Oksijenazlar alt gruplarında inceleyebiliriz (Tekman ve Öner, 1981).

- Dehidrojenazlar substrattan, sitokromlar ise elektronları bir maddeden diğerine aktarır.
- Oksijenazlar, organik bir substrat molekülüne oksijen atomu girmesini kataliz eden enzimlerdir.
- Oksidazlar, bir substrattan elektronların (veya hidrojenin), taşıyıcı olan kofaktörler ile H₂O veya H₂O₂ teşkil etmek üzere O₂ ye aktarılmasını katalizleyen enzimlerdir. Oksidazlar içerdikleri kofaktöre göre alt sınıflara ayrılırlar:
 - Demir-porfirinli oksidazlar
 - Flavin nükleotidli oksidazlar
 - Bakırlı oksidazlar

Bakırlı oksidazlar Cu²⁺ içeren enzimlerdir. Bu gruba tirozinazın yanı sıra üratı allantoinine çeviren ürat oksidazı da dahildir (Tekman ve Öner, 1981).

2.3. ENZİM İNHİBİSYONU

Bazı maddeler enzimlerle ilişki kurma yeteneğinde oldukları halde, substrat gibi hareket etmezler. Yani enzimler bunların yeni bir ürüne dönüşümünü sağlamazlar. Ancak bu birleşme nedeni ile enzimin kendisi de katalitik görevini yerine getiremez. Bu çeşit maddelere "enzim inhibitörleri" denir. Enzim inhibitörleri, enzim etkisini azaltan ya da tamamen durduran maddelerdir (Bingöl, 1977).

Enzimlerin inhibisyonu başlıca iki şekilde meydana gelir:

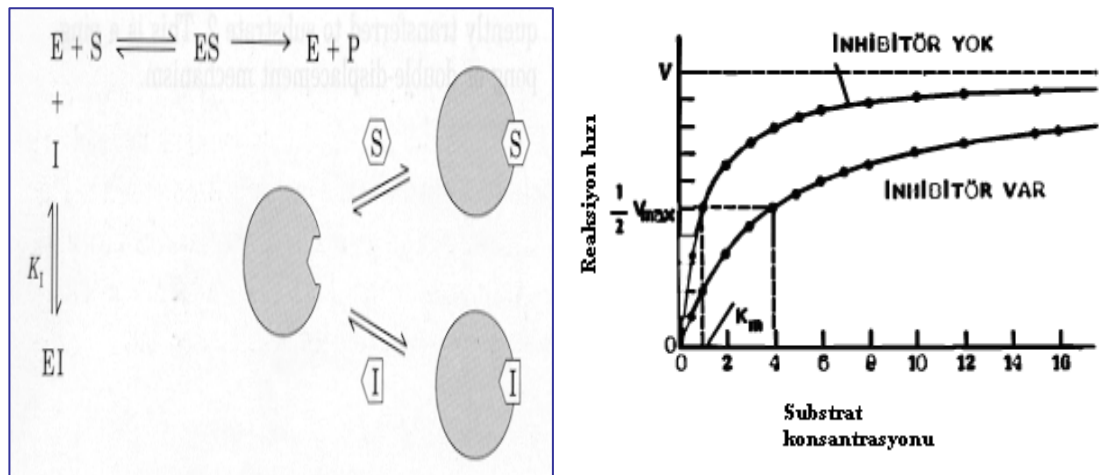
2.3.1. Reversibl (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu

2.3.1.1. Kompetitif (yarışmalı) Enzim İnibisyonu

Kompetitif inhibisyonda, enzimin etki yaptığı substrata yapı olarak çok benzeyen bir madde, enzimin aktif merkezini işgal ederek, asıl substratı ile ilişki kurmasını önler. Kompetitif inhibisyonda inhibitör madde molekülleri bazı enzim moleküllerini işgal ederek enzimin katalitik etkisini yavaşlatırlar. Buna çok klasik bir örnek olarak "suksinat dehidrojenaz" ın "malonik asit"le inhibisyonunu gösterebiliriz. Suksinik asit sitrik asit siklusu sırasında suksinat dehidrojenaz enziminin katalitik etkisi ile çok kolaylıkla fumarik aside dönüşebilir. Fakat ortamda malonik asidin bulunması formül yapı benzerliği nedeni ile bu dönüşümü yavaşlatır (Bingöl, 1977).

Kompetitif inhibisyonda enzimin inhibitör ile bağlanması reversibldir. Substrat konsantrasyonunun çoğaltılması ile bu ilişki kopabilir (Bingöl, 1977).

Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır; K_m değeri büyür, reaksiyon az çok normal bir V_{max} değeri gösterir (Bingol, 1977).



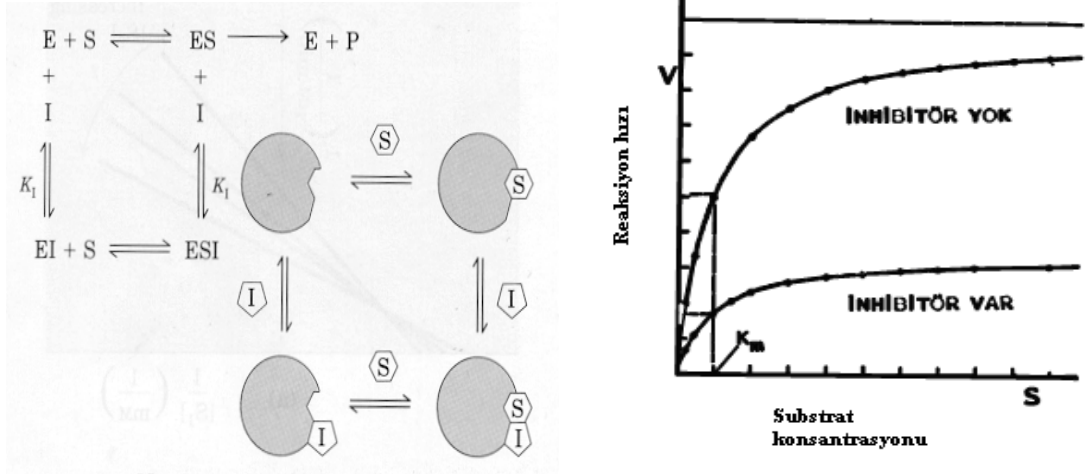
Şekil 2.3.1.1.1 Kompetitif enzim inhibisyonu (Bingöl, 1977)

2.3.1.2. Nonkompetitif (yarışmasız) Enzim İnhibisyonu

Nonkompetitif enzim inhibisyonunun substratın konsantrasyonu ile ilişkisi yoktur. Non kompetitif enzim inhibisyonunda hem substrat hem de inhibitör madde aynı zamanda enzime bağlanmaktadır. İnhibitörün enzimin aktif yeri dışında bir yere bağlanması ile, o enzimin moleküllerinin substratla reaksiyona girme hızında bir azalma meydana gelmektedir. Halbuki kompetitif inhibisyonda sadece reaksiyona giren enzim moleküllerinin sayısı azalmaktadır. Nonkompetitif inhibisyonun en sık görülen şekli, inhibitörün, enzimin yapısında bulunan fonksiyonel gruplarla, bu grupların yapısını bozmadan reversibl bir şekilde birleşmesi halidir (Bingöl, 1977).

Bazı enzimler yapılarında fonksiyonları için esas olan -SH grupları taşırlar. Enzimin normal şekilde görev yapabilmesi için -SH gruplarının bozulmadan korunması gerekir. Bu -SH gruplarının metal iyonları tarafından nonkompetitif bir şekilde inhibe edilmesi enzimin normal katalitik etkisini sürdürmesini önler. Bu çeşit ağır metallere örnek olarak Ag^+ , Hg^+ , ve Pb^{2+} u göstermek mümkündür (Bingöl, 1977).

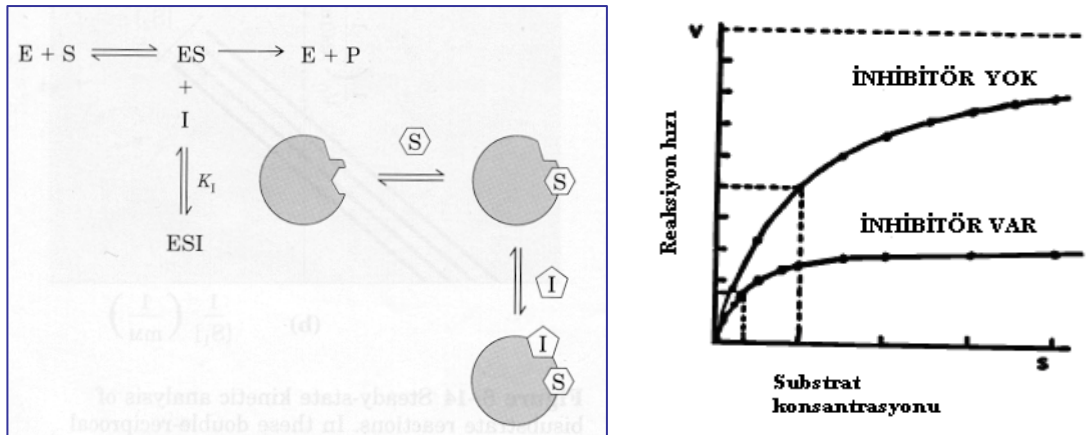
Enzime nonkompetitif inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasını bloke etmez, substrat bağlanması da nonkompetitif inhibitörün bağlanmasını bloke etmez. ESI kompleksi ürün vermek üzere ES kompleksinden daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamaktadır. Bu tür inhibisyon ile, tepkimenin V_{max} değeri azaldığı halde K_m değeri değişmez (Altınışık, 2009).



Şekil 2.3.1.2.1 Nonkompetitif enzim inhibisyonu (Bingöl, 1977)

2.3.1.3. Ankompetitif (yarı yarışmalı) Enzim İnhibisyonu

Bu enzim inhibisyonunda inhibitör, nonkompetitif inhibitörde olduğu gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere reversibl olarak bağlanır; fakat ankompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde ankompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine reversibl bağlanarak enzimi inaktive eder. Ankompetitif inhibisyon sonucu V_{max} değeri azalırken K_m değeri de azalır (Altınışik, 2009).



Şekil 2.3.1.3.1 Ankompetitif enzim inhibisyonu (Bingöl, 1977)

2.3.2. İrreversibl (Geri dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu

İrreversibl enzim inhibisyonu, irreversible inhibitörün enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla irreversible olarak birleşmesi sonucu meydana gelir. Bu tip inhibisyonlarda aktif bölgeye kovalent olarak bağlanan inhibitör, enzim yapısını bozduğu için geri dönüşüm olmamaktadır (Altınışık, 2009). Örneğin; sinir gazlarından diizopropil fosforidat, asetil kolin isimli nörotransmittörü parçalayan asetilkolin esteraz'ın tersinmez inhibitörüdür.

2.4. POLİFENOL OKSİDAZLAR

Polifenol oksidazlar (PPO) bakır içeren oksidoredüktazlardır. Substratları fenolik bileşiklerdir. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde “enzimatik esmerleşme” olarak bilinir. Bakterilerden memelilere kadar doğada geniş bir şekilde yayılmışlardır. Özellikle bitkilerde yaygın olarak bulunan PPO'lar hayvansal dokularda ve küf mantarlarında da bulunmaktadır (Cemeroğlu ve diğ., 2001).

Polifenol oksidazlar üç grupta ele alınır. Bunlar; tirozinazlar (kresolazlar) (EC 1.14.18.1), lakkazlar (EC 1.10.3.2) ve katekol oksidazlardır (EC 1.10.3.1). Her üç enzim grubu da moleküler oksijen varlığında aktif hale gelirler ve koenzim kullanmazlar (Yelena, 1996).

Katekol oksidazlar: o-Dihidroksi fenollerin O₂ varlığında o-kinonlara yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Sistemik adları 1,2-benzendiol: oksijen oksido redüktazdır (Partington ve Bolwell, 1996).

Lakkazlar: p-Dihidroksi fenollerini O_2 varlığında p-kinonlara dönüştüren enzimlerdir. Bunlarda p-difenol oksidaz ve lakkaz olarak bilinmektedir (Dawley ve Florkey, 1993). Sistematik adları benzendiol: oksijen oksidoredüktazdır.

Tirozinazlar (Kresolazlar): Monohidroksi fenollerin O_2 varlığında p-kinonlara dönüşmesini katalizleyen enzimlerdir (Epsin ve diğ., 1995). Sistematik adları monofenol, L-dopa: oksijen oksidoredüktazdır.

2.4.1. Polifenol Oksidaz Enzimlerinin Keşfi

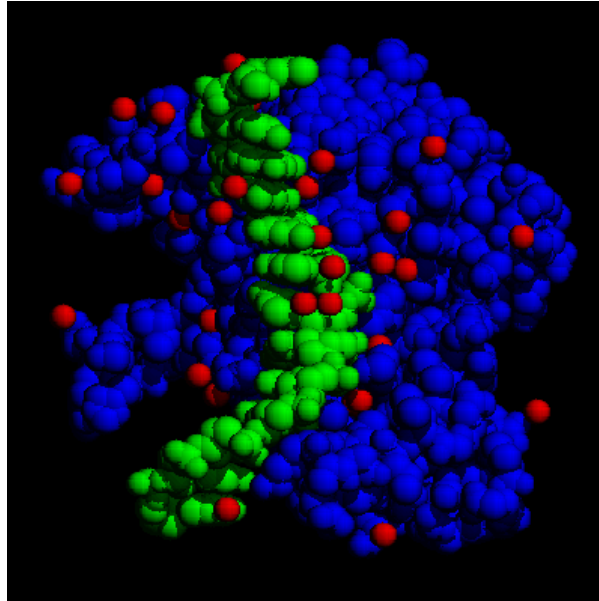
Schoenbein 1856 yılında, oksijenin oksitleyici ajan olarak kullanılarak bazı bitkilerde aerobik oksidasyonun gerçekleştiğine dikkat çekmesiyle; kimyada ilk olarak oksidazlarla ilgilenilmiştir. Oksidazlar hakkındaki bilgilerimizi geliştirmedeki bir sonraki aşama ise; Yoshida'nın yaptığı çalışmada lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gözlemlemesidir. Birkaç yıl sonra Bertrand, Yoshida'nın lakkaz üzerine yaptığı çalışmayı geliştirmiş ve bazı mantar türlerinde lakkaz enziminin var olduğunu bulmuştur. Bourquelot ve Bertrand birlikte yaptıkları araştırmada *Russula fortens* ve *R. Nigricans* mantarının ekstraktlarının renginin bekleme sırasında önce kırmızı daha sonra koyu kahverengi veya siyah olduğunu gözlemlemişlerdir. Bourquelot ve Bertrand *R. nigricans* mantarının ekstraktından kristal halinde bir madde ayırmışlardır. Bu kristal maddenin çözeltisinin mantar ekstraktı ile temas ettirilmesi sonucunda, aerobik oksidasyonun başladığı ve ilk olarak kırmızı renkli çözeltinin ve daha sonra da melanine benzer siyah bir ürün oluştuğu bildirilmiştir. Kristal madde daha sonra Bertrand tarafından tirozin amino asidi olarak tanımlanmıştır. Lakkazın tirozinin üzerinde aktif olmadığı bulunması Bertrand'ı adı "tirozinaz" olan yeni bir oksidazı keşfettiğini anlamasına yol açmıştır. Bertrand tirozinazın p-hidroksifenil etil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil propiyonik asit, p-hidroksifenil asetik asit, p-kresol ve fenol gibi (tirozinden başka) diğer bazı aromatik monohidroksi fenollerin oksidasyonunu katalizlediğini de bulmuştur. Diğer taraftan bu bahsedilen bileşiklerde hidroksi grubu olmadığında, bu enzim ile herhangi bir oksidasyonun olmadığı bildirilmiştir (Nelson ve Dawson, 1944).

Bu ilk enzim çalışmalarını takip eden sonraki çalışmalarda tirozin üzerine enzimin etkisi ve bitki ve hayvan pigmentasyonu ile ilgili olarak melanin oluşumu incelenmiştir. Bertrand tirozinazın önceden bilinen diğer iki oksidaz enzimi olan lakkaz ve peroksidazdan farklı olarak tirozinin oksidasyonunu katalizlediğini bildirmiştir. Ayrıca biyolojik ürünlerde tirozinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinde bu enzimin kullanılabilceği saptanmıştır (Nelson ve Dawson, 1944).

Bertrand'ın tirozinaz ve lakkaz ile ilgili yaptığı araştırmaların ardından, polifenol oksidazlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Tirozinaz afinite kromotografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir ve oksijeni organik bir molekülün (fenol) yapısına doğrudan katabilme özelliğine sahip enzimler arasında da ilk tanımlanan enzimdir (Çiçek, 2000).

2.4.1.1. Tirozinaz

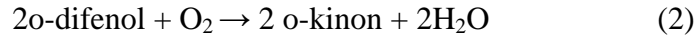
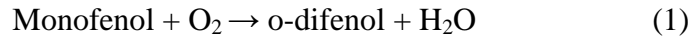
Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz olarak da bilinir. Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliğı nedeniyle verilmiştir (Whitaker, 1994).



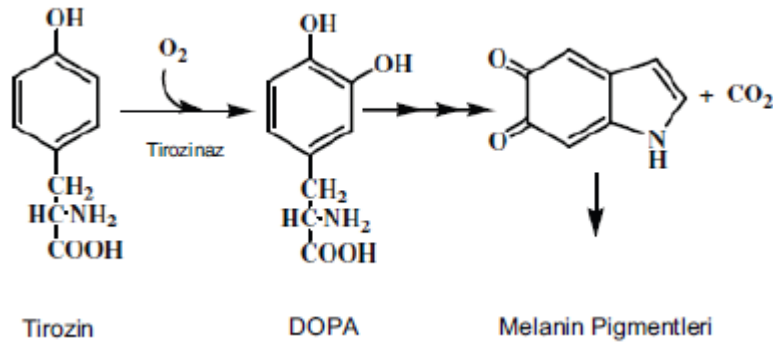
Şekil 2.4.1.1.1. Tirozinaz-Melanin

Tirozin; dopamin, norepinefrin, epinefrin, melanin ve tiroksinin ön maddesidir. Endojen olarak fenilalaninden sentez edilir. Proteinlerle vücuda alınır.

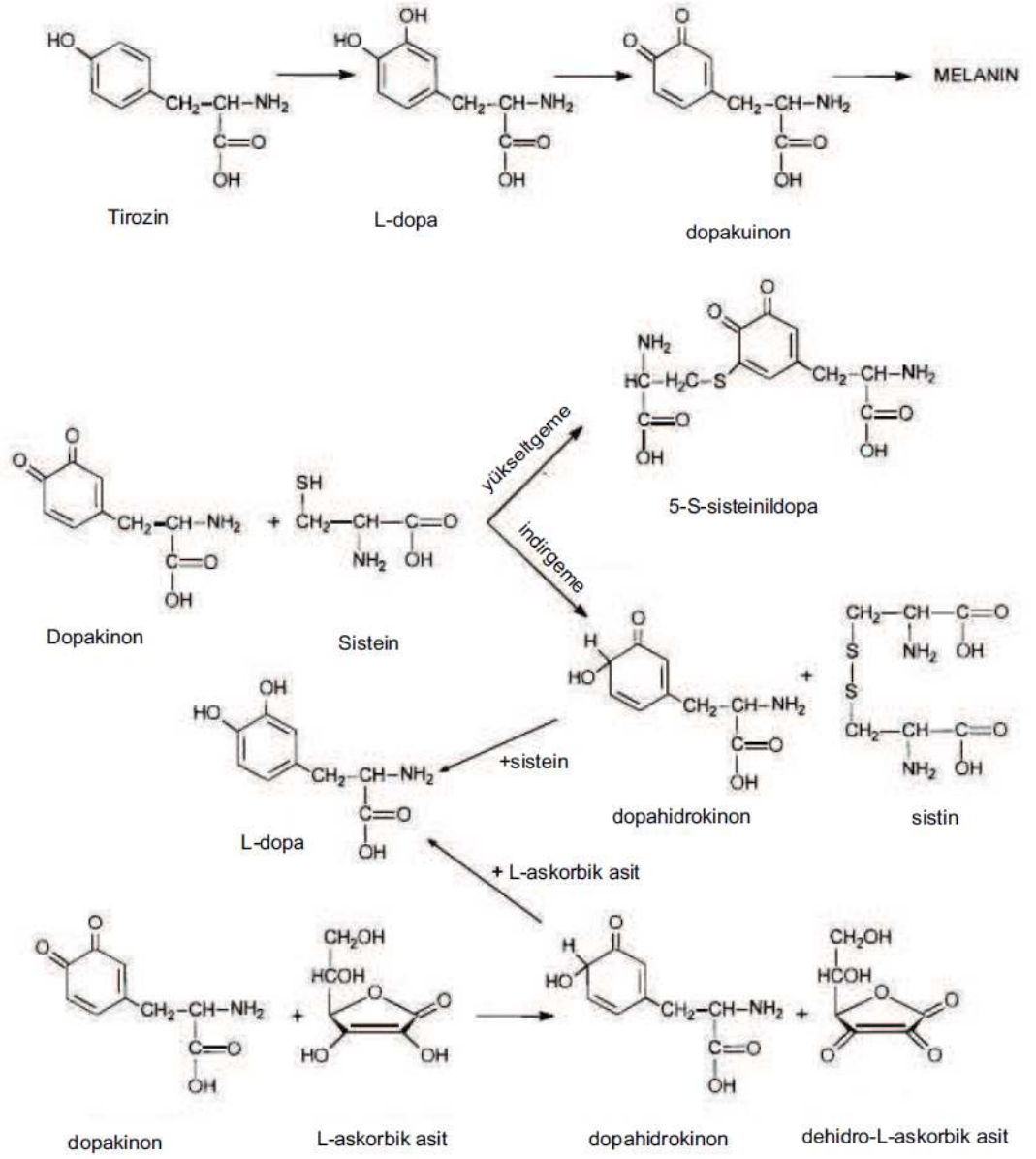
Tirozinaz doğada çok yaygındır (Cooksey ve diğ., 1997). Daha yaygın olarak bitkilerde bulunmasına rağmen, mikroorganizmalarda genellikle mantarlarda ve bazı hayvan organlarında bulunur (Parvez ve diğ., 2007; Khan, 2006). Tirozin monofenolaz ile hidroksilasyona uğrar. 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) difenolaz ile oksidasyona uğrayarak o-dopakinon'a dönüşür. O-dopakinon sulu çözeltilerinde stabil değildir ve hızlıca non-enzimatik reaksiyon verir (Garcia-Canovas, 1982).



