



GİRESUN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN YÖRESİNDEKİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİLERİN FARKLI  
ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSTRELERİNİN ANTI-ELASTAZ AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ

YASEMİN SAĞKAL

OCAK 2013

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN YÖRESİNDEKİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİLERİN FARKLI  
ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSTRELERİNİN ANTI-ELASTAZ AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ

YASEMİN SAĞKAL

OCAK 2013

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün Onayı.

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

.../.../....

\_\_\_\_\_  
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak KİMYA Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Murat TAŞ

\_\_\_\_\_  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

\_\_\_\_\_  
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

Doç. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ÖZET

### GİRESUN YÖRESİNDEKİ BAZI YENİLEBİLİR BİTKİLERİN FARKLI ÇÖZÜCÜLERDEKİ EKSTRELERİNİN ANTI-ELASTAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

SAĞKAL, Yasemin

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Bahar SÖKMEN

OCAK 2013, 92 sayfa

Elastaz, akciğerlerde, damarlarda, lenflerde ve deride bulunan ve bağ dokunun önemli bir proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazdır. Anti-elastaz aktivitesi ciltte meydana gelen çeşitli hastalıkların oluşumunun engellenmesinde etkilidir.

Bu çalışmada, Giresun yöresinde yetişen 15 çeşit yenilebilir bitkinin farklı çözücülerdeki ekstralarının, elastaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu amaçla, bitkilerin su, metil alkol ve etil asetat ile hazırlanan ekstralarının elastaz aktivitesi üzerine inhibitör etkileri spektrofotometrik ölçümlerle analiz edildi. Analiz sonucunda bitki ekstralarının farklı inhibitör etkisi gösterdikleri belirlendi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, 15 bitki içinde sulu ekstralardan kara lahana (*Brassica oleracea*) ( $IC_{50}$  0,0002  $\pm$  0,0001  $\mu$ g/mL), ezeltire (*Pimpinella anisum*) ( $IC_{50}$  0,0013  $\pm$  0,0004  $\mu$ g/mL), kuzu kulağı (*Rumex acetosella*) ( $IC_{50}$  0,0030  $\pm$  0,003  $\mu$ g/mL) ve ısırgan (*Urtica dioica/urens*) ( $IC_{50}$  0,0034  $\pm$  0,002  $\mu$ g/mL); metil alkollü

ekstrelerden söğüt otu (*Polygonum lapathifolium*) (IC<sub>50</sub> 0,0003 ± 0,0002 µg/mL), gücükdene (*Polygonum bistorta*) (IC<sub>50</sub> 0,0005 ± 0,0001 µg/mL), kara lahanaya (*Brassica oleracea*) (IC<sub>50</sub> 0,0015 ± 0,002 µg/mL) ve mendek (*Aegopodium podagraria*) (IC<sub>50</sub> 0,0045 ± 0,0002 µg/mL); etil asetatlı ekstrelerden mendek (*Aegopodium podagraria*) (IC<sub>50</sub> 0,0007 ± ,0001 µg/mL), kaldirik (*Trachystemon orientalis*) (IC<sub>50</sub> 0,0032 ± 0,001 µg/mL), sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) (IC<sub>50</sub> 0,0042 ± 0,001 µg/mL) ve kuzu kulağı (*Rumex acetosella*) (IC<sub>50</sub> 0,0055 ± 0,006 µg/mL) bitkilerinin elastaz enzimini en iyi inhibe ettiğı tespit edildi.

Bu bitkiler arasında, kara lahananın (*Brassica oleracea*) sulu ekstresinin (IC<sub>50</sub> 0,0002 ± 0,0001 µg/mL), söğüt otunun (*Polygonum lapathifolium*) metil alkollü ekstresinin (IC<sub>50</sub> 0,0003 ± 0,0002 µg/mL) ve mendeğın (*Aegopodium podagraria*) etil asetatlı ekstresinin (IC<sub>50</sub> 0,0007 ± 0,0001 µg/mL) elastaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiğı bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Elastaz, Enzim, Enzim İnhibisyonu, İnhibitör, Bitki.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTI-ELASTASE ACTIVITIES OF EXTRACTS IN DIFFERENT SOLVENTS OF SOME EDIBLE PLANTS IN THE REGION OF GİRESUN

SAĞKAL, Yasemin

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bahar SÖKMEN

JANUARY 2013, 92 pages

Elastase found in lungs, blood vessels, lymphs and skin is a group of serin protease which is capable of separating elastin, an important protein of connective tissue. Anti-elastase activity is effective in preventing the formation of various diseases of the skin.