Şekil 2.4.1.1.2. Monofenolden kinon oluşumu (denklem 1, 2) (Hwang ve Lee, 2007)



Şekil 2.4.1.1.3. Tirozinden melanin oluşumu (De ve diğ., 2008)



Şekil 2.4.1.1.4. Tirozin- DOPA ve melanin ilişkisi

Tirozinaz, melanositlerdeki melanini biyosentetik yolunda üç farklı reaksiyonla kataliz eder: Birinci yol; tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu. İkinci yol; L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu. Bunlara ek olarak üçüncü yol ise, insanlarda dopakinonun, siklizasyon ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melaninine dönüşmesidir (Sugumaran, 1991). Şekil 2.4.1.1.4 te bu yollar gösterilmiştir.

Anormal melanin pigmenti üretimi insanlarda ciddi bir estetik problemdir. Genellikle orta ve ileriki yaşlarda sıkça rastlanır (Kalka ve diğ., 2000). Bu kozmetik olarak önemlidir ve özellikle yumuşak derinin sağlamlılığın işareti olarak değerlendirildiği kültürlerde veya güzelliğe oldukça önem veren kültürlerde hem görünüşü hem de hayat kalitesini düşürmektedir (Mantle ve diğ. 2001). Eksojen sebepler özellikle ultraviyole ışığa maruz kalma melasma, solar lentiginos ve çil gibi pigmental anormalliklerin yaygın sebebidir (Maeda ve Fukuda, 1991). Bazı ilaçlara ve kimyasallara maruz kalmanın yanı sıra belirli hastalıkların varlığı da hiperpigmentasyonla sonuçlanabilir. Depigmente edici ajanlar genellikle hiperpigmentasyon bozukluklarının iyileştirilmesi için reçetelenmektedir (Kubo, 1992).

Doğada çok yaygın olmasıyla beraber yapılan araştırmalar tirozinazın özellikle mantar, yumru patates, şeftali, elma, muz, avokado, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine oranla daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (Witkop, 1985). Ayrıca kayısı, yabani gül, enginar, yabani pirinç, ıspanak, yonca, buğday, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları, üzüm, armut, zeytin gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (Vamos–Vigyazo, 1981). Bu yapılan çalışmalar doğrultusunda tirozinaz enziminin muhtemelen bütün bitkilerde bulunduğu şeklinde bir genellemeye gidilmiştir.

Bitki hücrelerinde enzimin miktarı ve dağılımı meyve veya bitkilerin türüne, yaşına ve olgunluğuna bağlıdır (Tolbert, 1973). Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her üç çeşit PPO aktivitesine farklı oranlarda sahip olduğu bildirilmektedir (Pendharkar ve Nair, 1964). Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi birçok ekstre iki çeşit PPO aktivitesine de sahip iken, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz PPO enzimlerinin mono hidroksi fenollere etki etmediği bildirilmiştir (Mayer, 1987). Yeşil yapraklarda enzimin büyük bir bölümü kloroplastlardadır. Patates yumrusunun hemen hemen bütün hücrel fraksiyonlarda protein miktarıyla orantılı bir değerde tirozinaz enzimi içerdiği bulunmuştur. Taze elmada ise kloroplast ve mitokondrielerde toplanmıştır. Yine enzimin üzümün kabuğunda üzümün öz suyundan veya etli kısmından daha yüksek oranda olduğu

bulunmuştur. Tirozinaz enzimi elmanın bütün kısımlarında belirlenmesine rağmen elma ve armudun her ikisinin suyu tirozinaz aktivasyonundan hemen hemen yoksundur ve tirozinaz neredeyse tamamen posada kalmaktadır. Benzer sonuç onaltı şeftali, üç kiraz ve üç erik kültüründe de bildirilmiştir. Kloroplast ve mitokondri fraksiyonlarından elde edilen enzimin substrat spesifikliğı de farklıdır (Vamos–Vigyazo, 1981).

Bitkilerdeki tirozinaz içeriğı tarımsal tekniklerden de etkilenir. Örneğın şeker kamışı yapraklarında aktivite düzeyi, toprak eser element olarak bakır ile muamele edildiğinde artar (Vamos–Vigyazo, 1981).

Tirozinaz bitkisel dokularda öncelikle inaktif formlar halinde sentezlenmekte ve zamanla çeşitli etkenlerle, örneğın dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya bir takım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler. İşte bu nedenlerle bitkisel dokularda çoğı zaman bu enzimin bir kısmı inaktif formda, bir kısmı ise aktif formda bulunmaktadır. Örneğın aktif formdaki enzimlerin, inaktif formdakilere oranı; ıspanaklarda 1:2, marullarda 2:1 ve domateslerde 1:1 olduğı halde bakla, fasulye ve bezelye çeşitlerinde tüm tirozinaz enzimlerinin inaktif formda bulunabildiğı belirlenmiştir (Cemeroğlu ve diğ., 2001).

Tirozinaz insanlarda dahil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle de deri, saç ve göz pigmentlerinde bulunur (Witkop, 1985). Onslow, siyah ırk tavşanların derilerinde (Onslow, 1923); Gessard, mürekkep balığının mürekkep kesesinde; Pinhey, bazı kabuklu hayvanların kanında; Bhagvat ve Richter eklem bacaklıların kanında tirozinaz enziminin var olduğunu bildirmişlerdir (Bhagvat ve Richter, 1938). Arnow derinin güneş ışığı ile bronzlaşmasının tirozinaz etkisiyle olduğunu bildirmiştir (Arnow, 1937). Tirozinaz böceklerdeki dış iskelet oluşumunda da önemlidir (Nelson ve Dawson, 1944).

Örneğın karidesler ekonomik değeri en yüksek olan su ürünlerindedir. Karideslerin ölüm sonrası kararmaya başladıkları görülür. Kararma, besinsel kayıplara, raf ömürlerinin kılmasına dolayısıyla pazar değerinin düşmesine, tüketici sağlığının tehlikeye girmesine neden olur. Ülke ekonomisinin korunması açısından bu olay

mümkün olduğunca geciktirilmelidir. Kararmanın geciktirilebilmesi için; sodyum bisülfid gibi sülfid bileşiklerinin yanı sıra; 4-heksilresorsinoller, fisin, eritorbatlar, sodyum benzoat, kojik asit, mantar ve çiçekli bitkilerden elde edilen ekstraktlar, hızlı dondurma, deniz suyuyla yıkama ve buzlama gibi teknikler de kullanılabilir. Melanosisin engellenmesi için sodyum bisülfid gibi sülfid bileşikleri, 4-heksilresorsinoller, fisin, sistin, glutatyon, eritorbat, sodyum benzoat ile kojik asit, mantarlardan hazırlanan ekstraktlar (Garcia, ve Fulton, 1996), çiçekli bitkilerden elde edilen ekstraktlardaki fenolik bileşikler (Wada ve diğ., 1995) ve hızlı dondurma teknikleri (Rotllant ve diğ., 2002) kullanılmaktadır. Sülfid bileşikleri melanosisi yavaşlatmak için günümüzde de kullanılan etkili ve pratik bir metot olduğu ileri sürülür. Ancak sülfür dioksidin birikim seviyeleri başta astım hastaları olmak üzere bazı tüketici bireylerinde sağlık problemlerine sebep olmaktadır (Rotllant ve diğ., 2002). Amerika, Kanada, Avustralya ve Latin Amerika'da sülfid bileşiklerinin kullanımı yasaklanmışken, Avrupa'da kullanılmasına izin verilmektedir (Sarı, 2010).

2.4.1.2. Tirozinaz İçin Optimum pH ve sıcaklık

Tirozinaz enziminin optimum pH'sı enzimin kaynağına ve substrata göre çok geniş bir aralıktadır ve genellikle pH:4.0 ile pH:7.0 arasında farklılıklar göstermektedir. Birkaç kaynaktan elde edilen tirozinaz enzimiyle yapılan araştırmalarda 4.0'ın altındaki pH değerlerinde enzimin inaktif olduğu bildirilmiştir. Patatesten elde edilen tirozinaz enzimi pirogallol ve klorojenik asit için pH:5.0'da inaktif iken, mandalınadan elde edilen tirozinaz enziminin pH:6.0'nın altındaki pH değerlerinde pirogallolu oksitleyemeyeceği belirtilmiştir. Çeşitli kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin bazı substratlar için optimum pH değerleri gösterilmektedir (Vamos-Vigyazo, 1981). Farklı kaynaklardan izole edilen tirozinaz enziminin optimum sıcaklık değerlerini de dikkate alırsak tirozinaz enziminin optimum sıcaklığı genellikle 25°C ile 35°C arasındadır (Günendi, 1996).

2.5. TİROZİNAZ ENZİMİNİN UYGULAMA ALANLARI

Tirozinaz enzimi gıda, sağlık, kozmetik ve kimyasal maddelerin arıtılmasında uygulama alanını bulabilen bir enzimdir. Tirozinazın özellikle doğada bulunan pek çok bitki ve

meyvada bulunması, ilk olarak tirozinazın gıda sektöründe önem kazanmasına sebep olmuştur.

Gıdalarda, tirozinaza bağlı olarak doğal rengi dışında kararmalar oluşabilir. Görünüş ve lezzetinde bozulma olabilir ve meyve suyu, şarap gibi içeceklerde bulanıklıklar ve çökelmeler oluşabilir. Bunun sebebi tirozinaz aktivitesidir. Bu tür durumlar gerek tüketiciler gerekse üreticiler tarafından istenmemektedir. Tercih edilmeyen ürünler gıda sektöründe zarara sebep olmaktadır. Gıda sektörü bu istenmeyen durumları ortadan kaldırmak için tirozinaz inhibitörlerini kullanmaktadır. Ancak çay, kahve, kakao, kuru üzüm, kuru erik, kuru incir gibi ürünlerin görünüm ve lezzet bakımından istenilen duruma gelebilmesi için tirozinaz enziminin aktif olması gerekmektedir. (Marshall, ve diğ., 2000)

Çevrenin endüstriyel ve evsel atıklarla kirlenmesini önlemede çeşitli çalışmalar günümüzde de yapılmaktadır. Atıklardaki toksik özellik gösteren fenolik bileşiklerin doğaya karışmasını önlemek için atık maddelerin fenolik bileşiklerden arındırıldıktan sonra çevreye verilmesi için denetimler yapılmaktadır. Fenolik bileşikleri atıklardan uzaklaştırmak için ekonomik, verimli ve kolay uygulanabilecek bir yöntem olarak enzimlerden faydalanılır. Tirozinaz, toksik olan fenolik bileşikleri uzaklaştırmada ilk akla gelen enzimdir. Tirozinazın bu amaçla kullanılabilmesi için mühendislik alanında da çalışmalar devam etmektedir.

2.6. TİROZİNAZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖRLERİ VE AKTİVATÖRLERİ

Tirozinaz enzimi katalizlediği reaksiyonlar sonucu meyve veya sebzelerde kararmalara veya meyve sularında bulanıklık oluşturması gibi istenmeyen durumlara neden olur. Bunları engellemek amacı ile gıda endüstrisinde inhibitörler hakkında daha çok çalışma yapılmış, bunun yanında tirozinaz enziminin aktivatörleri hakkındaki çalışmalar biraz arka planda kalmıştır.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlar, tirozinaz enziminin aktivatörlerinden biridir. Yine üzümde elde edilen tirozinaz için, asidik ortamda veya

üre çözültisi ile kısa süreli temas, enzimin aktifliğini 4 ile 10 kat arttırmaktadır. Aktivatörlerin etkileri yine optimum pH, optimum sıcaklık, veya substrat spesifikliğıindeki gibi izole edilen kaynağı göre değışmektedir. Örneğın ortama Cu^{2+} ilavesi turptan elde edilen tirozinazın aktivasyonunu arttırırken, patatesten elde edilen tirozinazı ise etkilemediğı gözlenmiştir (Vamos–Vigyazo, 1981).

Aktivatörler hakkında fazla çalışmanın olmamasına bağılı olarak, bu aktivatörlerin nasıl çalıştığı hakkında pek bilgi yoktur. Aktivatörlerin bakır içeren enzim monomerlerinden oligomer oluşturduğu ve böylece enzimi biyolojik aktiflik için gerekli olan polimer yapısına getirdiğı düşünölmektedir (Vamos–Vigyazo, 1981).

Enzim aktivitesi, suni gübrelerde bulunan eser elementlerden, olgunlaşmaya yardımcı olan maddelerden ve radyasyonlar gibi fiziksel işlemlerden etkilenir. Bu etkiler bitkideki enzim proteininin sentezini arttırabilir, doğal inhibitörleri ortamdan uzaklaştırabilir substrat yapısını değıştirebilir veya hücre duvarı geçirgenliğini değıştirebilir ve bunlardan dolayı da enzim aktivitesini arttırabilirler (Vamos–Vigyazo, 1981).

Tirozinazın inhibisyonu ile enzimatik kararmanın önlenmesi benzer konu gibi ele alınmıştır. Ancak kararma sadece enzimin inaktif olmasıyla değıil aynı zamanda reaksiyon için gerekli iki maddeden birinin (O_2 veya fenolik bileşik) uzaklaştırılmasıyla da önlenabilir. Meyve ve sebzelerde çoğı kez enzimatik reaksiyonlara bağılı oluşan kararma istenmeyen bir durumdur. Tirozinaz enziminin kararmaya sebep olacak oksidasyonları katalizlemesini önlemek amacıyla tirozinaz enzimi inhibitörleri hakkında detaylı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar halen de devam etmektedir.

Siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil-ditiyokarbamat (DICEA), askorbik asit, azit ve potasyum metil ksantat gibi metallerle kompleks oluşturan ligandlarla tirozinazın prostetik grubunda bulunan bakırın şelat oluşturması sonucu tirozinaz inhibisyona uğrar.

Florit, azit ve borat gibi inorganik iyonlarda tirozinazı inhibe ederler. Bakladan elde edilen tirozinaz enziminde florür yarışmasız inhibitörken, azit karışık tip inhibitördür. Boratın da yarışmalı inhibitör olduğu bulunmuştur. Polivinilpirolidin (PVP) gibi çözünebilir polimerler de tirozinazın yarışmalı inhibitörleridir. PVP gibi çözünen polimerlerle inhibe olan enzim, ortama anyonik deterjan eklenmesi ile tekrar aktivite gösterebilmektedir (Vamos–Vigyazo, 1981).

Mantardan izole edilen tirozinazın hidrojen peroksit, askorbik asit, fenil hidrazin, gallik asit, ferrosiyaniür ve hidroksil amin gibi indirgeyici bir ajan ile reaksiyonu enzimin inhibe olmasına neden olur. İndirgeyici ajanların tirozinazın prostetik grubunda bulunan Cu^{2+} yi indirgedikleri bulunmuştur (Özçelik, 2005).

Mantar tirozinazı enzimatik reaksiyon sırasında ortamda herhangi bir inhibitörün bulunmaması durumunda da inaktive olabilmektedir. Bu işlem sırasında enzime bağlı bakır atomu salınır. Son zamanlarda Lerch ve arkadaşları *N. crassa* tirozinazının inaktivasyonunun; 306. pozisyondaki histidin amino asidinin kaybı ve buna bağlı olarak bir bakır atomunun salınması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir (Nelson ve Dawson, 1944).

Melanin deri fotokanserine karşı önemli bir koruyucu rol üstlense de anormal melanin pigmentasyonu insanlarda önemli bir estetik problemdir (Priestley, 1993). Ayrıca, tirozinaz inhibitörleri melanin pigmentasyonu ile ilgili deri bozukluklarını tedavi etmek için klinik olarak kullanılabilir ayrıca deri beyazlatma etkileri ile de kozmetik için önemlidir (Maeda ve Fukuda, 1991; Seiberg, 2000). Monofenolaz, difenolaz ya da her ikisini de inhibe eden doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri Tablo 2.4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2.4.1. Monofenolaz, difenolaz ya da her ikisini de inhibe eden doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri (Parvez ve diğ, 2007).

İNİHİTÖR	KAYNAK
Arbutin	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>
Aloesin	<i>Aloe barbadensis</i>
Anakardik asit	<i>Anacardium occidentale</i>
Anisik asit	<i>Pimpinella anisum</i>
Agaritin	<i>Agaricus bisporus</i>
Anisaldehit	<i>Pimpinella anisum</i>
Kumic asit	<i>Cuminum cyminum</i>
Kuminaldehit	<i>Cuminum cyminum</i>
<i>p</i> -Kumarik asit	<i>Panax ginseng</i>
ECG	<i>Thea ginseng</i>
EGCG	<i>Thea ginseng</i>
La	<i>Agaricus hortensis</i>
3,4-Dihidroksinamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
Oksiresveratrol	<i>Morus alba</i>
Kaempferol	<i>Crocus sativus</i>
<i>Trans</i> -Sinnamaldehit	<i>Cinnamomum cassia</i>
Lb	<i>Agaricus hortensis</i>
4-Hidroksi-3-metoksinnamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
9-Hidroksi-4-metoksipisoralin	<i>Angelica dahurica</i>
5-Hidroksimetil-2-furfural	<i>Dictyophora indusiata</i>

Melanin biyosentezi UV ye maruz kalmanın önlenmesiyle, tirozinazın inhibe edilmesiyle, melanosit metabolizmasının inhibisyonu ve proliferasyonu ile inhibe edilebilir (Seiberg, 2000). Hiperpigmentasyon bozuklukları için melanazma ve hidrokinonlarla ağartma, retinoidlerle antienflamatuar tedavi ve tirozinaz inhibitörlerinin kullanımını içeren post-inflamatuar hiperpigmentasyon gibi standart lokal tedaviler vardır.

2.6.1. Doğal Kaynaklardan Elde Edilen İnhibitörler

Bitkiler zararlı yan etkileri olmayan biyoaktif kimyasalların zengin kaynaklarıdır, tirozinaz inhibitörleri için hala devam etmekte olan araştırmalar gerçekleştirilmektedir.

2.6.1.1. Yüksek Bitkilerden Elde Edilen İnhibitörler

Yüksek bitkilerden elde edilen inhibitörler fenoller ve aldehitler ve diğer türevleri olarak adlandırılan iki ana alt ünite olarak sınıflandırılmıştır (Kim ve Uyama, 2005).

Bitki Polifenoller: Polifenoller doğada yaygın olarak bulunan bir grup kimyasal bileşiktir ve sebze taninleri olarak bilinirler çünkü birçok çiçeğe rengini verirler. Bazıları bitkilerin kabuğunda, kökünde ve yapraklarında bulunan kompleks bileşikler iken bazıları ise taze meyvalarda, sebzelerde ve çayda bulunan basit bileşiklerdir. Kaempferol (Kuba ve Yokokawa, 1992; Kubo ve Kinst-Hori, 1999), kuarsetin (Chen ve Kubo, 2002), gibi bazı tirozinaz inhibitörü flavonoidler çeşitli bitkilerden izole edilmiştir.

Doğal kaynaklı inhibitörleri tanımlamak ve sınıflandırmak için birçok çalışma Kubo (2000) tarafından yapılmıştır ve inhibitör aktiviteleri ile yapısı arasındaki ilişkiyi belirlemiştir. Bunlara göre, bütün flavonoidler enzimin aktif bölgesindeki bakır ile çelatlaşma yeteneklerinden dolayı enzimi inhibe ederler. Ancak bu durum eğer 3-hidroksi grubu serbestse gerçekleşebilir. Bundan başka luteolin 4'-O-glikozid ve luteolin 7-O-glikozit gibi çeşitli flavonoidler için 3-hidroksi grubu inhibisyon için gerekli bir koşul olmadığına açıklık getirilmiştir, 3-hidroksi grubunun yokluğunda hala inhibitör aktivitesi göstermektedirler (Kubo, 1995). Son zamanlarda, Badria ve el Gayyar (2001) keto grubu içeren flavonoidlerin güçlü inhibitör aktivitesine sahip olduklarını bulmuştur. Bu L-DOPA'daki dihidroksifenol grupları ile flavonoidlerdeki keto grubunun benzerliğiyle açıklanabilir. Bu çalışmanın sonucu doğal kaynaklı tirozinaz inhibitörlerine yeni bir türü ortaya koymaktadır. Bu grubun diğer bir önemli bileşiği D-glikozun çapraz esterleriyle meydana gelen gallik asittir ve esterleri gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak genişçe kullanılır. Çeşitli gallik asit türevleri yeşil çaydan (Adhamı, 2009) ve *Galla rhois* (Kim ve diğ., 1998; Parvez, 2006)'den izole edilmiştir ve bazıları ise güçlü tirozinaz inhibitörü olarak adlandırılmıştır. Çalışmalar göstermiştir ki 3-pozisyonundaki galloil kısmın ile flavon-3-ol iskeleti tirozinaz aktivitesinin optimum inhibisyonu için önemli bir yapısal gerekliliktir. 1,2,3,4,6-Penta-

O-galloil-d-glikoz (PGG), *G. Rhois*'den izole edilen bu aktif bileşiğin güçlü bir tirozinaz aktivitesi olmasına rağmen önceki çalışmalarda benzen halkasının esterleşmesi, hidroksilasyonu veya metilasyonu ile aromatik karbosiklik asitlerin tirozinaz inhibitör etkisinin azaldığından bahsedilmemesini fark etmek ilginçtir (Menon, 1990; Kermasha, 1993). Buna rağmen, gallik asit ve onun kısa alkil (<C10) zincir esterleri substratlar olarak tirozinaz tarafından sarı oksidasyon ürünleri vererek oksidasyona uğramıştır ama uzun alkil (>C10) zincir esterleri pigmente olmuş ürünler oluşturmadan enzimi inhibe etmiştir bu da karbon zincirinin uzunluğunun tirozinaz inhibitör aktivitesi üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Diğer bir deyişle, moleküllerin artan hidrofobiklikleriyle gallatlar enzimin tersiyer yapısının bozulmasına bağlı olarak enzim tarafından okside olmaya daha dayanıklı hale gelirler (Kubo, 2003). Kardol türevleri gibi (Kubo, 1994) diğer çeşitli biyoaktif yapılarda hidroksil grubunun katılması inhibitör aktivitesini artırırken metil grubunun katılması inhibitör aktivitesini azaltmaktadır ayrıca doymamış alkil yan zinciri doymuşla karşılaştırıldığında daha güçlü bir inhibisyon göstermiştir. p-Kumarik asit (Lim, 1999) hem fenolaz hem de difenolaz aktivitelerini inhibe eder ve para pozisyonundaki polar hidroksi grubunun monofenolaz inhibitör aktivitesini artırırken difenolaz inhibitör aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir. Oksiresveratrolün (Shin, 1998) halkadaki maksimum hidroksi gruplarının varlığına bağlı olarak güçlü tirozinaz inhibitör aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Ancak inhibitör aktivitelerine ve yapı kriterine bağlı bir aydınlatıcı açıklama yoktur.

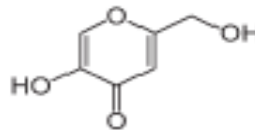
Aldehit ve diğer türevleri: Geniş sayıdaki aldehitler ve diğer türevleri izole edilmiştir ve trans-sinamaldehit (Hwang ve Lee, 2007), (2E)-alkenalleri (Kubo ve Kinst-Hori, 1999), 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehit (Kubove Kinst-Hori, 1999), 3,4-dihidroksisinamik asit ve 4-hidroksi-3-metoksisinamik asit (Hwang ve Lee, 2007) gibi tirozinaz inhibitörleri olarak sınıflandırılmıştır. Aldehit grubunun sülfidril, amino ve hidroksi grupları gibi biyolojik olarak önemli nükleofilik gruplarla reaksiyona girdiği bilindiğinden enzimin primer amino grupları ile Schiff bazı oluşturarak enzimi inhibe ettiği öne sürülmüştür. Çeşitli aldehitlerin inhibitör aktivitelerinin karşılaştırılması ve sinamik asit, anisik asit, kumik asit ve benzoik asit gibi yakın bileşikler kuminaldehitin en güçlü inhibitör olduğunu kanıtlamıştır (Kubo ve Kinst-Hori, 1988). Kuminaldehitin para pozisyonundaki elektron verici gruplarının (izopropil ve metoksi) indükleyici etkiyle

enzimin aktif bölgesindeki Schiff bazının kararlılığını sağladığını fark edilmiştir (Wilcox, 1985; Conrad, 1994). 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehit dışında yukarıda bahsedilen aromatik aldehitler Kubo ve Kinst-Hori (1988, 1998, 1999) tarafından yarışmasız tirozinaz inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. Yine de, aldehitlerin inhibisyon biçimine dayanan çelişkili açıklamalar Jimenez (2001) tarafından bildirilmiştir, buna göre bütün 4-substitüeli benzaldehit türevleri L-DOPA oksidasyonunun yarışmalı inhibitörleri gibi davranmaktadır. Asit türevleri durumunda inhibisyon mekanizması enzimin binükleer bakır kısmında bakır-karboksilik asit kompleksinin oluşumuna yol açar. (Jimenez, 2001); para pozisyonundaki fenolik grubun ileri substitutionu inhibisyon boyutunu artırır (Wilcox, 1985).

2.6.1.2. Mantarlardaki İnhibitörler

Yüksek bitkilerin aksine mantar kaynaklı bazı bileşikler de tirozinaza karşı inhibitör aktiviteleri nedeniyle tanımlanmış ve bildirilmişlerdir (Schallreuter ve Wood, 1990).

Azelaik asit (1,7-heptandikarboksilik asit), *Pityrosporium ovale* mayası tarafından üretilen doğal olarak meydana gelmiş düz zincirli doymuş dikarboksilik asittir. Azelaik asidin primer kütanöz melanomanın kanserli melanositleri üzerinde kesin bir sitotoksik etkisi vardır bu yüzden normal melanositler etkilenmiş gözükmeyebilir (Schallreuter and Wood, 1990). Kojik asit (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-gamma-piron) (Şekil 2.6.1.2.1), *Aspergillus niger* ve *penicillum* (Parrish, 1966) türlerinin çoğu tarafından üretilen bir fungal metabolittir, geçiş metal iyonları için iyi bir çelatlayıcıdır ve serbest radikal tutucudur (Wiley, 1942; Niwa ve Akamatsu, 1991).



Şekil 2.6.1.2.1. Kojik asit

Metallotiyonin mayası çoğu zaman rastlanan sitosolik proteinlerdir, genellikle büyük miktarlardaki ağır metal iyonlarını seçici bağlamaları ile karakterize edilirler, yüksek sistein içeriğine sahiptirler ve *Neurospora crassa* bakır-metallotiyoninin apotirozinaz için metal donör olduğu belirtilmiştir (Lerch, 1981).

Aspergillus niger'den gelen metallotiyonin mantar tirozinazın aktif bölgesindeki bakırı şelatlamak için güçlü bir yeteneğe sahiptir dolayısıyla güçlü bir inhibitör olarak hareket eder (Goetghebeur ve Kermasha, 1996).

2.7. TİROZİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN UYGULAMA ALANLARI

2.7.1. Gıda Endüstrisi

Sebze ve meyvelerdeki kahverengileşme, ürünün organoleptik özelliklerini azalttığından yetiştiriciler ve besin endüstrisi tarafından büyük ilgiyle takip edilmektedir. Enzimatik kahverengileşme oranı dokudaki aktif tirozinazın ve fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna, oksijen varlığına, pH ve sıcaklık koşullarına bağlıdır (Martinez ve Whitaker, 1995). Bu yüzden, tirozinazın neden olduğu enzimatik kahverengileşmeyi durdurmak için çeşitli metotlar tespit etmek gerekmektedir. Şimdiki geleneksel metotlar kahverengileşmeyi önlemek için tirozinazı inaktive eden otoklav ve ağartma metotlarının kullanımını içerir ama bu prosesler üründe önemli ağırlık ve besin değeri kaybına yol açmaktadır (Konanayakam ve Sastry, 1988). Diğer bir alternatif yaklaşım mikrodalga enerjisinin kullanımınıdır fakat bu, örnek içinde meydana gelen ve sadece aşırı ısınmış bölgelerde enzim inaktivasyonuna, daha soğuk bölgelerdeki enzimin ise tamamen inaktive olmamasına sebep olan bir sıcaklık artışı (Decareau, 1985) temel dezavantajından dolayı zarar görmektedir, buna ilaveten bu, iç su buharlaşmasına neden olarak ilgili mantar dokusuna hasar verir (Rodriguez-Lopez, 1991). Mikrodalga ve sıcak su kombinasyonu tedavisinin uygulanması son ürün kalitesi koşullarında kısmen daha iyidir (Devece ve diğ., 1999). Halojen tuzlar, aromatik karboksilik asitler (Mayer, 1987), sülfid (Smith ve Lindsay, 2001), sitrik asit, askorbik asit ve türevleri (Santerre, 1988; Hsu, 1988) gibi indirgeyici özelliğe sahip diğer bileşikler, sistein (Dudley ve Hotchkiss, 1989) gibi tiyol bileşikleri tirozinazı inhibe edici olarak bilinirler. Askorbik

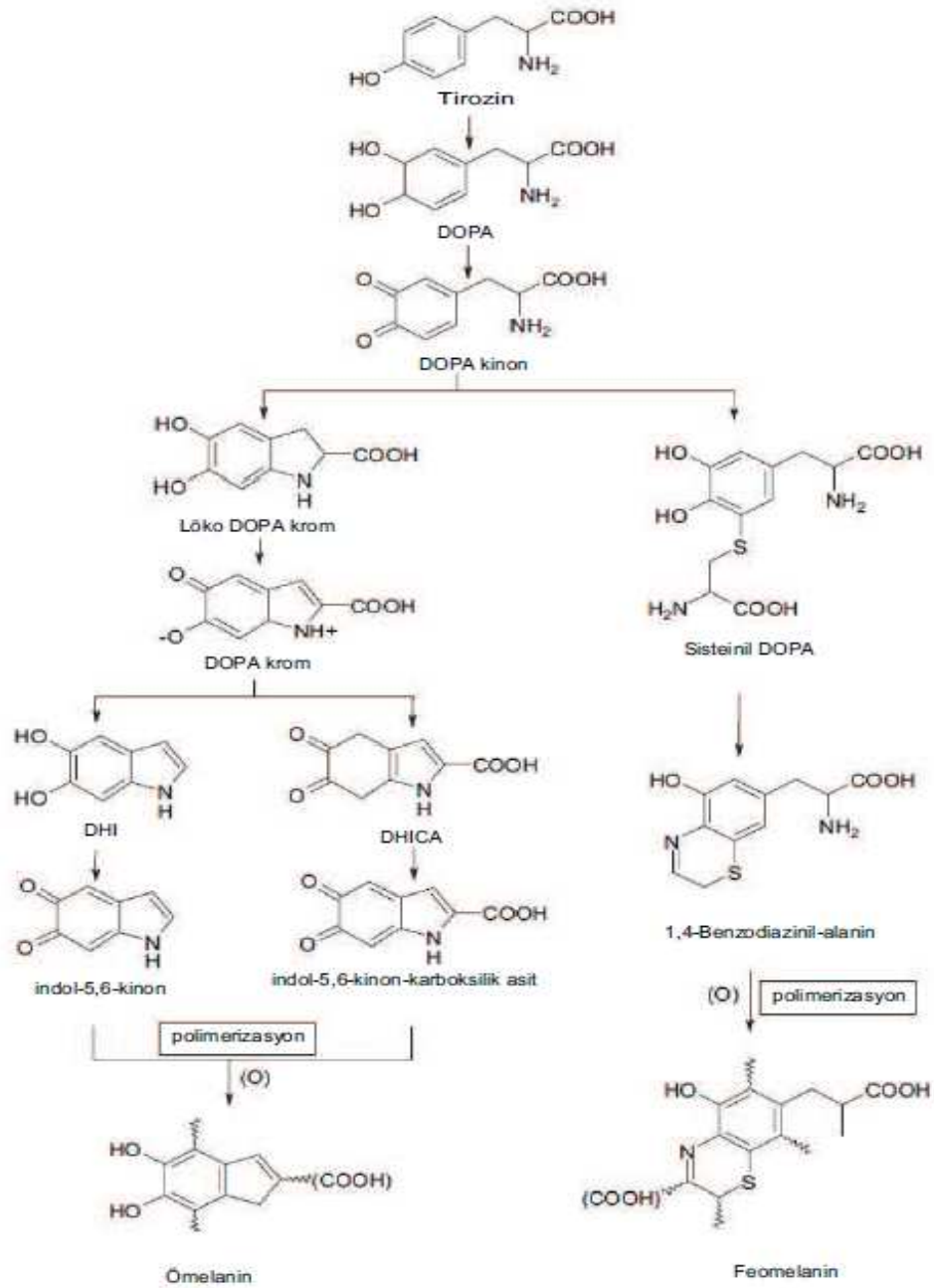
asit, sodyum bisülfat ve diğer indirgeyici ajanların tirozinaz üzerine etkisi uzun yıllar tartışılmıştır (Golan_Goldhirsch ve Whitaker, 1984). Buna ek olarak sülfidlerin kullanımı potansiyel sağlık risklerine bağlı olarak günden güne kısıtlanmaktadır (Taylor ve Bush, 1986). Günümüzde, besin endüstrisinde 4-hekzilresorsinol kullanımının güvenli olduğu düşünülmektedir bu taze ve kurutulmuş meyve dilimlerinin kahverengileşmesinin kontrolü için oldukça etkilidir (Frank, 1991). Besin endüstrisinde kullanılacak olan bir enzim inhibitörü güvenli olmalı ve toksik olmamalıdır. Tirozinaz inhibitörü kimyasal maddelerin toksik olması nedeniyle doğal kaynaklardan elde edilen inhibitörlerle tirozinaz inhibitör çalışmaları devam etmektedir.

2.7.2. Kozmetik Endüstrisi

Melanin en yaygın şekilde vücutta bulunan pigmentlerdendir. Bakteri mantar ve hayvanlarda bulunur. Biyopolimerlere benzer kompleks yapılı büyük bir polifenoldür. Sarıdan siyaha birçok renge sahiptir (Prota, 1988). Memelilerin cilt ve saç rengini etkileyen bir çok faktör vardır. Bunların en önemlisi melanin pigmentasyonudur. Melanin epiderminin tabakasındaki melanosit hücrelerinde oluşmakta ve stratum germinativum ile stratum spinosum hücrelerine geçmektedir. (Spritz ve Hearing, 1994). Özelleşmiş lizozomlara sahip melanositler melanozom olarak adlandırılır. Bu hücreler melaninin sentezi için gerekli bir çok enzim içerirler (Tiedtke ve diğ. 2004). Melaninin ciltteki rolü ultraviyole (UV) ışınları absorblayarak UV hasarına, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı cildi korumaktır. Toksik kimyasalları ve ilaç kalıntılarını temizler. Farklı dermatolojik bozukluklar pigmentlerin ölçsüz dağılımı sonucu oluşur (Kim ve Uyama, 2005). Aktinik hasarlar, melazma, çil, yaşa bağlı lekeler düzensiz pigment dağılımına bağlı şikayetlerdir (Frank, 1995). Hiperpigmentasyon veya hipopigmentasyon görülebilir. Kötü huylu tümörlerin göstergesi olabilir. Melanositlerde sentezlenen melaninin çeşidi, miktarı, dağılımı, cildin rengini belirler. Keratinlerin etrafını saran melanin cilt tonunu belirler.

Cilt rengini açan preparatlar, esmer cilt rengini, güneş yanığı rengini açan, ciltteki lekeleri gideren kozmetik preparat şekilleridir. Ciltte, melanin biyosentezinin şu şekilde olduğu belirtilmektedir:

Tirozinaz enzimi ile tirozinden DOPA (L-dihidroksifenilalanin) oluşur. Yine tirozinaz enzimi ile dopakinon, lökodopakrom, dopakrom, 5,6 – dihidroksiindol, 5,6-indol kinon, melanin oluşur.



Şekil 2.7.2.1. Melanin biyosentezi

Cilt rengini açan preparatların etki biçimi şöyle özetlenebilir:

- 1- Melanin oluşan hücrelerin, (melanositlerin) tahrip olması,
- 2- Melanin biyosentezinin engellenmesi,
- 3- Tirozinaz enziminin inaktive edilmesi,
- 4- Melanin granüllerinin stratum germinativum ve stratum spinosum hücrelerine geçişinin önlenmesi
- 5- Melanin pigmentinin okside edilerek rengin açılması veya giderilmesi şeklinde olur.

Düzensiz cilt renklenmesinden korunmak için cilt rengini açmada kullanılan ürünler son yıllarda giderek artan bir popülerlik kazanmıştır. Bu ürünler kozmetik alanda ve klinik tedavilerde yaygın olarak kullanılmıştır. Reçetesiz ilaç, reçeteli ilaç ve kozmetik olarak kullanılabilirler. Bu ürünler için farklı ülkelere göre farklı düzenlemeler yapılmaktadır. Pek çok kozmetik firması, cilt rengini açmada kullanılan kozmetik preparatlar için melanin inhibitörü olan yeni etken maddeler araştırmaktadır. Bunların cildin ya rengini açtığı (cilt renklerini değiştirmek isteyen kişiler) yada depigmente ettiği (melazma ve yaşlanmaya bağlı lekeler gibi cildin anormal-hiperpigmentasyonunun tedavisi) varsayılmaktadır (Özer, 2006).

İdeal bir renk açıcı madde farmakolojik olarak uygun özelliklerde olmalı, 2-3 ay gibi bir sürede etkisini göstermeli, yan etki olasılığı düşük olmalı, istenmeyen lekeleri kalıcı olarak uzaklaştırabilmelidir. Cilt rengini açmada kullanılan ürünler, melanin oluşumunu engelleme mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Melanin oluşumunu azaltabilen veya engelleyebilen kozmetik preparatlar olarak tanımlanan bu ürünler genellikle etki mekanizmalarına göre üç grupta incelenebilirler (Özer, 2006).

- Tirozinaz aktivitesinin doğrudan inhibisyonu
- Tirozinaz sentezi veya oluşumunun bastırılması
- Seçici melanosit toksiditesi

Fakat bazı maddeler, sürecin farklı aşamalarında etki göstermektedirler. Ayrıca ilave veya sinerjistik etkiler elde ederek etkiyi arttırmak amacıyla formülasyonların büyük bir bölümünde bu maddelerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Özellikle farklı mekanizmalarla etkinlik gösteren maddelerin düşük konsantrasyonları seçilerek yan etkinin azaltılması, etkinliğin artırılması hedeflenmektedir.