In this study, inhibitory effects of extracts of 15 kinds of edible plants growing in Giresun province in different solvents on elastase activity were investigated. For this purpose, inhibitory effects on elastase activity of these plants which were of extracts prepared with water, methyl alcohol and ethyl acetate were analysed by spectrophotometric measurements. As a result of analysis, it was determined that the plant extracts showed different inhibitory effects on elastase.

As a result among 15 plants, it was determined that the most effective extracts in inhibition of elastase were *Brassica oleracea* ( $IC_{50}$  0,0002  $\pm$  0,0001  $\mu$ g/mL), *Pimpinella anisum* ( $IC_{50}$  0,0013  $\pm$  0,0004  $\mu$ g/mL), *Rumec acetosella* ( $IC_{50}$  0,0030  $\pm$

0,003 µg/mL), *Urtica dioica/urens* (IC<sub>50</sub> 0,0034 ± 0,002 µg/mL) as the extracts dissolved in water; *Polygonum lapathifolium* (IC<sub>50</sub> 0,0003 ± 0,0002 µg/mL), *Polygonum bistorta* (IC<sub>50</sub> 0,0005 ± 0,0001 µg/mL), *Brassica oleracea* (IC<sub>50</sub> 0,0015 ± 0,002 µg/mL) and *Aegopodium podagraria* (IC<sub>50</sub> 0,0045 ± 0,0002 µg/mL) as the extracts dissolved in methyl alcohol and *Aegopodium podagraria* (IC<sub>50</sub> 0,0007 ± 0,0001 µg/mL), *Trachystemon orientalis* (IC<sub>50</sub> 0,0032 ± 0,001 µg/mL), *Ornithogalum umbellatum* (IC<sub>50</sub> 0,0042 ± 0,001 µg/mL) and *Rumex acetosella* (IC<sub>50</sub> 0,0055 ± 0,006 µg/mL) as the extracts dissolved in ethyl acetate.

Among those, the most effective inhibitors were water extract of *Brassica oleracea* (IC<sub>50</sub> 0,0002 ± 0,0001 µg/mL); methyl alcohol extract of *Polygonum lapathifolium* (IC<sub>50</sub> 0,0003 ± 0,0002 µg/mL) and ethyl acetate extract of *Aegopodium podagraria* (IC<sub>50</sub> 0,0007 ± 0,0001 µg/mL).

**Key Words:** Elastase, Enzyme, Enzyme Inhibition, Inhibitory, Plant.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim sırasında, tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini hiç esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bahar SÖKMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarda birlikte çalıştığım arkadaşım Yasemin ŞAHİN'e, her zaman yanımda olduğunu bildiğim Şibel EŞ'e ve sevgili ev arkadaşım Seval ÇAMUR'a çok teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu proje, **Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Biriminin FEN-BAP-C-160512-09** numaralı projesi ile desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar DİZİNİ .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XII
SİMGELER DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzim Tanımı ve Enzimlerin Tarihçesi.....	2
1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. Enzimlerin Yapısı .....	6
1.1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	9
1.1.4. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Etmenler.....	11
1.1.4.1. Enzim Konsantrasyonu .....	12
1.1.4.2. Substrat Konsantrasyonu.....	12
1.1.4.3. Sıcaklık.....	13
1.1.4.4. Ortam pH'ı .....	13
1.1.4.5. Zaman.....	14
1.1.4.6. Reaksiyon Ürünleri .....	14
1.1.4.7. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler.....	14
1.1.4.8. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler.....	14
1.1.5. Enzim İnhibisyonu.....	14