Trikloroasetik asit gibi cilt soyucu ürünler melanin içeren cilt yüzeylerini soyma etkisiyle uzaklaştırmak için kullanılır. Kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde renk açıcı olarak kullanılan daha etkili ve daha güvenilir yeni maddelerin sayısı hızla artmaktadır. Cilt rengini açan maddelerin en tanınmış olanları, hidrokinon, hidrokinon monometil eter, arbutin, kojik asit ve azelaik asittir. Civa tuzları bakır iyonuyla yarışarak tirozinaz inhibisyonu göstermelerine karşın allerji ve nefrotoksisite gibi ciddi yan etkiler gösterdiklerinden kullanılmamaktadırlar. Melanin oluşumunu engelleyici bir etkiye sahip olan bitki ekstreleri daha az yan etkiye sahip olduklarından iyi bir seçim olabilirler. Aynı zamanda diğer etken maddelerle sinerjik etki de oluşturabilirler. *Morus alba*, *Glycyrrhiza glabra* gibi pek çok bitkinin ekstresi bu amaçla kozmetik preparatlarda kullanılmaktadır (Özer, 2006).

2.7.2.1. Hidrokinon

Hidrokinon (HK), değişken etkilerine ve güvenilirlik problemlerine karşın dünyada en fazla önerilen cilt rengini açan maddedir. Bir hidroksi fenolik kimyasal bileşiği olan HK, tirozinaz enzimini baskılayarak DOPA'nın melanine dönüşümünü önlemektedir.

Ayrıca melanozomların oluşum ve ayrışması ile melanositlerde DNA ve RNA sentezini engelleyerek işlev görmektedir. Amerika Birleşik Devletlerin de reçetesiz olarak % 2'ye kadar olan konsantrasyonlarda ve reçeteli olarak daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Avrupa da ise en fazla % 2 oranında güvenli ve etkili kabul edilmektedir. HK ile başta tretinoin ve glikolik asit olmak üzere diğer maddeleri içeren kombine preparatların kullanılmasının etkiyi arttırdığı görülmektedir. HK'nun cilt rengini açıcı etkisi, günlük uygulamalarda genellikle bir kaç hafta ile bir kaç ay arasında görülmektedir. Etkisi konsantrasyona, taşıyıcıya ve formülasyonun stabilitesi gibi çeşitli parametrelere bağlı bulunmaktadır. Genel olarak konsantrasyon arttıkça etkiside

artmakta fakat daha iritan hale gelmektedir. Yan etkileri nedeniyle % 5 üzerindeki konsantrasyonları önerilmemektedir. En sık görülen yan etkiler iritasyon, kuruluk, kaşıntı, allerjik reaksiyonlar ve tırnak hiperpigmentasyonudur. Ayrıca uygulama alanının dışındaki bölgelerde hipopigmentasyon, vitiligo benzeri depigmentasyon gibi şiddetli yan etkilerde görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarla yapılan uzun süreli tedaviler sırasında kalıcı depigmentasyon oluşabilir. Kullanımı doktor kontrolünde, geceleri bir doz olacak şekilde ve gün boyunca yüksek koruma faktörlü bir güneş filtresi kullanarak olmalıdır. Etkisini 3-4 ayda göstermesi beklenir. HK son derece reaktif olup melanositler için güçlü bir sitotoksik ve mutajenik bileşiktir. HK içeren kremlerin rengi 3-4 ay sonunda beyazdan kahverengine dönüşmektedir. Bu nedenle ABD dışında HK'nun sadece ilaç olarak kullanılmasına, kozmetik ürünlerde ise kullanılmamasına karar verilmiştir.

2.7.2.2. Hidrokinon Monobenzil Eter (HMBE, monobenzon)

Monobenzon, pigmentli hücreler üzerine HK ile benzer bir mekanizmaya sahiptir. Tirozinaz tarafından, melanositlere kalıcı bir zarar veren, reaktif içermeyen radikallere metabolize edilir. Etkisi, uygulama yeriyle sınırlı kalmaz. Sadece şiddetli vitiligo'da etkilenmeyen bölgelerin rengini açmak için kullanılır.

2.7.2.3. Arbutin

Uvae ursi yaprağından elde edilen bu HK, β -D-glukopiranositin, tirozinaz aktivitesini engelleyerek etkili olduğu düşünülmektedir (Kahn, 1995). Arbutin, melazma ve UV kaynaklı benekler dahil olmak üzere deri altı hiperpigmentasyon bozukluklarının tedavisinde kullanılan güvenilir ve hafif etkili bir ajandır. Melanozomların tirozinaz aktivitesini engelleyerek etki göstermektedir. Arbutin, insan kültür melanositlerinde HK'a nazaran çok daha az sitotoksiktir. Bir hidrokinon glikozidi olan arbutin ve bir C-glikozillenmiş chromone olan aloesin sırasıyla *Gvae grsi* ve *Aloe vera* yapraklarından izole edilmiştir ve inhibitör etkilerinden dolayı incelenmiştir (Kahn, 1995). Arbutinin enzim aktivitesini yarışmalı olarak inhibe ettiği (Kahn ve Zakin, 1995) bildirilirken bir başka karşı raporda Funayama (Parrish, 1966) arbutinin iki formunun hem mantardaki

hem de fare melanomasındaki tirozinaz aktivitelerini yarışmasız olarak inhibe ettiğini öne sürmüştür ve bu arbutin karışık-tipte (mixed-type) inhibisyon ile sadece fare melanomasındaki tirozinazı inhibe eder. Buna ek olarak, Jin (Wiley, 1942), aloesin ve arbutinin birlikte muamele etkisi üzerinde çalışmış ve her ikisinin de tirozinaz aktivitesini farklı mekanizmalarla hareket ederek sinerjistik bir biçimde inhibe ettiğini bulmuştur; aloesin yarışmasız olarak inhibe ederken arbutin yarışmalı olarak inhibe etmektedir. İkisi birlikte ele alındığında yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon mekanizmaları ile melanin üretimini sinerjistik olarak inhibe etmektedir. Dolayısıyla, yukarıdaki bulguların hepsi göstermiştir ki aloesin ve arbutin karışımının depigmentasyon etkisi için kullanımı yararlıdır.

2.7.2.4. Kortikosteroidler

Topikal kortikosteroidlerin cilt rengini açıcı etkisi belirgin olmasına karşın etki mekanizması halen açık değildir. Çok sayıda yan etkisinden ötürü uzun süreli tedavilerden kaçınılmalıdır. Sıklıkla geri dönüşümsüz depigmentasyona neden olurlar. Diğer maddelerle kombinasyonu halinde etkili olabilir.

2.7.2.5. Tretinoin

Tretinoin, hem kalıcı hem de değişken melanin oluşumunu engelleyerek zayıf bir renk açıcı etki gösterir. Keratinositlerin içinde melanozomların yayılmasına yardımcı olur. Ayrıca epidermin yenilenme hızını artırır. Ana yan etkisi, uygulama yerinde ortaya çıkan irritasyondur. Tretinoinin HK ve türevlerinin cilt rengini açıcı etkisini artırdığı kabul edilmektedir. Tretinoin, çeşitli pigmenter bozukluklarının tedavisi için % 0.025 ile % 0.1 arası konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

2.7.2.6. Azelaik Asit

Azelaik asit (Şekil 2.7.2.6.1) doğal yollardan oluşan bir 9-karbondikarboksilik asittir. In vitro olarak tirozine benzer işlev görür, ayrıca DNA sentezini ve mitokondri

oksidoredüktazını engelleyebilir. Azelaik asit, melazma ve post-inflamatuvar hiperpigmentasyonun tedavisi için % 15-20 konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Glikolik asit ile birlikte kullanılabilir. Yapılan klinik bir çalışmada, % 15-20'lik glikolik asit losyonunun % 20'lik bir azelaik asit kremine ilavesinin, koyu derili kişilerde yüz hiperpigmentasyonunun tedavisi için % 4 'lük HK kremi kadar etkili olduğu görülmüştür. Sistemik ya da lokal bir yan etkisi yoktur (Özer, 2006).



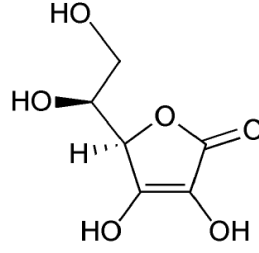
Şekil 2.7.2.6.1. Azelaik asit

2.7.2.7. Kojik Asit

Kojik asit, *Aspergillus spp* ve *Penicillium spp* tarafından üretilen fungal bir metabolik üründür. Güçlü bir tirozinaz inhibitörü olup bakır ile çelasyon sonucu etkisini gösterir. (Kim ve Uyama, 2005). % 1-4 konsantrasyonda krem bazında, tek başına veya diğer maddelerle kombinasyon halinde kullanılır. Glikolik asit ile sinerjistik etki yaptığı düşünülmektedir. Hidrokinona benzer etkide olup daha az yan etki gösterir. (Maeda ve Fukuda, 1991).

2.7.2.8. L-Askorbik Asit

L-Askorbik asit, o-kinon oluşumunu azaltarak melanin oluşumunu engelleyen ve okside olmuş melanini azaltan bir madde olarak bilinmektedir. % 2-5 konsantrasyonda kullanıldığında etkindir, yan etkisi yoktur, fakat formülasyonu güçtür. Vitamin C sulu çözeltilerde hızla okside olduğundan ve bozduğundan, genellikle cilt rengini açıcı madde olarak kullanılması faydalı değildir. Onun yerine daha dayanıklı olan, magnezyum-L-askorbil-2-fosfat gibi deriveleri sentezlenerek bu amaçla kullanılır. Bu bileşik deri fosfatlarıyla reaksiyona girerek askorbik asidi serbest hale geçirir. Fakat kolayca anyonlarına ayrıldığı için deriden geçişi güç olur.



Şekil 2.7.2.8.1. Askorbik asit

2.7.2.9. Retinoik Asit

Retinoik Asit tirozinazı ve TRP-1 sentezini inhibe eder, UV-B radyasyona bağlı TRP-2 inhibisyonunu tersine çevirir. % 0.05-0.1 konsantrasyonda eritem ve kuruluk gibi hafif yan etkiler göstermekle beraber yavaş fakat etkin sonuçlar verir. Kullanımı sırasında güneşten korunma zorunludur (Özer, 2006).

2.7.2.10. Elajik Asit

Elajik asit (EA), doğal yollardan oluşan bir polifenol olup çilek, üzüm, ıtır, yeşil çay, okaliptus, ceviz ve tara gibi pek çok bitkide bulunmaktadır. Hidroliz ve elajitanin distilasyonu ile elde edilmektedir. Bu bileşik güçlü bir antioksidan olup tirozinaz aktivitesini bastırabilir. EA'nın, tirozinazın aktif merkezine kolayca penetre olarak, bakır iyonları ile çelat oluşturduğu düşünülmektedir. Azalan bakır konsantrasyonuna bağlı olarak tirozinaz aktivitesinde de azalma olmaktadır. Melazma karakteristikleri, post-inflamatuvar pigmentasyon ve diğer koşullar, EA uygulaması ile düzelmektedir. Umut verici bir cilt rengini açıcı etken maddedir. Guinea domuzunda yapılan bir çalışmada aynı dozda uygulanan arbutin ve kojik aside göre daha etkin, HK ile aynı etkide bulunmuştur (Özer, 2006).

2.7.2.11. Niasinamid

Niasinamid vitamin B₃ ün biyolojik olarak aktif halidir. Melanositlerden keratinositlere melanazom transferini azaltarak etki gösterdiği düşünülmektedir.

2.7.2.12. α - ve β -hidroksi asitler

Yüksek konsantrasyondaki glikolik asit, o-hidroksi benzoik asit, salisilik asit gibi bazı α - ve β -hidroksi asitler kimyasal soyucu olarak kullanılırlar. Bunlar aynı zamanda tirozinaz inhibitörü olarakta işlev görür. Genellikle hidrokinon ve kojik asitle kombinasyonları halinde kullanılırlar.

2.7.2.13. Diğer Ajanlar

Klorokin, indometazin, niasinamid, resveratrol, balık yağı ve yeşil çay gibi çeşitli sistemik ilaçlar ve doğal ürünler koruyucu ajan olarak kullanılabilir. Sayılan tüm bu renk açıcı maddelerle çeşitli kombinasyonlar yapılarak etkiyi arttırmak, kullanım süresini kısaltmak ve yan etkiyi azaltmak amaçlanmıştır. Ayrıca, yalnızca pigmenter bozukluklara değil fakat aynı zamanda kırışıklıklara ve kansere de neden olan UV ışınlarının cilde zarar verici etkileri konusunda tüketicilerin bilgilendirilmesi ve eğitilmesi önem taşımaktadır. UV ışınlarının ivedi, hasar verici etkilerine karşı dermal dokuyu korumak için güneş filtrelerine gerek duyulmasının yanı sıra cilt rengini açıcı maddeler, UV kaynaklı melanin oluşumuna bağlı pigmenter bozuklukların önlenmesi ve ortadan kaldırılmasına yardım etmektedirler. Renk açıcı preparatların uygulanmasını izleyen 6 ay boyunca bir etki görülmezse uygulama kesilmelidir. Bu preparatlar en fazla 2 yıl kullanılabilir. Sonuç olarak, piyasada genellikle bileşenlerin kombinasyonlarının kullanıldığı pek çok ürün bulunmaktadır. Kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde yeni renk açıcı maddeler konusundaki araştırmalar artarak sürmektedir. Buna bağlı olarak, yeni, daha etkili ve güvenilir bileşenlerin sayısı artmaktadır. İyi standartlara sahip kozmetik ürünlerin geliştirilebilmesi için bu ürünlerinin etkinliklerinin istatistiksel olarak karşılaştırıldığı çalışmaların tamamlanması gerekmektedir (Özer, 2006).

2.7.3. Klinik Çalışmalar

Tirozinaz, yıllardır kozmetik ve tarım ile birlikte besin endüstrisindeki kullanımını için araştırılmaktadır. Son yıllarda tıp endüstrisindeki uygulamaları oldukça popülerlik kazanmıştır çünkü pigmentasyon ve aşağıda belirtilen diğer cilt bozukluklarından koruma etkisine sahiptir.

2.7.3.1. Vitiligo Belirteci

Vitiligo saç hipopigmentasyonu ve epidermisin bazal tabakasındaki total melanosit azalmasıyla karakterize edilmiş otoimmün bir hastalıktır. Tirozinaz normal melanositlerde ve melanom hücrelerinde melanin üretiminden sorumludur ve birçok otoimmün bozuklukları için otoantijen olarak bilinmektedir. Vitiligonun immünolojik çalışmaları antikor gelişimi ve varlığı sırasında hasta serumunda melanosit antijenlerine karşı hareket ettiği göstermiştir. Mantar tirozinazı üzerinde katı-faz ELISA kullanarak lokal vitiligolu hastalarla karşılaştırıldığında diffüze vitiligolu hastalarda daha yüksek titreli IgG anti-tirozinaz antikorları bulunmuştur. Vitiligolu hastaların serumundaki bu anti-tirozinaz antikorlarının tirozinaza karşı ilgisinden faydalanarak hasta iyileştirilebilir. Bu antikorlar ne farklı otoimmün bozuklukların diğer otoantijenleriyle çapraz reaksiyona girer ne de tirozinaz aktivitesini bloke eder ki bu da enzimin katalitik bölgesiyle reaksiyona girmediğini gösterir. Bu da tirozinazın bir otoantijen gibi davrandığını ve bir vitiligo markeri gibi görev yaptığını açıklar (Baharav, 1996). Melanosit yıkımından korunmak için bir başka girişimde, *A. bisporus* hayvan modellerinde oral olarak uygulamıştır ve bu hücre ortamında azalmış bir immün cevap olarak sonuç vermiştir (Zehtab, 2001). Bu oral uygulamanın hücresel yanıtın baskılanmasına bağlı olarak otoantijenlere karşı olduğu düşünülmüştür (Kemp, 1997). Bu yüzden, uzun süreli çalışmalarda vitiligonun klinik özellikleri ile tirozinaz antikor düzeyleri arasındaki ilişkiyi tayin etmek yararlı olacaktır.

2.7.3.2. Prodrug Tedavisi

Malign melanom, sitotoksik tedavi sırasında radyasyon ve kemoterapiye maruz kalmaya cevaben melanom hücrelerinin yıkılmasına bağlı olan, insanlar arasında yüksek ölüm oranına sahip ciddi bir klinik problem olmaya devam etmektedir. Bu yüzden, metatoksik melanom, kanser tedavisinde sistemik bir tedavi bulunması için araştırmacılar tarafından çözülmesi gereken bir sorun olmaya devam etmektedir. Seçici sitotoksik yanıtı böyle bir tedavi geliştirmek için tirozini tirozinaz ile melanine çeviren biyosentetik yolu engellemek gereklidir (Prota, 1994). Bu, melanom hücrelerinde tirozin için tasarlanmış inaktif prodrugların sitotoksik ilaçlara seçici dönüşümünü sağlayacaktır. Malign melanoma karşı böyle seçici bir strateji melanosite yönelmiş enzim prodrug tedavisi (MDEPT) olarak adlandırılır ve oldukça yüksek seçicilikte ilaç iletim sistemi sağlar (Jordan, 2001).

2.7.3.3. Kanserdeki Rolü

Tirozinazın kanserdeki rolü üzerine bazı makalelerde mantar tirozinazının tümör baskılayıcı etkisinden bahsedilirken diğerlerinin mutajenite üzerinde olası bir rolü olduğunu öne sürdüğü çelişkili sonuçlar mevcuttur. Vogel (1977), sabit γ -L-glutaminil-4-hidroksibenzenin (GHB) tirozinaz tarafından kinona yükseltgendiğini ve mitokondriyal enerji üretimi ile birlikte nükleik asit ve protein sentezini baskılayan ikinci bir oksidasyon ürünü olduğunu bildirmiştir. Kültüre edilmiş fare L1210 lösemi ve B-12 melanom hücrelerinin saf kinon ile inkübasyonu farede tümör gelişimini engellemiştir ama bu hücreler GHB varlığında inkübe edildiğinde tümör baskılanması sadece B-16 melanomasında gerçekleşirken L1210 lösemi hücrelerinde tirozinaz enziminin yokluğuna bağlı olarak gerçekleşmemiştir. Bu sonuç GHB'nin sitotoksik etkisinin tirozinaz varlığına bağlı olduğunu açıklamaktadır. L-glutamik asit ve p-hidroksianilin B-16 melanom üzerindeki antitümör etkisi *in vivo* olarak çalışılmıştır. Mantar tirozinazı varlığı DNA polimeraz aktivitesini inhibe etmiş ve onun 3,4-dihidroksi türevi timini inhibe ederken 2,5-dihidroksi türevi urasili ve melanom hücrelerinin nükleik asit ve proteinlerine lösinin katılmasını inhibe etmiştir (Wick, 1980). Buna rağmen, diğer sonuçlar mantar tirozinazının kanser tedavisindeki olumsuz

etkisini açıklamaktadır. Papaparaskeva-Petrides (1993), fenolik ve kininik bileşiklerin oluşumuna bağlı olarak mantar ekstraksiyonun mutajenik artışından tirozinazın sorumlu olduğunu bulmuştur. Buna ek olarak, bu mutajenik yanıt katalaz-süperoksit dismutaz, glutatyon ve dimetil sülfoksit tarafından inhibe edilir ki bu da fenolik ve kininik bileşiklerin reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki rollerini açıklar. Mantar tirozinaz yolunun mutageniteye veya hayvan kalıntılarındaki hidrazinlerin kanserojenliğe katkısı aydınlatılmalıdır.

2.7.3.4. Antioksidan Rolü

Yaşayan canlılarda serbest radikallerin kontrolsüz üretimi kanser, ateroskleroz gibi birçok hastalıklara ve romatoid artrit yaşla ilgili dejeneratif proseslere neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge,1984). Ama, beslenmede antioksidanların varlığı oksidatif hasarın azaltılmasına yardımcı olur. Eski zamanlardan beri mantarlar beslenmede önemli bir bileşenidir, bu yüzden antioksidan potansiyelini incelemek için sayısız çalışma yapılmıştır. Son yıllarda Shi (2002), soğuk su *A. bisporus* ekstrelerinin hücresel DNA'yı H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif hasardan koruduğunu bildirmiştir. Tirozinazın genokoruyucu aktivitesinin tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonuna ve L-DOPA'nın kinona oksidasyonundan kaynaklandığını bulmuşlardır (Gerritsen, 1994). Redoks bir döngüde bu kinonlar antitümör aktivitesinden ve Parkinson hastalığındaki L-DOPA ile tedaviyi baz alır nörotoksik hasardan sorumlu olan zararlı oksidatif radikaller, peroksitler, semikinonlar ve kinonlar üretirler (Cohen,1985). Bundan başka, Cu(II) varlığında L-DOPA'dan üretilen serbest oksijen radikallerinin oluşumu *in vitro* koşulları altında DNA zincir kırılması ile ilgilidir (Husain ve Hadi, 1995). Buna rağmen, tirozinaz tarafından oluşturulan L-DOPA oksidasyon ürününün genokoruyucu etkisinin kesin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Prooksidan aktivitesinin dışında L-DOPA ayrıca belirli şartlar altında hücresel antioksidan savunma mekanizması düzenler. Düşük konsantrasyonlarda antioksidan glutatyonun hücre içi konsantrasyonunu artırır böylece beyin hücrelerinin serbest radikal tutma kapasitesini arttırmış olur (Han, 1996).

Tirozinazın klinik çalışmalarda ki bu önemi tirozinaz enzimi ve inhibitörleri üzerinde araştırmaları gerekli kılmaktadır. Bu çalışmada çeşitli bitkilerden hazırlanan bitki ekstrelerinin ve kimyasal maddelerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri incelendi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER

Buzdolabı	:	Arçelik
Destile Su Cihazı	:	Brand MonoDest3000
Deepfreeze: Beko	:	Beko
Etüv	:	Nüve FN500
Evaporatör	:	Bibby Rotary Vacum Evaporator
pH Metre	:	Hearus
Sonikatör	:	Bandelin Sonarex
Terazi	:	Mettler 110 Hassas Terazi
Terazi	:	1Gec Avery Terazi
Vortex	:	Fisons Whirlimixer
Mikro plate okuyucu	:	Biotek Elx808

3.2. DENEYLERDE KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmamızdaki deneylerde etil alkol (C_2H_5OH -Merck 100971), L-tirozin (Fluka 93829), tirozinaz (Sigma, T3824), L-askorbik asid (Merck100127), kuersetindihidrat (Aldrich 33795-1), gallik asit (Merck 842649), benzoik asid (Merck 17252), kojik asit (Fluka 60890), potasyum dihidrojen fosfat ($H_2KO_4P^-$ Merck 104873), disodyum hidrojen fosfat anhidrit ($HNa_2O_4P^-$ Merck 106586) ve sodyum klorür ($NaCl$, 106404) kullanıldı.

3.3. ENZİM İNHİBİSYONU TAYİNİNDE KULLANILAN BİTKİ MATERYALLERİ

Aktarlardan veya pazarlardan alınan bitkiler öncelikle yıkandı, distile sudan geçirildi ve gölgede kurutuldu. Kurutulan bitkilerin meyvelerinden sulu ve etil alkollü ekstraler hazırlandı.

Tablo 3.3.1.Enzim inhibisyonu tayininde kullanılan bitki materyeli

Bitki Materyalinin Türkçe Adı	Latince Adı
Ananas	<i>Ananas comosus</i>
Ayva	<i>Cydonia oblonga</i>
Beyaz dut	<i>Morus alba L.</i>
Elma	<i>Malus domestica</i>
Greyfurt	<i>Citrus paradise</i>
Havuç	<i>Daucus carota</i>
Karadut	<i>Morus nigra</i>
Kayısı	<i>Prunus armeniaca</i>
Kiraz	<i>Prunus avium</i>
Kivi	<i>Actinidia deliciosa</i>
Mantar	<i>Agaricus bisporus</i>
Muşmula	<i>Mespilus germanica L.</i>
Nar	<i>Punica granatum</i>
Patlıcan	<i>Solanum melongena</i>
Sarımsak	<i>Allium sativum</i>
Yeşil Biber	<i>Capsicum annum</i>

3.3.1. Sulu Ekstrenin Hazırlanması

30 g bitki balona konularak üzerine 300 ml distile su ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğuduktan sonra süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü önceden darası alınan balona konuldu. Balon rota evaporatöre

yerleştirilerek karışımın suyu düşük basınç altında uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre miktarları tartılarak kaydedildi.

3.3.2. Etil Alkollü Ekstrenin Hazırlanması

25g bitki Sokslet cihazının kartuşuna konuldu. Kartuş sokslet sistemine yerleştirilerek cihazın balonuna 100 mL % 96' lık etil alkol ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğutuldu. Süzüntü önceden darası alınan balona konuldu. Balon rota evaporatöre yerleştirilerek düşük basınç altında etil alkol karışımından uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstre miktarları tartılarak kaydedildi.

3.3.3. Enzim İnhibisyonu Tayinlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.3.3.1 de yer alan çeşitli kimyasal maddelerin enzim inhibisyonu üzerine etkileri incelendi.

Tablo 3.3.3.1. Enzim inhibisyonunda kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal maddenin adı
L-Askorbik asit
Benzoik asit
Gallik asit
Kuarsetin
Kojik asit
Sodyum klorür

3.4. TİROZİNAZ ENZİMİNİN İNHİBİTÖR ETKİSİNİN ÖLÇÜLMESİ

Tirozinaz inhibitör etkisi Vanni ve arkadaşlarının yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edildi (Vanni ve diğ., 1990). Çalışmamızda seçilen bitkilerin sulu ve etil alkollü ekstrelerinden çeşitli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı.

40 U Tirozinaz içeren çözülden 10 µL alındı, üzerine 20 µL 1.5 mM L-tirozin içeren çözülden ilave edildi. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraları ve kimyasal madde çözümlerinden 10 µL alındı. Üzerine 110 µL 0.1 M sodyum fosfat (pH 6.5) tampon çözümü ilave edildi. 10 dakika 37°C de inkübe edildi. Kontrol çözümü olarak bitki ekstresi yerine distile su alındı. Örnek ve kontrol çözümlerinin Elisa mikropate okuyucuda 490 nm de köre karşı absorpsan değeri okundu. Köre olarak pH 6.5 olan 0.1 M sodyum fosfat tamponu çözümü kullanıldı.

Tirozinaz enzimi % inhibisyon değeri;

$$\% \text{ inhibisyon} = [(\Delta A_{490} \text{ kontrol} - \Delta A_{490} \text{ örnek}) / \Delta A_{490} \text{ kontrol}] \times 100$$

formülü yardımı ile hesaplandı.

Tirozinaz enziminin IC₅₀ değeri (Enzimin % 50 inhibisyon etkisi göstermesi için gerekli olan madde miktarı) absise madde miktarı, ordinata % enzim inhibisyon verilerinin uygulaması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada çeşitli hastalıkların tedavisinde ve kozmetik endüstrisinde kullanılan bitkilerin ve kimyasal maddelerinin tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Enzim kaynağı olarak saf tirozinaz preparatları kullanıldı.

4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN TİROZİNAZ İNHİBİTÖRÜ ETKİSİ

Ananas, ayva, beyaz dut, elma, biber, greyfurt, kiraz, havuç, karadut, kiraz, kivi, mantar, muşmula, patlıcan, nar ve sarmısağın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sulu ve etil alkollü ekstraları için hesaplanan inhibisyon değerleri yardımıyla çizilen grafiklerden elde edilen % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri Tablo 4.1.1 ve Tablo 4.1.2 de verildi.

Tablo 4.1.1. Çeşitli bitkilerden hazırlanan sulu ekstraların tirozinaz % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri

Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Ananas	0.1	62.28 ± 15.49	2.27
	1	42.89 ± 23.94	
	5	39.73 ± 14.87	
	10	24.16 ± 9.31	
Ayva	0.1	11.55 ± 2,04	14.86
	1	18.57 ± 1.75	
	5	27.38 ± 3.07	
	10	37.37 ± 5.32	
Beyaz Dut	0.1	9.96 ± 2.34	22.60
	1	16.82 ± 1.85	
	5	21.36 ± 1.71	
	10	28.57 ± 2.43	
Biber	0.1	55.78 ± 4.21	3.11
	1	51.16 ± 7.00	
	5	45.73 ± 7.01	
	10	43.02 ± 8.47	

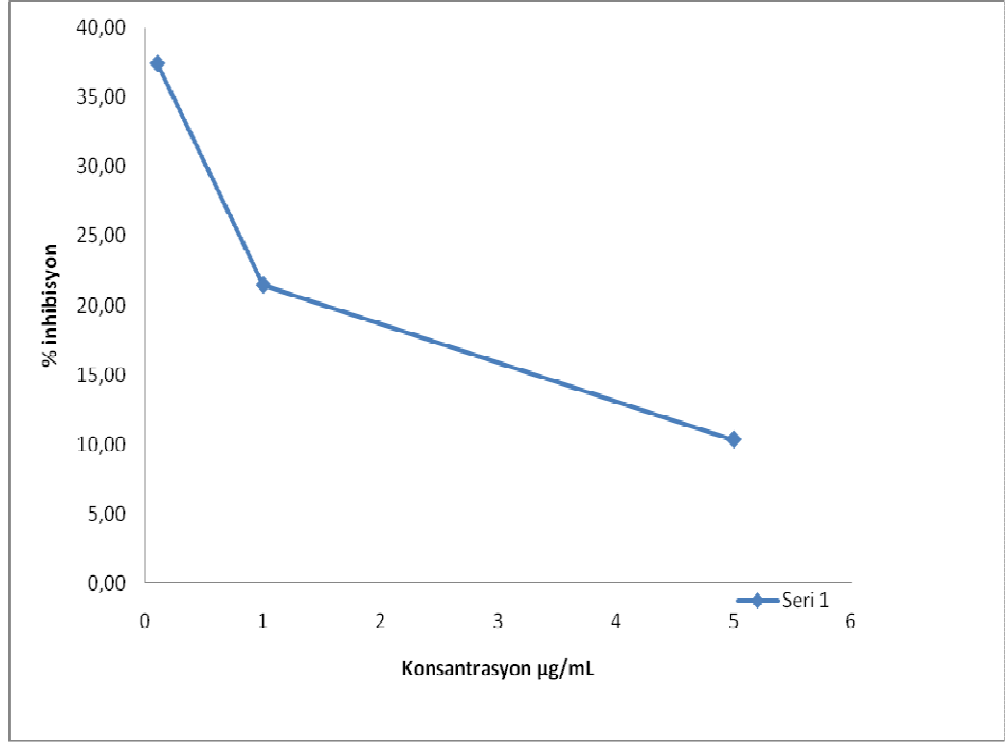
Elma	0.1	57.68 ± 12.04	0.78
	1	38.84 ± 4.49	
	5	19.43 ± 1.69	
	10	10.63 ± 1.04	
Greyfurt	0.1	38.56 ± 2.67	0.08
	1	24.89 ± 2.25	
	5	18.87 ± 1.56	
	10	11.79 ± 4.58	
Havu	0.1	51.18 ± 1.76	0.47
	1	48.18 ± 3.49	
	5	44.20 ± 3.80	
	10	36.30 ± 4.40	
Karadut	0.1	37.48 ± 9.48	0.075
	1	21.48 ± 5.83	
	5	10.33 ± 4.42	
Kayısı	0.1	38.73 ± 1.60	2.66
	1	45.54 ± 3.47	
	5	59.52 ± 1.18	
	10	76.24 ± 4.06	
Kiraz	0.1	42.07 ± 5.71	0.08
	1	33.24 ± 9.94	
	5	27.78 ± 8.12	
	10	24.3 ± 11.12	
Kivi	0.1	61.28 ± 11.60	4.28
	1	54.66 ± 11.83	
	5	45.95 ± 11.65	
	10	40.15 ± 11.01	
Mantar	0.1	17.09 ± 3.51	18.5
	1	20.86 ± 3.86	
	5	29.68 ± 7.40	
	10	34.30 ± 5.45	
Muşmula	0.1	29.82 ± 3.66	4.9
	1	41.75 ± 1.61	
	5	52.87 ± 7.21	
	7.5	58.81 ± 8.87	
	10	63.84 ± 2.88	

Nar	0.1	18.95 ± 7.35	10.56
	1	26.56 ± 8.26	
	5	37.12 ± 3.85	
	10	47.30 ± 8.98	
Patlıcan	0.1	25.79 ± 5.58	33.70
	1	26.67 ± 6.38	
	5	28.80 ± 6.02	
	10	33.13 ± 6.04	
Sarımsak	0.1	51.19 ± 7.78	0.88
	1	44.05 ± 7.35	
	5	16.67 ± 5.45	
	10	9.52 ± 4.12	

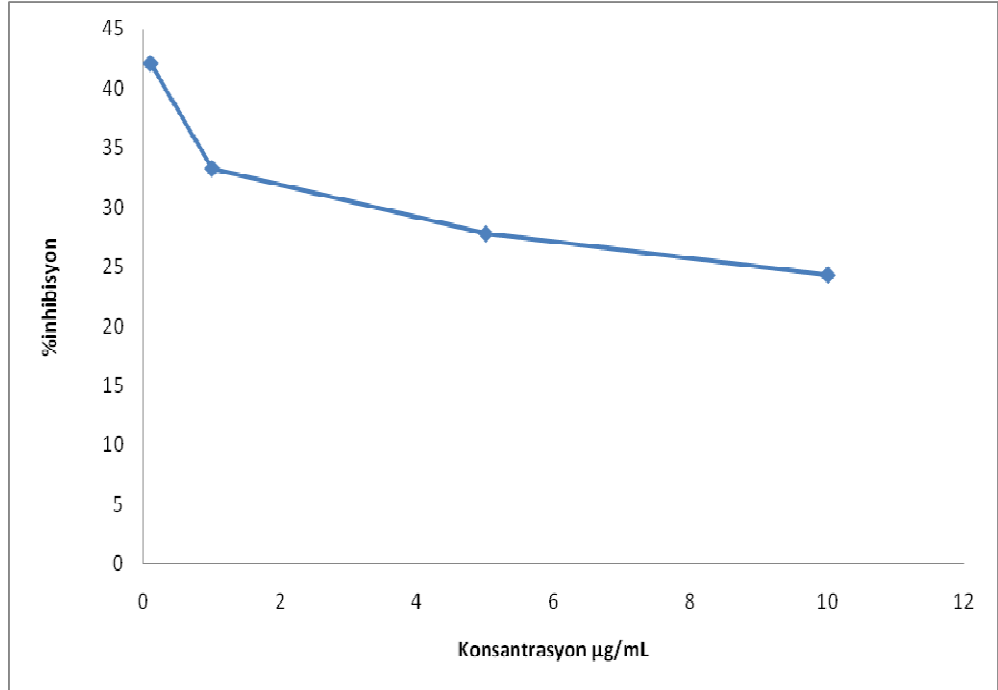
Tablo 4.1.1 e göre;

- a. Sulu bitki ekstralarının 0.1 µg/mL konsantrasyonda % inhibisyon değerlerinin en yüksek değerden başlayarak sırası ile; % 62.28 ananas, % 61.28 kivi, % 57.68 elma, % 55.78 biber, % 51.19 sarımsak, % 51.18 havuç, % 42.07 kiraz, % 38.73 kayısı, % 38.56 greyfurt, % 37.48 karadut, % 29.82 muşmula, % 25.79 patlıcan, % 18.95 nar, % 17.09 mantar ve % 11.55 ayva olduğu bulundu.
- b. Bitkiler içinde IC₅₀ değerinin en düşük olması nedeniyle, sulu ekstralar arasında en yüksek oranda tirozinazı inhibe eden ekstrenin karadut ekstresi (IC₅₀ 0.075) olduğu bulundu. (Şekil 4.1.1.1) Karadutu takiben kiraz (IC₅₀ 0.08) ve greyfurt (IC₅₀ 0.08) sulu ekstralarının IC₅₀ değerlerinin düşük olması nedeniyle inhibitor etkisinin olduğu tespit edildi (Tablo 4.1.1).
- c. En düşük IC₅₀ değerinden başlayarak yapılan sıralama; karadut, kiraz, greyfurt, havuç, elma, sarımsak, ananas, kayısı, biber, kivi, muşmula, nar, ayva, mantar, beyazdut, patlıcan olarak gösterilebilir.

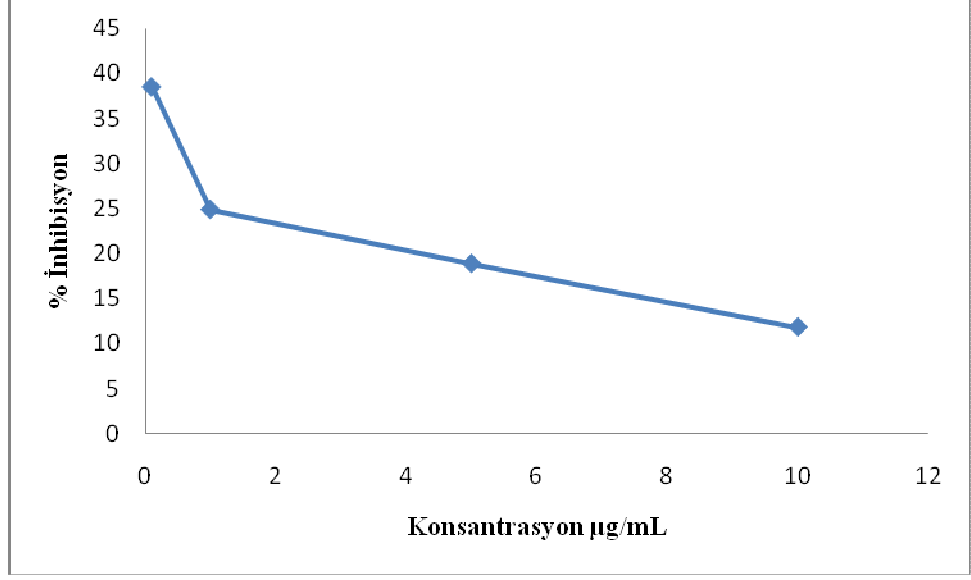
IC₅₀ değerleri ve % inhibisyon değerleri en düşük olan bitkilerin grafikleri gösterildi.