1.1.5.1. Tersinir (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu .....	15
1.1.5.2. Tersinmez (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu.....	17
1.1.6. Enzimlerin Kullanım Alanları .....	18
1.1.7. Hastalık Tanısında Enzimler.....	20
1.2. Proteazlar.....	21
1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması .....	23
1.2.1.1. Ekzopeptidazlar.....	23
1.2.1.2. Endopeptidazlar.....	23
1.2.1.3. Sistein Proteazlar (E.C.3.4.22).....	23
1.2.1.4. Aspartat Proteazlar (E.C.3.4.23) .....	24
1.2.1.5. Metallo Proteazlar (E.C.3.4.24) .....	24
1.2.1.6. Serin Proteazlar (E.C.3.4.21) .....	24
1.2.1.6.1. Serin Proteazların Etki Mekanizması.....	28
1.3. Elastazlar .....	29
1.3.1. Pankreatik Elastaz (E.C.3.4.21.36).....	34
1.3.2. Nötrofil Elastaz (E.C.3.4.21.37).....	35
1.3.3. Pankreatik ve Nötrofil Elastaz Enzimlerinin İnhibitörleri.....	37
1.3.4. Elastaz Enzimleriyle İlgili Klinik Çalışmalar.....	38
1.4. Elastaz Enzimi İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar .....	41
2. MATERYAL VE METOT .....	43
2.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar .....	43
2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	43
2.3. Enzim İnhibisyonu Tayininde Kullanılan Bitki Materyalleri.....	43
2.3.1. Kara Lahana ve Çiçeği.....	44
2.3.2. Sakarca.....	45
2.3.3. Diken Ucu .....	45
2.3.4. Kaldirik .....	46

2.3.5. Kuzu Kulağı.....	46
2.3.6. Çalı ileği .....	47
2.3.7. Hoşuran.....	48
2.3.8. Isırgan .....	48
2.3.9. Ezeltire .....	49
2.3.10. Pazı.....	49
2.3.11. Mendek .....	50
2.3.12. Gucukdene .....	50
2.3.13. Sogut Otu .....	51
2.3.14. Yayla Pancarı.....	51
2.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması .....	52
2.4.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması .....	52
2.4.2. Metil Alkol ve Etil Asetat Ekstrelerinin Hazırlanması.....	52
2.5. Anti-Elastaz Enzim Aktivitesinin Olculmesi .....	52
3. ARAşTIRMA BULGULARI .....	54
3.1. Bitki Ekstrelerinin Anti-Elastaz Enzim Aktivitesi .....	54
4. TARTIşMA VE SONUÇ .....	69
KAYNAKLAR .....	74
ÖZGEçMİş .....	92

## TABLÖLAR DİZİNİ

### TABLO

1.1 İlaç Olarak Kullanılan Enzim İnhibitörleri .....	20
1.2 Kollajen ve Elastin Arasındaki Farklılıklar .....	32
3.1 Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerleri.....	54
3.2 Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Metil Alkollü Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerleri.....	59
3.3 Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Etil Asetatlı Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC <sub>50</sub> Değerleri .....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

1.1 Enzim Substrat İlişkisi .....	4
1.2 Katalizlenmemiş ve Enzim-Katalizli Egzergonik Bir Reaksiyon için Aktivasyon Enerji Dönüşü .....	5
1.3 Bir Polipeptit Zincirinin Katlanması ve Aktif Bölgenin Oluşumu .....	8
1.4 Anahtar-Kilit Modeli .....	8
1.5 İndüklenmiş Uyum Modeli .....	9
1.6 Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi .....	12
1.7 Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi.....	13
1.8 Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi.....	13
1.9 Kompetitif Enzim İnhibisyonu.....	15
1.10 Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	16
1.11 Unkompetitif Enzim İnhibisyonu.....	17
1.12 Proteazların Katalizlediği Reaksiyon.....	25
1.13 Serin Proteazların Aktif Merkezi .....	26
1.14 Serin Proteaz Reaksiyonunun Basitleştirilmiş Katalitik Mekanizması.....	29
1.15 Tropokollajenin Üçlü (Triplet) Heliks Yapısı.....	31
1.16 Elastinin Yapısı .....	32
1.17 Domuz Pankreatik Elastaz Enziminin Kristal Yapısı .....	35
1.18 Nötrofil Elastazın Üç Boyutlu Yapısı .....	36
3.1 Kara Lahana Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği.....	57
3.2 Ezeltire Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	58
3.3 Kuzu Kulağı Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği.....	58
3.4 Isırgan Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	59
3.5 Söğüt Otu Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	62
3.6 Gücükdene Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	62

3.7 Çalı Çileği Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	63
3.8 Mendek Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	63
3.9 Kara Lahana Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	64
3.10 Mendek Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	67
3.11 Kaldirik Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	67
3.12 Sakarca Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği	68
3.13 Kuzu Kulağı Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği .....	68