Şekil 4.1.1. Karadutun sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği



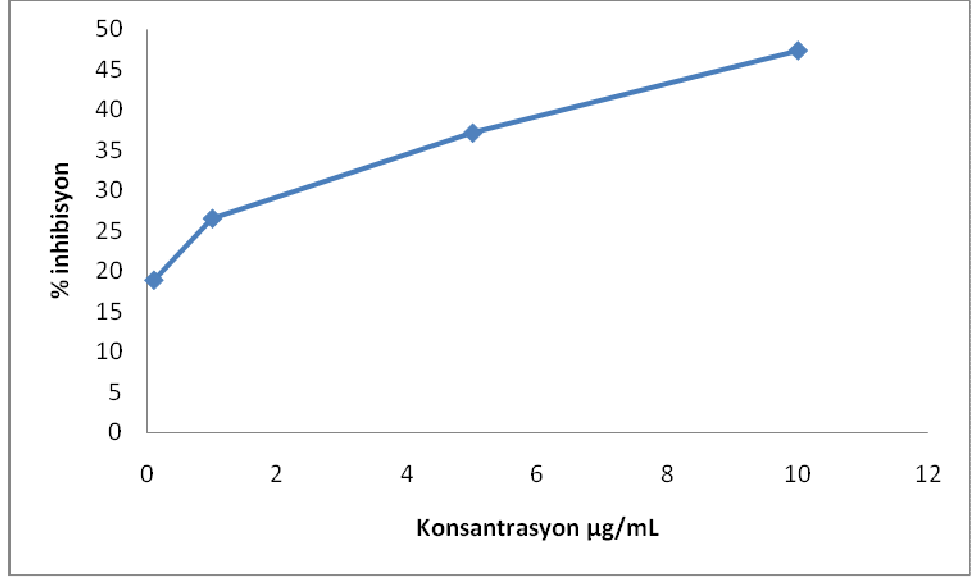
Şekil 4.1.2. Kirazın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği



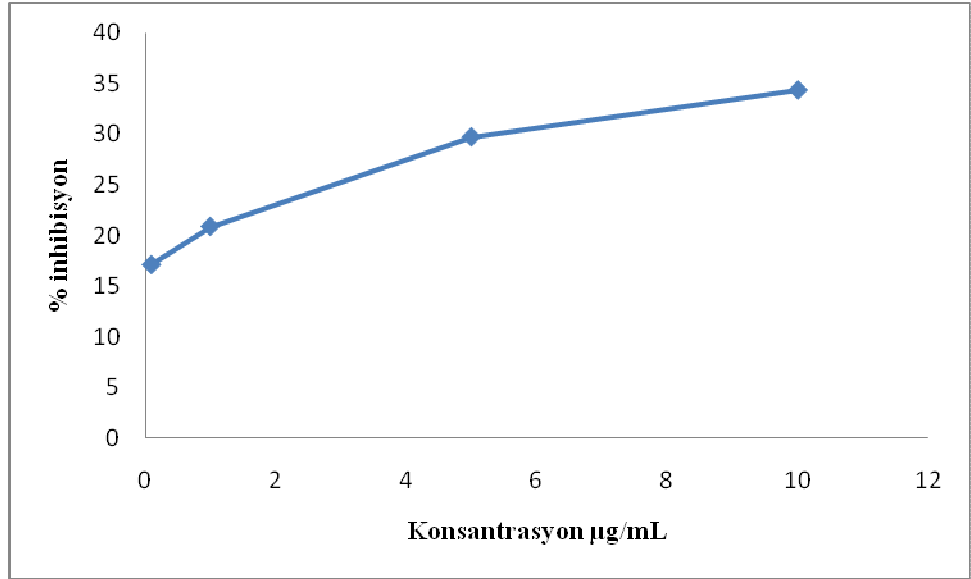
Şekil 4.1.3. Greyfurtun sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.4. Ayvanın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.5. Narın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.6. Mantarın sulu ekstresinin % inhibisyon grafiği

Tablo 4.1.2. Çeşitli bitkilerden hazırlanan etil alkollü ekstraların tirozinaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri

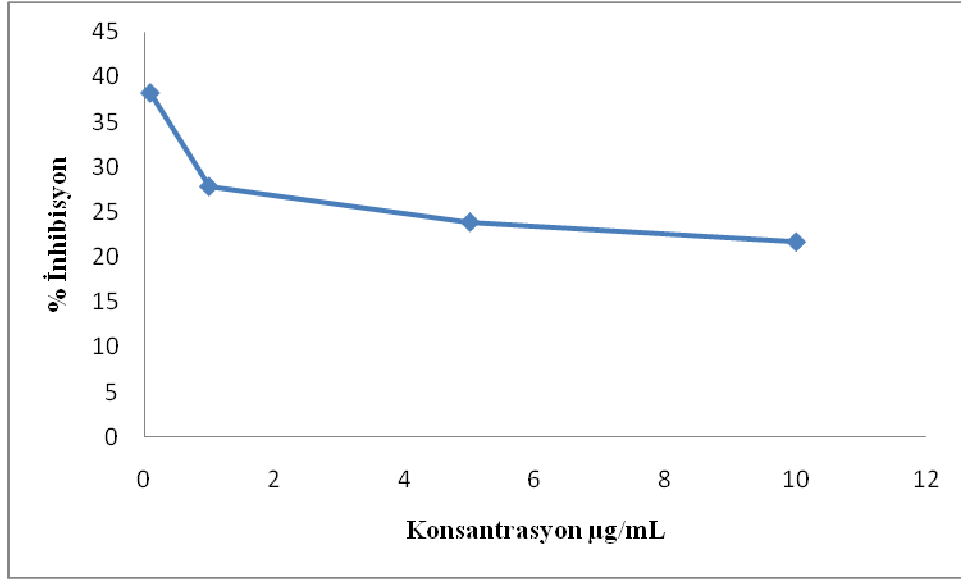
Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Ananas	0.1	13.65 ± 1.66	6.80
	1	25.83 ± 7.67	
	5	45.97 ± 11.63	
	10	62.59 ± 5.06	
Ayva	0.1	23.24 ± 5.68	10.77
	1	29.31 ± 9.07	
	5	38.70 ± 14.97	
	10	47.17 ± 5.38	
Beyaz Dut	0.05	14.42 ± 8.33	4.83
	0.1	32.20 ± 4.87	
	1	43.38 ± 3.98	
	5	48.59 ± 6.68	
Biber	0.1	9.55 ± 0.74	11.21
	1	13.44 ± 1.92	
	5	33.37 ± 17.99	
	10	43.36 ± 14.10	
Elma	0.1	8.23 ± 1.54	22.65
	1	17.00 ± 9.46	
	5	21.35 ± 12.28	
	10	27.80 ± 12.38	
Greyfurt	0.1	8.63 ± 3.82	16.24
	1	15.65 ± 3.15	
	5	25.50 ± 1.17	
	10	33.83 ± 9.57	
Havuç	0.1	55.19 ± 0.70	0.607
	1	46.32 ± 1.26	
	5	36.03 ± 2.91	
	10	28.00 ± 6.01	
Karadut	0.1	48.81 ± 6.68	0.098
	1	36.78 ± 3.58	
	5	28.62 ± 5.14	
	10	23.15 ± 1.17	
Kayısı	0.1	53.79 ± 6.56	1.00
	1	46.45 ± 6.52	
	5	41.07 ± 8.72	
	10	15.67 ± 5.36	

Kiraz	0.1	31.91 ± 11.58	9.65
	1	42.98 ± 4.33	
	5	38.45 ± 1.97	
	10	52.16 ± 7.82	
Kivi	0.1	65.88 ± 2.23	4.74
	1	55.83 ± 6.70	
	5	43.77 ± 2.13	
Mantar	0.1	44.01 ± 7.28	3.10
	1	47.57 ± 5.85	
	5	54.73 ± 4.44	
	10	59.15 ± 6.47	
Muşmula	25	39.68 ± 14.66	19.84
	75	23.00 ± 11.95	
	100	12.61 ± 3.24	
Nar	0.1	56.91 ± 1.67	0.90
	1	47.63 ± 9.30	
	5	29.81 ± 10.03	
	10	16.05 ± 4.66	
Patlıcan	0.1	17.15 ± 15.16	11.67
	1	19.49 ± 14.68	
	5	28.67 ± 18.47	
	10	37.42 ± 19.95	
Sarımsak	0.1	38.16 ± 1.31	0.076
	1	27.82 ± 0.50	
	5	23.89 ± 3.23	
	10	21.70 ± 1.70	

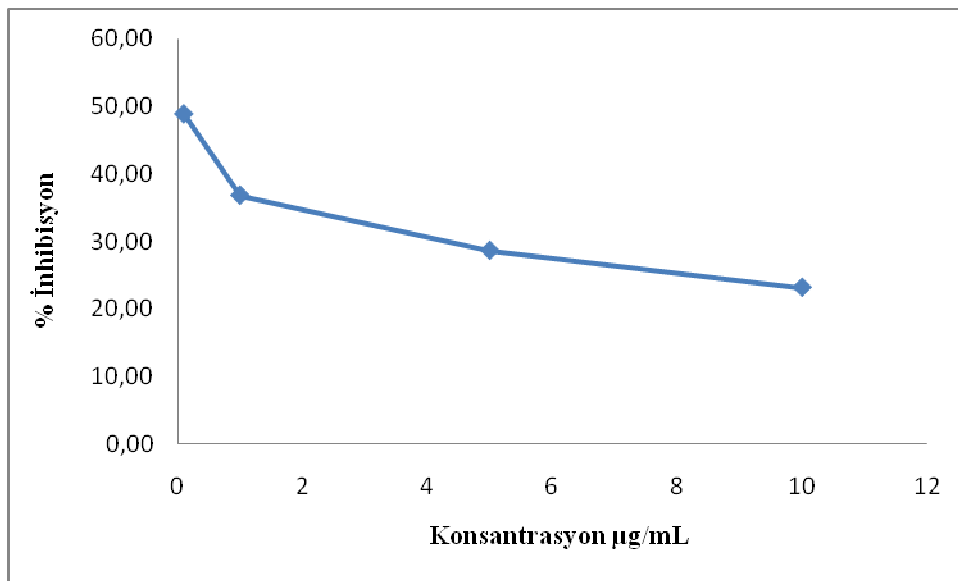
- a. Alkollü bitki ekstralarının 0.1 µg/mL konsantrasyonda % inhibisyondan değerlerinin en yüksek değerden başlayarak sırası ile; % 65.88 kivi, % 56.91 nar, % 55.19 havuç, % 53.79 kayısı, % 48.81 karadut, %44.01 mantar, % 39.68 muşmula, % 38.16 sarımsak, % 32.20 beyaz dut, % 31.91 kiraz, % 23.24 ayva, % 17.15 patlıcan, % 13.65 ananas, % 9.55 biber, % 8.63 greyfurt ve % 8.23 elma olduğu bulundu. (Tablo 4.1.2)
- b. Bitkiler içinde IC₅₀ değerinin en düşük olması nedeniyle, etil alkollü ekstraller arasında en yüksek oranda tirozinazı inhibe eden ekstranın sarımsak etil alkollü

ekstresi olduğu bulundu (Tablo 4.1.2). Sarımsağı takiben havuç ve karadut alkollü ekstrelerinin IC₅₀ değerlerinin düşük olduğu saptandı.

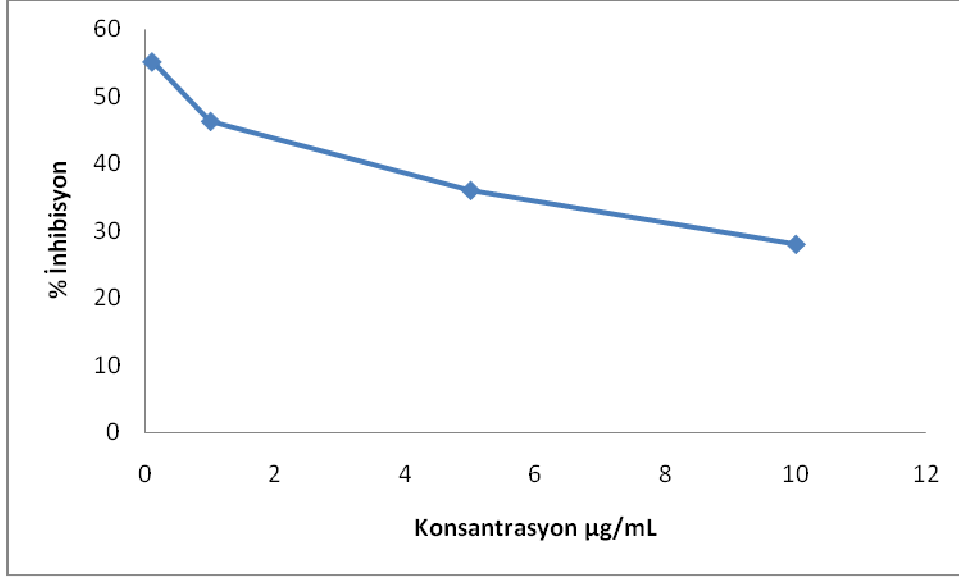
- c. IC₅₀ değerine göre en yüksek tirozinaz inhibisyonunun sırasıyla; sarımsak, karadut, havuç, nar, kayısı, mantar, kivi, beyaz dut, ananas, kiraz, ayva, biber, patlıcan, greyfurt, muşmula, elma olduğu saptandı (Tablo 4.1.2).



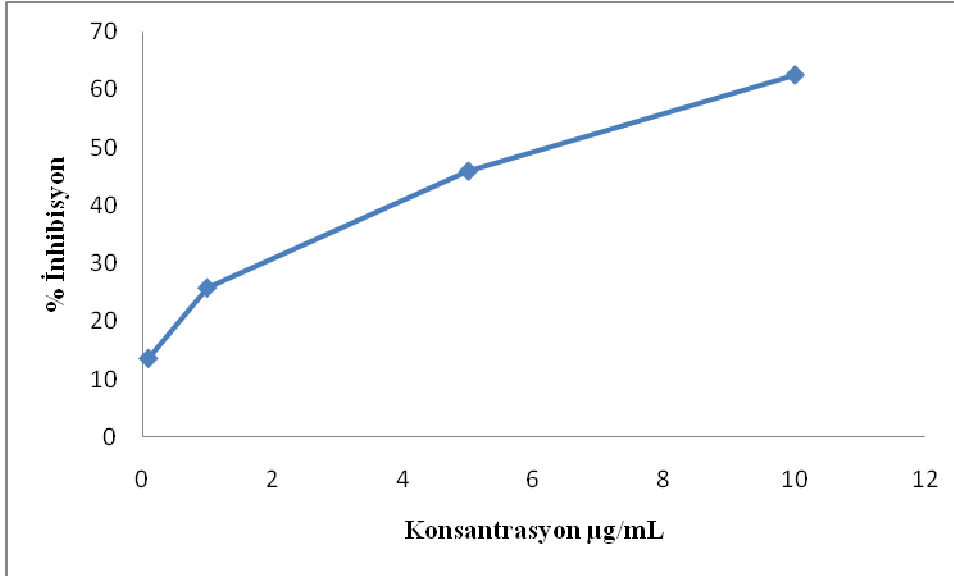
Şekil 4.1.7. Sarımsağın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği



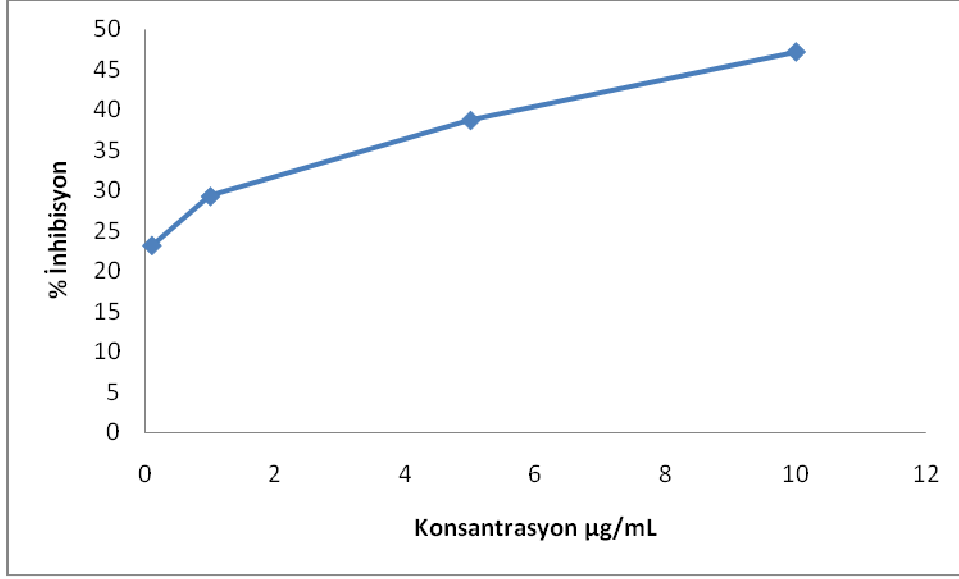
Şekil 4.1.8. Karadutun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği



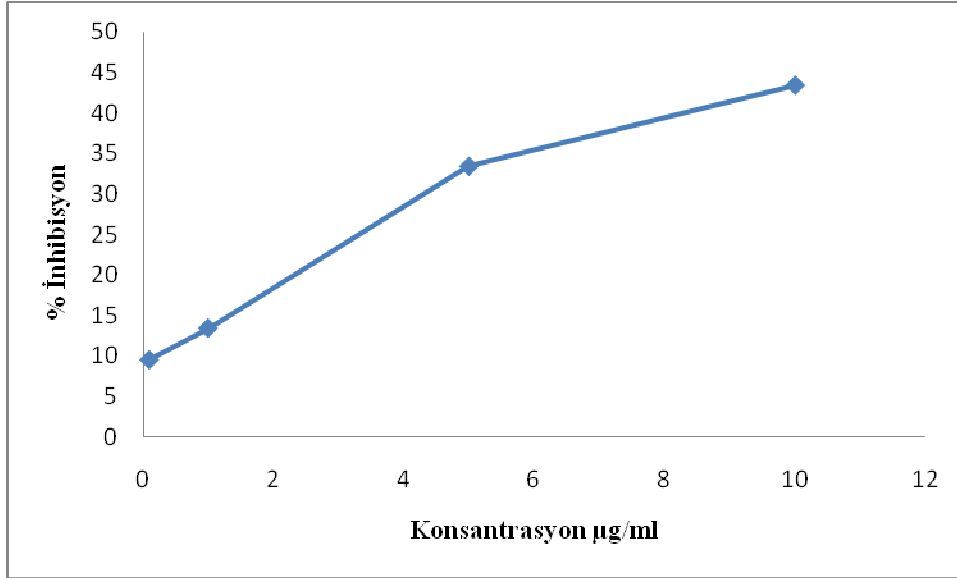
Şekil 4.1.9. Havucun etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.10. Ananasın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.11. Ayvanın etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.1.12. Biberin etil alkollü ekstresinin % inhibisyon grafiği

4.2. KİMYASAL MADDELERİN TİROZİNAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİ

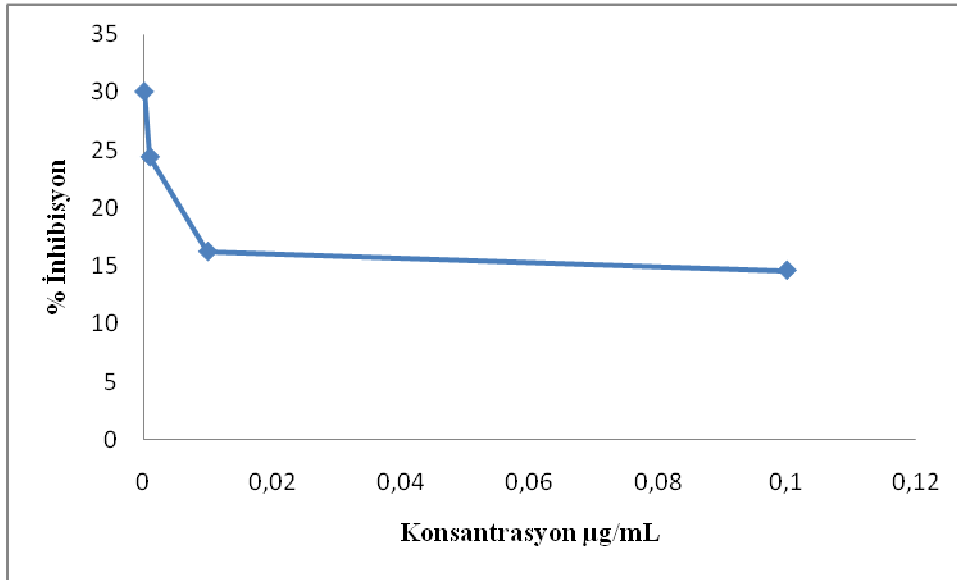
Çalışmamızda askorbik asit, gallik asit, benzoik asit, kuarsetin, kojik asit ve sodyum klorür gibi kimyasal maddelerin tirozinaz inhibitörü etkileri (Tablo 4.2.1) verildi.

Tablo 4.2.1 Çeşitli kimyasal maddelerin tirozinaz enzimi üzerindeki % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri

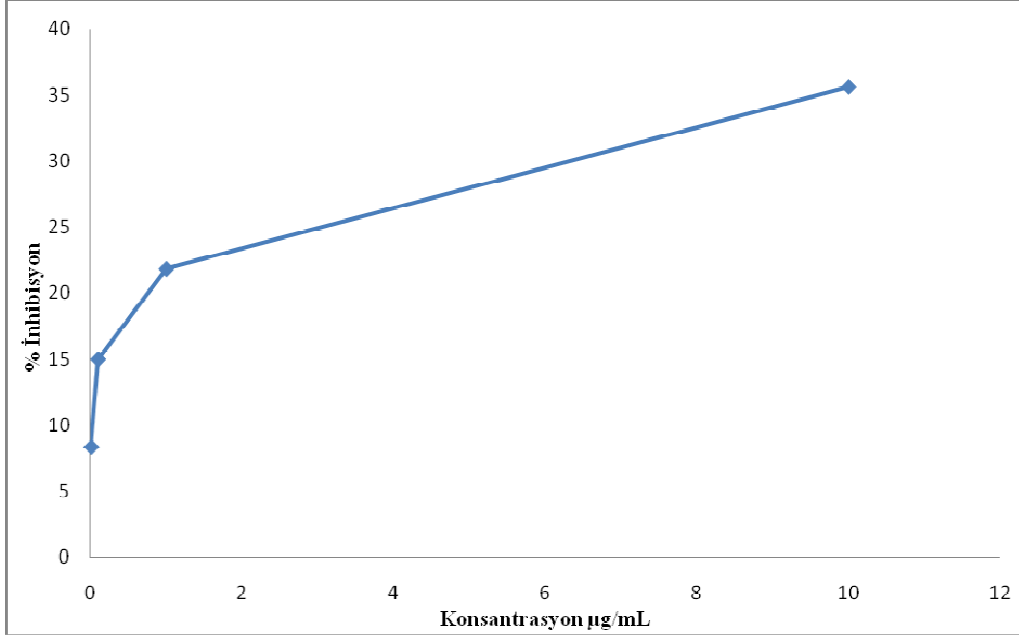
Madde Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon	IC ₅₀ Değeri (µg/mL)
Askorbik Asit	0.01	9.66 ± 4.79	15.31
	0.1	13.34 ± 5.10	
	1	23.51 ± 5.66	
	10	37.00 ± 10.20	
Benzoik Asit	0.001	12.22 ± 4.11	25.64
	0.01	16.84 ± 4.44	
	0.1	21.16 ± 2.62	
	1	25.20 ± 1.94	
	10	30.12 ± 0.48	
Gallik Asit	0.01	70.75 ± 6.07	0.063
	0.1	31.64 ± 2.99	
	1	26.08 ± 2.51	
	10	14.50 ± 4.74	
Kojik Asit	0.001	13.56 ± 6.82	28.88
	0.01	18.91 ± 4.45	
	0.1	23.83 ± 5.47	
	1	27.35 ± 3.90	
	10	30.08 ± 5.28	
Kuarsetin	0.01	8.36 ± 1.88	16.25
	0.1	14.99 ± 1.48	
	1	21.83 ± 2.46	
	10	35.62 ± 1.66	
Sodyum Klorür	0.0001	30.11 ± 3.52	0.0005
	0.001	24.45 ± 2.88	
	0.01	16.24 ± 0.92	
	0.1	14.61 ± 0.28	

Tablo 4.2.1.'e göre, çalışmamızda 0.01 µg/mL konsantrasyonunda tirozinazı inhibe eden maddenin gallik asit (% 70.75) olduğu, bunu kojik asit (% 18.91) ve benzoik asidin (% 16.84) takip ettiği görüldü.

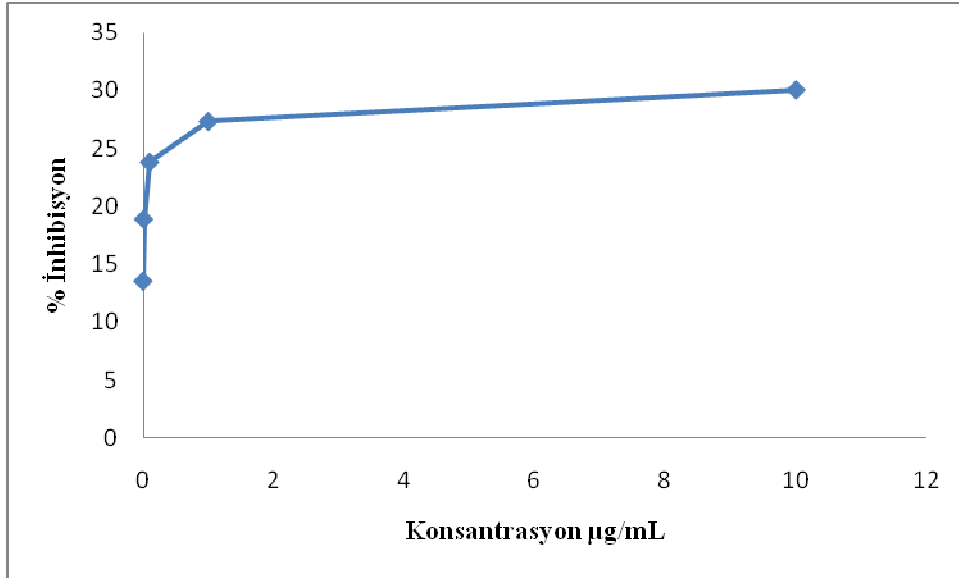
IC₅₀ değerleri en düşük olan maddenin enzimi en yüksek oranda inhibe etmesine göre en düşük IC₅₀ değerine sahip olan maddenin sodyum klorür (0.005 µg/mL) olduğu bulundu. Bunu 0.063 µg/mL oranı ile gallik asit, askorbik asit (% 15.31) ve kuarsetin (% 16.25) takip etti. (Tablo 4.2.1)



Şekil 4.2.1. Sodyum klorür % inhibisyon grafiği



Şekil 4.2.2. Kuarsetinin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.2.3. Kojik asit % inhibisyon grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerden elde edilen besinlerin ve içeceklerin kahverengileşmesi fenollerin tirozinaz tarafından enzimatik oksidasyonu ile meydana gelir. Bu da esansiyel amino asitlerin yıkılmasına, sindirilebilirliklerinin ve besin kalitesinin azalmasına ve toksik bileşiklerin oluşmasına neden olur. Bu istenmeyen kahverengileşme reaksiyonları büyük bir sorundur ve etkili tirozinaz inhibitörlerinin araştırılması gerekmektedir. Melanin deri fotokarsinogenezine karşı önemli koruyucu rol oynamaktadır. Ancak anormal melanin pigmenti üretimi insanlarda hem estetik hemde tıbbi bir problemdir (Priestley, 1993). Bununla birlikte tirozinaz inhibitörleri melanin hiperpigmentasyonu ile ilgili bazı hastalıkların tedavisi için klinik olarak kullanılır ve ayrıca deri beyazlatılması etkileri için de kozmetik ürünlerde ve eczacılıkta önemlidir (Maeda ve Fukuda, 1991). Buna rağmen, sadece birkaç tirozinaz inhibitörü ticari olarak kullanılabilir. Bunun sebebi hücreler arası yüksek toksiteleri ve düşük kararlılıkları sınırlı uygulamalarında kaygıya neden olmalarıdır.

Doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerin miktarı gün geçtikçe artmaktadır. Bunlar deriyi eksojen ve endojen zararlı ajanlara karşı koruyabilir ve çeşitli cilt problemlerinin giderilmesine yardım ederler. Potansiyel kullanımları için besin kalitesini arttırmada ve insanlarda pigmentasyon bozukluklarını engellemede bu çalışmalar önemli olup yeni tirozinaz inhibitörlerinin araştırılması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Parvez, S. ve diğ, 2007).

Depigmentasyon ajanları kolay bulunabilirliklerinden ve geniş klinik sonuçlarından dolayı kapsamlı araştırmalara konu olmaya devam etmektedir. Daha iyi depigmente edici ajanları tespit etmek için son otuz yıldır aktif olarak yeni çalışmalar yapılmaktadır. Bu hedefe ulaşmak için doğa elde edilebilecek farklı türde bileşiklerin yapısı incelenmektedir (Parvez, S. ve diğ, 2007).

Tirozinazın diğeri bir önemli klinik uygulaması enzimin bu hastalığın bir markırı olarak hareket etmesinden dolayı vitiligo tedavisindeki rolüdür. Hayvan deneyleri üzerinde birçok çalışma yürütülmüştür ama insanlarda vitiligoyu tedavi etmek için hala birçok araştırmanın yapılması gerekmektedir. Buna rağmen, tirozinaz inhibitörleri üzerinde onların yapısını ve aktivitelerini doğrulamak ve çeşitli uygulamalardaki güvenilirliklerini ve etkilerini arttırmak için sayısız araştırma gerekmektedir (Parvez, S. ve diğ., 2007).

Son yıllarda bitkilerde bulunan çeşitli biyolojik aktif bileşenlerden dolayı hastalık önlenmesi ve tedavisinde bitkisel kaynaklı ilaçların önemi artmıştır. Sentetik antioksidanların ateroskleroz ve kanser gibi hastalıklarla ilişkili olabileceğinden dolayı doğal kaynaklı antioksidan maddelere olan talep artmıştır. Kozmetik, gıda ve pestisit endüstrisinde tirozinaz enzimi önemli bir enzimdir. Kozmetik ürünlerinde deri beyazlatıcı olarak ve gıda endüstrisinde kararmayı önlemek amacı ile tirozinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu endüstride kullanılan kimyasal maddelerin toksik olmaları nedeni ile bu kimyasallar yerine doğal kaynaklı bitki ekstrallerinden yararlanmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Çalışmamızda da ananas, ayva, beyaz dut, biber, elma, greyfurt, havuç, karadut, kayısı, kiraz, kivi, mantar, muşmula, nar, patlıcan ve sarımsak bitkilerinin sulu ve etil alkollü ekstralleri hazırlanmıştır ve tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışılan bitkiler içinde enzimi en yüksek oranda inhibe edenin kiraz, greyfurt, karadut, sarımsak ve havuç olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda sulu ve etil alkollü ekstrallerin IC_{50} değerlerine bakıldığında sulu ekstrallerinde IC_{50} değerlerinin bazı meyva ve sebzelerde daha düşük oranda çıktığı görülmüştür. Bunun nedeninin tirozinaz inhibitörü olan askorbik asit gibi suda çözünen maddelerin sulu ekstrallerde daha yüksek oranda bulunması nedeni ile olabilir. Askorbik asit içeriği fazla olan meyvalarda, ürünler kesilip uzun süre bekletildiği zaman üründe kararmalar meydana gelmez. Kararmaların meydana gelmemesinin nedeni turuncgillerin içinde yüksek konsantrasyonda askorbik asit olması nedeniyledir.

Bazı fenolik bileşenler antioksidan aktiviteye sahiptirler (Manach ve diğ., 2004). Polifenolik bileşikler bitkilerde ve tıbbi literatürde bulunan fitokimyasal madde gruplarındandır. Fitopolifenoller, bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve çevreye karşı kendini koruması için önemlidir (Epstein, 2009). Bu bitkilerin yapısındaki fenolik, flavonoid gibi bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Bu bileşikler bitkilerin çiçeklerinde, yapraklarında, tohumlarında bulunurlar ve 4000 adet farklı yapıda flavonoid bu bitkilerden izole edilmiştir. Flavonoidler bitkiyi UV-radyasyonuna ve çeşitli patojenlere karşı korumaktadır (Shimizu ve diğ., 2000). Flavonoidler çeşitli sebzelerde kırmızı ve mavi renkli meyvalarda, şarapta da bulunmaktadır (Shimizu ve diğ., 2000). Çalışmamızda sulu ve alkollü ekstraktlarda en düşük IC₅₀ değerine sahip bitkilerin askorbik asit içeriği yüksek olan ve flavonoid açısından zengin olan bitkiler olduğu bulundu.

Dut yaprakları gastrointestinal hastalıklarda, cilt hastalıklarında, şeker hastalığında, hipertansiyonda, hipoglisemide kullanılan etkili bir bitkidir (Asano ve diğ., 2001). Dutun antipiretik, hipoglisemik, antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Nattapong ve Omboon, 2008). Betulinik asidin (pentasiklik triterpen) dutun yapısında bulunduğu ve antitirozinaz aktivitesine sahip olduğu Nattapong tarafından belirtilmektedir (Nattapong ve Omboon, 2008). Çalışmamızda da karadutun iyi bir tirozinaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu bulundu. Çalışmamızda dutun enzimi yüksek oranda inhibe etmesinin nedeninin bitkide bulunan fenolik, flavonoid, kuarsetin ve betulinik asit gibi bileşiklerden dolayı olduğu ileri sürülebilir.

Greyfurt yapısında C vitaminini en yüksek oranda ihtiva eden bir meyvedir ve çalışmamızda tirozinazı yüksek oranda inhibe etmiştir. Tirozinazı yüksek oranda inhibe etmesinin nedeni askorbik asidi fazla miktarda içermesi nedeniyledir.

Havuç, A vitamini açısından zengin olan bir gıda maddesidir. A vitaminin melanositlerde tirozinaz aktivitesini inhibe ettiği Deng ve arkadaşları tarafından ileri sürülmektedir (Deng ve diğ., 1997). Çalışmamızda da havuç bitkisinden hazırlanan ekstraktların iyi bir tirozinaz inhibitörü olduğu tayin edildi.

Sarımsak S'lü bileşikler açısından zengin bir gıda maddesidir. S'lü bileşiklerinde iyi bir tirozinaz inhibitörü olduğu literatürde belirtilmektedir (Chu ve diğ., 2009; Taylor ve Bush, 1986). Çalışmamızda da sarımsağın yüksek bir tirozinaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Tirozinaz inhibitör aktivitesine sahip olmasının nedeni yapısındaki S'lü bileşikler nedeniyledir.

Nar bitkisinin eski mısırdaki ve Yunanistan'da deri inflamasyonu ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Baumann, 2007). Ayrıca narın deriyi beslediği, yenilediği bildirilmektedir. Farelerde nar tohum yağının deri kanserini önlediği bildirilmektedir (Seeram ve diğ., 2005). Nar meyvesinin ekstrelerinin prostat (Malik ve diğ., 2005), göğüs, akciğer, kolon, deri kanserini önlediği de öne sürülmektedir. Narın radyasyon tarafından oluşturulan deri yaşlanması inhibe ettiği ve deriyi yaşlanmaya karşı koruduğu belirtilmektedir. Nar polifenolik bileşikler açısından zengin bir meyve olduğundan antioksidan ve antiviral özellik göstermektedir. Nar suyunun yapısında gallik asit, kojik asit, antosiyanin, kuarsetin, rutin, kafeik asit gibi çeşitli bileşiklerin bulunduğu literatürde belirtilmektedir (Adhami, 2009). Ayrıca narın yapısında bulunan ellagik asidin de tirozinaz enzimini inhibe ettiği ve deri beyazlatıcısı olarak nar ekstrelerinin faydalı olabileceği belirtilmektedir (Yoshimura ve diğ., 2005). Çalışmamızda nar ekstrelerinin de tirozinaz inhibitörü olduğu bulunmuş ve bu inhibitör etkisinin yapısındaki polifenolik bileşiklerden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Kremlere katılan kimyasalların toksik olmaları nedeni ile literatürde çeşitli bitki ekstrelerinin deri beyazlatıcısı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Nattapong ve Omboon, 2008; Sung ve diğ., 2009; Momtaz ve diğ., 2008; Arung ve diğ., 2009). Çalışmamızda en yüksek oranda tirozinazı inhibe eden ekstrelerinde kremlere deri beyazlatıcısı olarak katılabileceği düşünülebilir.

Halk arasında deri hastalıklarının tedavisinde çeşitli bitkisel droglar kullanılmaktadır (Mantle ve diğ., 2001; Reuter ve diğ., 2010; Hwang ve Lee, 2007). Meyve ve sebzeler yapılarında antioksidan bileşiklerden olan tioller, karotenoidler, askorbik asidi, flavonoid ve fenolik bileşikler içerirler (Prior, 2003 ve Heber, 2004) ve bu meyve ve

sebzelerin antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir (Yi ve diğ. 2009). Kuarsetin de bu flavonoidlerden biridir. Kuarsetin, kaemferol ve morin gibi flavonoidlerin tirozinaz inhibitörü olduğu literatürde belirtilmektedir (Tiedtke ve diğ., 2004) Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan kuarsetinin enzimi 10 µL/mL konsantrasyonunda % 35.62 oranında ve IC₅₀ değerinin 16.25 µg/mL olduğu bulundu. Kuarsetinin mantar tirozinazını inhibe ettiği Chen ve arkadaşları tarafından belirtilmiş, fakat % inhibisyon değerleri verilmemiştir (Chen ve Kubo, 2002). Bitkilerde bulunan bileşiklerden olan flavonoidlerin; enzimi inhibe etmesinin nedeni yapısında serbest bulunan hidroksil gruplarından olabilir (Chen ve Kubo, 2002). Çalışmamızda kuarsetinin IC₅₀ değerinin düşük değerlerde olmaması kuarsetinin zayıf bir inhibitör olduğunu bize göstermektedir (Kubo ve diğ., 2000). Kuarsetin yediğimiz sebze ve meyvalarda bulunan bir maddedir ve yapısında bu maddeyi yüksek oranda içeren bitkilerin kahverengileşme reaksiyonları daha az olacaktır.

Deri beyazlatma maddesi olarak arbutin, kojik asit, vitamin C ve diğer doğal maddeler kullanılır. Ancak bu doğal maddelerden olan kojik asidin hayvan deneylerinde, farelerde tümör oluşumunu arttırdığı ve duyarlı olan deride bu maddelere karşı alerjik reaksiyonların geliştiği öne sürülmektedir (Bong-Jeun ve diğ. 2005). Bu nedenle doğal kaynaklı tirozinaz inhibitörleri araştırılmaktadır. Kojik asitin tirozinazın inhibitörü olduğu Rescigno ve arkadaşları tarafından belirtilmektedir (Rescigno ve diğ. 2002). Çalışmamızda da kojik asidin tirozinazı % 30.08 oranında inhibe ettiği ve IC₅₀ değerinin 28.88 µg/mL olduğu bulunmuştur.

Fenolik asitler meyvalarda fazla miktarda bulunurlar ve bunlar benzoik asidin hidroksi türevleridirler (Macheix, ve diğ. 1990). Çalışmamızda benzoik asidin % 30.12 oranında tirozinazı inhibe ettiği ve IC₅₀ değerinin 25.64 µg/mL olduğu bulundu.

Gallatlar ve gallik asitler ve esterlerin gıda endüstrisinde katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Gallik asidin L-dopamin oksidasyonunu inhibe ettiği literatürlerde bildirilmektedir. Gallik asit ve aromatik karboksilik asitlerin türevlerini; hidroksilasyon, metilasyon ve esterifi reaksiyonlarını azaltarak enzimi inhibe

ettiği belirtilmektedir. Çalışmamızda gallik asit tirozinaz enzimini 0.01 µg/mL konsantrasyonda % 70.75 oranında inhibe ettiği saptandı.

Askorbik asidin aniden çeşitli kozmetik çalışmalarında deri yaşlanmasını önleyici olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Bissett, 2009; Kähkönen ve diğ., 1999). Ayrıca askorbik asidin tirozinaz inhibisyon (Xiaoqin ve diğ. 2009) etkisi ve antioksidan aktivitesi nedeni ile deri koruyucusu olarak kullanıldığı literatürde belirtilmektedir (Epstein, 2009).

Askorbik asit deri hasarını farelerde önlediği belirtilmektedir (Lima ve diğ., 2009). C vitamini insan derisinde bulunana en faydalı antioksidan bileşiklerdendir. Askorbik asit kollajen biyosentezi için gereklidir. Askorbik asit elastin biyosentezini inhibe eder (Farris, 2005) derinin yaşlanmasını önler. Bu nedenle C vitamini kremlere ilave edilir. Fakat hava ile kolaylıkla bozular. Çalışmamızda da askorbik asidin tirozinaz inhibitörü olduğu saptanmıştır.

C vitamini UV ışınlarıyla alınan serbest radikalleri önlediği ve deriyi güneş ışınlarına karşı koruduğu belirtilmektedir (Burke, 2007). Ayrıca in vivo ve in vitro olarak melanojenezin üzerine askorbik asit bileşenlerinin inhibitör etkisi Kameyama ve arkadaşları (1996) tarafından öne sürülmektedir (Kameyama, 1996). Çalışmamızda askorbik asidin tirozinaz enziminin 10 µg/mL için % 37 oranında inhibe ettiğini ve IC₅₀ 15.31 olduğu bulundu. Kiraz gibi meyvaların tirozinaz IC₅₀ değerlerinin düşük olması ve enzimi yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmelerinin nedeni; yapılarında askorbik asidi ve flavonoidleri fazla miktarda içermeleri nedeni ile olabilir (Xiaoqin ve diğ., 2009).

Gıda sanayinde kesildikten sonra ve zarar görme ile zamana bağlı olarak kararma meydana gelen patates gibi sebzelerin kararmalarını önlemek için sodyum klorür içinde bekletilmeleri gerekmektedir. Tuzlu suda bekletilerek kararmanın, renk bozulmasının önüne geçilmektedir. Çalışmamızda sodyum klorürün tirozinaz enzimini düşük konsantrasyonlarda yüksek oranda inhibe ettiği bulunmuştur. Bu da sodyum klorürün bilimsel olarak tirozinaz inhibitörü olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda yüksek tirozinaz inhibisyon etkisi gösteren kiraz, greyfurt, karadut, sarımsak ve havuç gibi bitkilerin deri rahatsızlıklarında bitkisel ilaç olarak kullanımının uygun olacağı ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

- ADHAMI, M. V., KHAN, N., MUKHTAR, H., 2009, Cancer chemoprevention by pomegranate: Laboratory and clinical evidence, *Nutrition and Cancer*, 61, 811-815.
- AITKEN, M.D., 1993, Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles, *The Chemical Engineering Journal*, 52, B49- B58.
- AITKEN, M. D., MASSEY, I. J., CHEN, T., HECK, P.E., 1994, Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants, *Water Research*, 28,1879- 1889.
- ALTINIŞIK, M., 2009, *Enzimler*, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk>, [Ziyaret tarihi: 9 Temmuz 2009].
- ALTUĞ, T., OVA, G., DEMİR AĞ, K., ELMACI, Y., ZORBA, M., BAHAR, B., GÜR, E., UYSAL, V., 2006, *Gıda Katkı Maddeleri*, Mete basım ve matbaacılık, ikinci baskı.
- ARNOW, L. E., 1937, The Formation of the dopa by the exposure of tyrosine solutions to ultraviolet radiation, *Journal of Biological Chemistry*, 120,151
- ARUNG, E.T., KUSUMA, I. W., CHRISTY, O. E., SHIMIZU, K., KONDO, R., 2009, Evaluation of medical plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis, *Journal of Natural Medicines*, 63, 473-480.
- ASANO, N., YAMASHITA, T., YASUDA, K., IKEDA, K., KIZU, H., KAMEDA, Y., KATO, A., NASH, J.R., SAM LEE, H., SUN RYU, K., 2001, Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba L.*) and silkworm (*Bombyx mori L.*), *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 49, 4208-4213.
- BARRETT, F. M., 1984, Wound-healing phenoloxidase in larval cuticle of *Calpodex ethulius* (Lepidoptera: Hesperidae), *Canadian Journal of Zoology*, 62, 834–838.
- BAUMANN, L. S., 2007, Less-known botanical cosmeceuticals, *Dermatologic Therapy*, 20, 330-342.
- BISSETT, D., 2009, Common cosmeceuticals, *Clinics in Dermatology*, 27, 435-445.
- BİNGÖL, G., 1977, *Vitaminler ve Enzimler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitap Serisi No: 46, Ankara.
- BHAGVAT, K. VE RICHTER, D., 1938, Animal phenolases and adrenaline, *Biochemical Journal*, 32, 1397–1406.

BOLOGNIA JL., SODI SA., OSBER MP., PAWELEK JM., 1995, Enhancement of the depigmenting effect of hydroquinone by cystamine and buthionine sulfoximine, *British Journal of Dermatology*, 133, 349-357.

BONG-JEUN, A., JAE-HOON, K., JUNG-MI, P., JIN-YOUNG, L., TAE-SOON, P., JIN-TAE, L., JUN-HO, S., CHEORUN, J., MYUNG-WOO, B., 2005, Inhibition of enzyme activities and the antiwrinkle effect of polyphenol isolated from the persimmon leaf (*Diospyros kaki folium*) on human skin, *Dermatologic Surgery*, 31, 848 – 855.

BOYLE J., KENNEDY CT., 1986, Hydroquinone concentrations in skin lightening creams, *British Journal of Dermatology*, 114, 501-504.

BROMS, B., 1964, The lateral resistance of piles in cohesionless soil, *Journal of Soil Mechanics and Foundation Division ASCE*, 90, No.SM2.

BURKE, K.E., 2007, Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals, *Dermatologic Therapy*, 20, 314-321.

CAN, A., AKEV, N., 2008, *Eczacılık Fakültesi Öğrencileri İçin Biyokimya Dersleri*, İstanbul Üniversitesi Basım Ve Yayınevi- İstanbul, 51-57

CEMEROĞLU, B., YEMENCİOĞLU, A., ÖZKAN, M., 2001, *Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi* Cilt No:24, Gıda Teknolojisi Yayınları- Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 138.

CHEN, J. S., WEI C. I., MARSHALL, M. R., 1991, Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1897–1901.

CHEN O., KUBO I., 2002, Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4108-4112.

CHU, H.L., WANG, B.S., DUH, P.D., 2008, Effects of selected organo-sulfur compounds on melanin formation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7072–7077.

COOKSEY, C. J., GARRATT P, J., LAND, E. J., PAVEL, S., RAMSDEN, C. A., RILEY, P. A. et al., 1997, Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26226–26235.

ÇİÇEK, H., 2000, *Beyaz- çürükçül fungus kültürlerinde tirozinaz enziminin sentezinin taranması ve optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-6-7.

DARR, D., COMBS, S., DUNSTEN, S., et. al., 1992, Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage, *Brazilian Journal of Dermatology*, 127, 247-253.

DAWLEY, R. M., FLORKEY, W.H., 1993, Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl resorcinol, a tyrosinase inhibitor, *Phytochemistry* 33, 281-284.

DE, A., MANDAL, S., MUKHERJEE, R., 2008, Modeling tyrosinase activity. Effect of ligand topology on aromatic ring hydroxylation: An overview, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 1170-1189.

DECAREAU RV., 1985, *Microwaves in the Food Processing Industry*, Academic Press: London.

DECEVE, C., RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N., FENOLL, LG., TUDELA, J., CATALA, J.M., DE LOS REYES, E., GARCIA-CANOVAS, F., 1999, Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4506-4511.

DENG, J., YE, Q.Y., DIAO, Q.C., et al, 1997, Effects of arotinnoid ethylester on UVB-induced melanogenesis of cultured human normal melanocytes, *Chinese Journal of Dermatology*, 30, 389-391.

EPSTEIN, HOWARD., 2009, Cosmeceuticals and polyphenols,, *Clinics in Dermatology*, 27, 475-478.

EPSIN, J. C., MORALES, M., VARON, R., TUDELA, J., CANOVAS, F.G., 1995, Monophenolase activity of polyphenol oxidase from verdedoncella apple, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2807-2812.

FARRIS, PK., 2005, Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions, *Dermatologic Surgery*, 31, 814-818.

FINDLAY GH., 1982, Ochronosis following skin bleaching with hydroquinone, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 6, 1092-1093.

FRANK, E., 1995, *Treatment of melasma with depigmenting agents. In: Melasma: new approaches to treatment*, Martin Dunitz, London, 9-15.

FRIEDMAN, M., 1996, Food browning and its prevention: an overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.

GARCIA A., FULTON JE. JR.,1996, The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic for the treatment of melasma and related conditions, *Dermatologic Surgery*, 22, 443-447.

GARCIA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-CARMONA, F., VERA-SÁNCHEZ, J., IBORRA-PASTOR, J. L., LOZANO-TERUEL, J. A. ,1982, The role of pH in the melanin biosynthesis pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 257, 8738-8744.

GÜNAY, A., ABAK, KOÇYİĞİT, A.E., Mart 1992, *Mantar yetiştirme 4.Cilt*, Sayfa 7-10, Kitap Yayın Evi-Ankara.

GÜNENDİ, G., 1996 “Polifenoloksidaz enziminin mantardan (*Agaricus bisporus*) izole edilmesi ve mikroenkapsilasyon tekniği ile immobilize edilerek özelliklerinin araştırılması” Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

HEBER, D., 2004, Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases, *Journal of Postgraduate Medicine*, 50, 145-9.

HSIUNG, Y., CHEN, Y., 1997, Simplified method for analyzing laterally loaded single piles in clays, *Journal of Geotechnical and Geoenvironment Engineering*, 123, 11.

HWANG, J.H., LEE, B.M., 2007, Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase L-DOPA oxidation, and melanin synthesis, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 70, 393-407.

KALKA, K., MUKHTAR, H., TUROWSKI-WANKE A., MERK H., 2000, Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13, 143-149.

KAMEYAMA, K., SAKAI, C., KONDOH, S., YONEMOTO K, NISHIYAMA S, TAGAWA M, MURATA T, OHNUMA T, QUIGLEY J, DORSKY A, BUCKS D, BLANOCK K., 1996, Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis in vitro and in vivo, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34, 29-33.

KARAM , J., NICEL, J.A., 1997, Potential applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69, 141 – 153.

KASAI, K., YOSHIMURA, M., KOGA, T., ARII, M., KAWASAKI, S., 2006, Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranete extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 383-388.

KHAZAELI, P., GOLDOOZIAN, R., SHARIFIFAR, F., 2009, An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals, *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 375-381.

KLIBANOV, A. M., TU, T. M., SCOTT, K. P., 1983, Peroxidase catalysed removal of phenols from coal conversion wastewater, *Science*, 221, 259- 261.

KIM J.H., SAPERS G.M., CHOI S.W., 1998, Identification of tyrosinase inhibitor from *Galla rhois*, *Journal of Food Science and Biotechnology*, 7, 56-59.

KIM, Y.J., 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.

KIM Y.M., YUN J., LEE CK., et al., 2002, Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds: inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action, *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 16340-16344.

KUBO I., KINST-HORI, I., 1999, Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanisms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4121-4125.

KUBO I., KINST-HORI, I., 1999, 2-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde: A potent Tyrosinase inhibitor from African medicinal plants, *Planta Medica*, 65, 19-22.

KUBO, I., KINST-HORI, I., CHAUDHURI, S. K., KUBO, Y., SÁNCHEZ, Y., OGURA, T., 2000, Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8, 1749-55.

KUBO I., YOKOKAWA Y., 1992, Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*, *Phytochemistry*, 31, 1075-1077.

KÄHKÖNEN, M.P., HOPIA, A. I., VUORELA H. J., RAUHA J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, TYTTI S., HEINONEN, M., 1999, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.

LARSON, A.R., 1997, *Naturally Occuring Antioxidants*, Boca Raton, Lewis Publishers, 1997.

LIMA, CC., PEREIRA, APC., SILVA, JRF., OLIVEIRA, LS., RESCK, MCC., GRECHI, CO., BERNARDES, MTCP., OLIMPIO, FMP., SANTOS, AMM., INCERPI, EK., GARCIA, JAD, 2009, Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats, *Brazilian Journal of Biology*, 69, 1195-1201.

MACHEIX, J-J., FLEURIET, A., BILLOT, J., 1990, *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL.

MAEDA, K., FUKUDA M., 1991, In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 42, 361-368.

MALIK, A., AFAQ, F., SARFARAZ, S., ADHAMI, V. M., SYED, D. N., MUKHTAR, H., 2005, Pomegrate fruit juice for chemoprevention, *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 102, 14813-14818.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L., 2004, Polyphenols: food sources and bioavailability *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

MANELA-AZULAY, M., BAGATIN, E., 2009, Cosmeceutical vitamins, *Clinics in Dermatology*, 27, 469-474.

MANTLE, D., GOK, M.A., LENNARD, T.W., 2001, Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders, *Adverse Drug Reaction Toxicology Review*, 20, 89-103.

MARSHALL, M.R., KIM, J., WEI, C., 2000, *Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods*[online],<http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html>, [Ziyaret Tarihi: 01 Mayıs 2010].

MATTINEN, M.L., LANTTO, R., SELINHEIMO, E., KRUUS, K., BUCHERT, J., 2008, Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* tyrosinase, *Journal of Biotechnology*, 33, 395-402.

MAYER, A. M., 1987, Polyphenol oxidases in plants: recent progress, *Phytochemistry*, 26,11-20.

MOMTAZ, S., MAPUNYA, B.M., HOUGHTON, P.J., EDGERLY, C., HUSSEIN, A., NAIDOO, S., LALL, N., 2008, Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening, *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 507-512.

MOSHER, A. M., PATHAK. M. A., FITZPATRICK, T. B., 1983, *In: Dermatology in General Medicine*, 205–225, FITZPATRICK T.B., Eisen A. Z., Wolff K., Freedberg I. M. and Austern K. F. (eds), Mc-Graw-Hill, New York.

NAIR X., TRAMPOSCH K.M., 1989, UVB-induced pigmentation in hairless mice as an in vivo assay for topical skin-depigmenting activity, *Skin Pharmacology*, 2, 187-197.

NAKAGAWA M., KAWAI K., 1995, Contact allergy to kojic acid in skin care products, *Contact Dermatitis*, 32, 9-13.

NATTAPONG, S., OMBOON, L., 2008, A new source of whitening agent from a Thai Mulberry plant and its betulinic acid quantitation, *Natural Product Research*, 22, 727-734.

NELSON, J.M., DAWSON, C.R., 1944, Tyrosinase, *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 4, 99-152.

NO J.K., SOUNG D.Y., KIM Y.J., 1999, Inhibition of tyrosinase by green tea components, *Life Science*, 65, 241-246.

OKTAY, M., KÜFREVIÖĞLU, I., KOCAÇALIŞKAN, I., ŞAKIROĞLU, H., 1995, Polyphenoloxidase from Amasya apple, *Journal of Food Science*, 60, 494- 496.

ONSLOW, M.W., 1923, Oxidising enzymes, VI. A Note on tyrosinase, *Biochemical Journal*, 17, 216–219.

ORTONNE, J. P., BALLOTTI, R., 2000, Melanocyte biology and melanogenesis: What's new?, *Journal of Dermatological Treatment*, 11, 15–26.

ÖZÇELİK, D., 2005, “*Mantardan (Agaricus bisporus) tirozinaz enziminin izole edilmesi ve fenol giderilmesinde kullanılması*” Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Ankara.

ÖZER, G., Çukurova Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı <http://lokman.cu.edu.tr/pediatri/> [Ziyaret Tarihi: 4 Kasım 2002].

ÖZER, Ö., 2006, Kozmetik renk açıcı maddeler ve değerlendirilme yöntemleri Türkiye Klinikleri, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2, 24-29.

PAPAS, M.A., 1999, *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Boca Raton, CRC Press, 1999.

PARK, H.M., MOON, E., KIM, A.E.J., KIM, M.H., LEE, S., LEE, J.B., PARK, Y.K., JUNG, H.S., KIM, Y.B., KIM, S.Y., 2010, Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation, *International Journal of Dermatology*, 49, 276-282.

PARTINGTON, J. C., BOLWELL, G. P., 1996, Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein from potato tuber, *Phytochemistry* 42, 6, 1499-1502.

PARVEZ, S., KANG, M., CHUNG, H-S., BAE, H., 2007, Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetic and agriculture industries, *Phytotherapy Research*, 21, 805-816.

PARVEZ S., KANG, M., CHUNG H-S, 2006, A review: survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytotherapy Research*, 20, 921-934.

PARRISH, F. W., WILEY, B. J., SIMMONS, E. G., LONG L. JR, 1966, Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*, *Journal of Applied Microbiology*, 14, 139.

PATHAK, M., FITZPATRICK, T., KRAUS, E., 1986, Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 15, 894-899.

PENDHARKAR, M. B., NAIR, P. M., 1964, Alterations in solanum tuberosum polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation, *Phytochemistry*, 13, 1373.

PENNY K.B., SMITH C.J., ALLEN J.C., 1984, Depigmenting action of hydroquinone depends on disruption of fundamental cell processes, *Journal of Investigative Dermatology*, 82, 308-310.

PRAKASH, S., 1989, *Pile Foundations in Engineering Practice*, John Wiley&Sons Inc., New York, 123, 4567-890.

PRAKASH, S., KUMAR, S., 1996, *Nonlinear Lateral Deflection Prediction in Sands*, Journal of Geotechnical and Geoenvironment Engineering ASCE, Vol.122, No.2.

PRIOR, R.L., 2003, Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage, *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570S-578S.

PROTA, G., 1988, Progress in the chemistry of melanins and related metabolites, *Medicinal Research Reviews*, 8, 525-556.

QUEVEDO, W.C. JR., HOLSTEIN T.J., DYCKMAN J., MCDONALD, C.J., ISAACSON, E.L., 2000, Inhibition of UVR-induced tanning and immunosuppression by topical applications of vitamins C and E to the skin of hairless (hr/hr) mice, *Pigment Cell Research*, 13, 89-98.

REGNIER M., DUVAL C., GALEY J.B., PHILIPPE, M., LAGRANGE, A., TULOUP, R., SCHMIDT, R., 1999, Keratinocyte- melanocyte cocultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis, *Cellular and Molecular Biology*, 45, 969-980.

RESCIGNO, A., SOLLAI, F., PISU, B., RINALDI, A., SANJUST, E., 2002, Tyrosinase inhibition: General and applied aspects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17, 207-218.

REUTER, J., MERFORT, I., SCHEMPP, CM., 2010, Botanical in dermatology: an evidence-based review, *American Journal of Clinical Dermatology*, 11, 247-267.

ROBINS EJ., BREATHNACH AS., BASHIN YP., et.al., 1986, Effectiveness of azelaic acid as a depigmenting and chemotherapeutic agent, *Journal of Investigative Dermatology*, 87, 293-294.

RODRIGUEZ-LÓPEZ J. N., TUDELA J., VARÓN R., GARCIA-CÁNOVAS F., 1991, Kinetic study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1076, 379-386.

RODWELL, V.D., MAYES, P.A., MARTIN JR, D.W., 1988, *Harper'in Biyokimyaya Bakışı*, Ege Üniversitesi Basımevi-İzmir, 845 Çeviri Menteş, Namık Kemal, Menteş Gülriz.

SARI, O., *Karideslerde kararma* [online], <http://www.gidacilar.net/karideslerde-kararma-t1860.html?s=aa529a721e2b50c105afc17f1a87fe78&>; [Ziyaret Tarihi: 1 Mayıs 2010].

SAYAVECRA-SOTO L.A., MONTGOMERY M.W., 1986, Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite, *Journal of Food Science*, 51, 1531-1536.

SEERAM, N.P., ADAMS, L.S., HENNING, S.M., NIU, Y., ZHANG, Y., NAIR, M., 2005, In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 360-367.

SHAIHIDI, F., 1997, *Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications*, Champaign, III, AOCS Press, 1997.

SHIMIZU, K., KONDO, R., SAKAI, K., 2000, Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations, *Planta Medica*, 66, 11-5.

SMITH C.N., LINDSAY C.D., 2001, Kojic acid reduces the cytotoxic effects of sulfur mustard on cultures containing human melanoma cells in vitro, *Journal of Applied Toxicology*, 21, 435-440.

SPRITZ, R. A., HEARING, V. J. JR, 1994, Genetic disorders of pigmentation, *Advances in Human Genetics*, 22, 1-45 .

SUGUMARAN, M., 1988, Molecular mechanism for cuticular sclerotization, *Advances in Insect Physiology*, 21, 179–231.

SUGUMARAN, M., 1991, Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization, *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 293, 4–10.

SUNG, J.H., PARK, S.H, SEO, D.H., LEE, J.H., HONG, S.W., HONG, S.S., Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73, 552-556

TAYLOR S.L., BUSH R.K., 1986, Sulfites as food ingredients, *Food Technology*, 40, 47-52.

TEKMAN, Ş., ÖNER, N., 1981, *Genel Biyokimya üçüncü baskı*, Fatih Yayınevi - İstanbul, 351- 367.

TIEDTKE, J., MOREL, J., MARKS, O., 2004, Depigmentation factor bioflavonoids. A safe and effective skin lightening based on encapsulated citrus bioflavonoids [online], *Cosmetic Science Technology*, http://www.laserandskin.com.au/pdf/Depigmentation_F_B.pdf [Ziyaret Tarihi: 23 Nisan 2010].

TOMLINSON, M.J., 1994, *Pile Design and Construction Practice*, E&FN Spon, London, 12, 3456-7890.

TOLBERT, N. E., 1973, Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts, *Plant Pathology* 51, 234.

TÜZÜN, C., 1997, *Biyokimya üçüncü baskı*, Palme Yayınları- Ankara, 124- 125.

VAMOS–VIGYAZO, L., 1981, Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 49-127.

VANNI, A., GASTALDI, D., GIUNATA, G., 1990, Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the tyrosinase mushroom, *Annales des Chimie et des Physique*, 80, 35–60.

WADA, S., ICHIKAVA, H., TATSUMI, K., 1995, Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 304- 309.

WHITAKER, J.R 1995, *In: Food Enzymes, Structure and Mechanism*, Wong D. (ed.), Champman and Hall, New York, pp. 271–307.

WHITAKER, J.R., 1994, Principles of enzymology for the food sciences second edition, *Marcel Dekker, Inc.*, New York-America, pp. 517-520.

WITKOP, G.J., 1985, Inherited disorders of pigmentation, *American Journal of Clinical Dermatology*, 3, 70 -13.

YELENA, G., SHEPTOVITSKY, BRUDVIG, G.W., 1996, Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase, *Biochemistry*, 35, 16255-16263.

YI, W., WU, X., CAO, R., SONG, H., MA, L., 2009, Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants, *Food Chemistry*, 117, 381-386.

YOSHIMURA, M., WATANABE, Y., KASAI, K., YAMAKOSHI, J., KOGA, T., 2005, Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 2368-2373.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge CALAY

Doğum Tarihi : 17.11.1984

Doğum Yeri : Edirne

Öğrenim Durumu

İlk Okul : **Uzunköprü** Kadripaşa İlkokulu 1990-1995

Orta Okul ve Lise : **Uzunköprü** M.Atasay Anadolu Lisesi 1995-2002

Yüksek Öğrenim : İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü
2002-2006

Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim
Dalı Biokimya Programı 2006-2010

Yüksek Lisans Tezi Konusu: Tirozinaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından
İnhibisyonu

Bildiği Yabancı Dil : İngilizce

Medeni Hali : **Bekar**