## RESİMLER DİZİNİ

### RESİM

2.1 Kara Lahana Bitkisi ve Çiçeği .....	44
2.2 Sakarca Bitkisi .....	45
2.3 Diken Ucu Bitkisi.....	45
2.4 Kaldirik Bitkisi .....	46
2.5 Kuzu Kulağı Bitkisi .....	46
2.6 Çalı Çileği Bitkisi.....	47
2.7 Hoşuran Bitkisi .....	48
2.8 Isırgan Bitkisi .....	48
2.9 Ezeltere (Anason) Bitkisi .....	49
2.10 Pazı Bitkisi .....	49
2.11 Mendek Bitkisi .....	50
2.12 Gücükdene Bitkisi .....	50
2.13 Söğüt Otu Bitkisi.....	51
2.14 Yayla Pancarı Bitkisi .....	51

## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µmoL	Mikromol
mM	Milimolar
µg/mL	Mikrogram / Mililitre
kDa	Kilo Dalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Sabiti
mg/mL	Miligram / Mililitre
µg	Mikrogram
M	Molar
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre



## 1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmada kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşumuna fırsat vermeden, %100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük özelleşmiş grubunu teşkil etmektedirler (1).

Enzimler, doğal ortamlar dışında yeterli koşullar sağlandığında dış ortamlarda da etkilerini gösterebilirler. Bu nedenle, enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücrelerin belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntıları ile incelenmesi büyük önem taşımaktadır (2).

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına '*inhibisyon*' adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de '*inhibitör*' denilmektedir. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır (1). Günümüzde enzim ve enzim inhibitörlerinden tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan ve kozmetik gibi pek çok alanda faydalanılmaktadır (3).

Elastazlar, bağ dokunun önemli bir proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazlardır (4). Ayrıca, elastazların romatoid artrit (kireçlenme), akciğer amfizemi ve kronik enflamatuvar gibi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (5). Elastin, bağ dokuya esneklik sağlayan bir ekstrasellüler matriks proteindir (6). Bu elastik lif formlarının cildin dermis ve cilt elastikiyeti üzerinde etkisi vardır (7). Pankreatik elastaz, özellikle akut pankreatit ya da pankreas kanseri gibi pankreas hastalıklarının durumlarını yansıtırken (8); nötrofil elastaz (NE), çeşitli enflamatuvar hastalık durumlarında artmaktadır (9). Bu nedenle elastaz enziminin inhibisyonu klinik ve kozmetik açıdan her geçen gün daha da önem kazanmaktadır.

Geleneksel halk ilaçları, yıllar boyunca nesilden nesile aktarılarak varlığını sürdüren ve halkın çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlandığı doğal kaynaklı ilaçlardır. Bitkilerin yapısında bulunan kimyasal maddeler, sentez edilen kimyasal

maddelere göre yan etkilerinin daha az olması ve maliyetlerinin düşük olması nedeniyle, bitkilere ve bitki ekstraktlarına olan ilgi giderek artmaktadır. Bu nedenle, bitkilerden ve bitkisel kaynaklı olan birçok bileşikten elde edilen kimyasal maddeler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Buna paralel olarak bu kullanımların bilimsel dayanağının olup olmadığının araştırılması önem kazanmaktadır (3).

### **1.1. Enzim Tanımı ve Enzimlerin Tarihçesi**

Enzimler; hücre çoğalması, enerjinin veya besinlerin çevreden alınması ve enerjinin dönüşümü, metabolitlerin taşınması ve kısaca metabolizma olarak tanımlanan bütün hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan biyokatalizörlerdir (10); biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal ajanlardır (11).

Şekerlerden alkolün eldesi, peynir yapılması, şarabın sirkeleşmesi ve idrarda amonyak teşekkülü gibi enzimatik olaylar, tarihten önceki devirlerden beri bilinmektedir. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu vb. önemli fizyolojik faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bütün bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle gerçekleşmektedir. Bu sebeple yaşam, birçok enzim reaksiyonlarının bir araya gelmesinden ibaret bir sistem olarak da tanımlanmıştır (12).

İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlandığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili olan bitkisel enzimler üzerinde çalışmış; 1860 yıllarında Pasteur fermentasyon enzimleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Fermentasyon ile ilişkilerinden dolayı başlangıçta verilen ferment adı 1878 yılında Kühne tarafından Yunanca'da "*maya içinde*" anlamına gelen "*enzim*" ismi ile değiştirilmiştir (13). 1926'da James Sumner'ın üreazı izole ve kristalize etmesi, spesifik enzimlerin özelliklerinin daha önceki incelenmeleri için bir hamle sağlamıştır. Sumner, üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu bulmuş ve bütün enzimlerin protein olduklarını ileri sürmüştür. Bu düşünce, başka örneklerin olmaması nedeniyle bir süre için tartışmalı

kalmıştır. Ancak, 1930’larda John Northrop ve meslektaşlarının pepsin ve tripsini kristalize etmeleri ve bunların protein olduklarını bulmalarından sonra Sumner’ın vardığı sonuç yaygın olarak kabul görmüştür. Böylece enzimlerin protein yapıda olduğu kanıtlanmıştır (11).

### 1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik şartlarda sentez edilmektedir. Fakat aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları şart değildir. Proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturan enzimlerin peptit zincirleri halindeki temel yapı elemanları amino asitlerden oluşur ve kendilerine özel 3-boyutlu yapılara sahiptir. Bu 3-boyutlu tersiyer yapıları bu biyomoleküllere, bağlanacakları ve değişime uğratacakları substrat moleküllerini seçme özgünlüğü kazandırmaktadır. Kuaterner yapılara sahip yani birden fazla alt birimli enzimler de mevcuttur. Enzimlerin bu 3-boyutlu yapıları substrat molekülünün uygun bir şekilde bağlanabilmesini sağlayacak biçimdedir ve bu yapı önemli derecede enzimin katalitik aktivitesini sağlar.

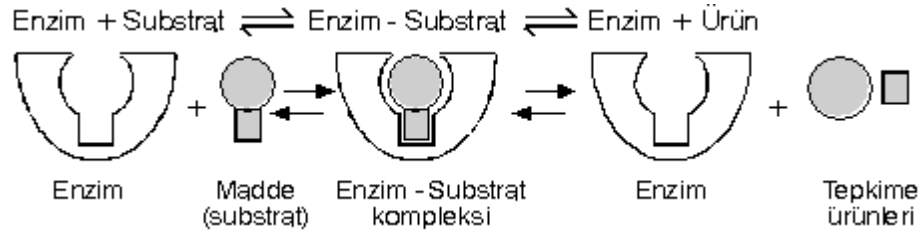
Enzimlerle substratlar veya diğer enzimlere bağlanabilen moleküller arasındaki etkileşimler proteinlerin 3-boyutlu yapılarının kazanılmasında da rol oynayan zayıf etkileşimler olan iyonik bağ, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerdir.

Enzimler oldukça yüksek düzeylerde reaksiyon hızları gösterirler. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonların hızları katalizlenmemiş reaksiyonlara göre genellikle  $10^6$ – $10^{12}$  kat daha büyüktür. Enzimler çoğunlukla fizyolojik pH değerlerinde,  $100^\circ\text{C}$ ’nin altındaki sıcaklıklarda ve atmosferik basınçlarda biyokimyasal reaksiyonları katalizler.

Enzimler, değişime uğrattıkları substratlarına karşı çeşitli düzeylerde özgünlük gösterir. Bir enzim, sadece tek bir substrat üzerinde rol oynadığında ve sadece tek bir reaksiyonu katalizlediğinde “*tam spesifiklik*” gösterir. Yani aktif bölgeye yerleşebilecek tek bir türden substrat moleküllerine bağlanabilir. Örneğin; galaktokinaz, sadece galaktozun fosforilenmesini katalizleyebilirken; glukokinaz,

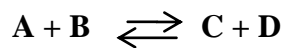
sadece glukozun fosforillenmesinden sorumludur. Bazı enzimler genel bir fonksiyonel gruba sahip olan bir sınıf substrat üzerinde rol oynayabilirler ki bu, “*grup spesifikliği*” olarak ifade edilir. Örneğin; fosfatazlar, bir fosfat fonksiyonel grubuna sahip ancak oldukça farklı substratların reaksiyonlarını katalizleyebilirler. Bazı enzimler ise belirli bir türden kimyasal bağlara karşı özgündürler. “*Bağ spesifikliği*”ne örnek olarak esterazlar verilebilir. Bu enzimler ester bağlarına sahip moleküllerin hidrolizini katalizlemekten sorumludurlar. Bazı enzimler ise “*izomer spesifikliği*” gösterir ve *D-* ve *L-* izomerlerden sadece birinin reaksiyonunu katalizlemekten sorumludur. Örneğin; *L*-amino asit oksidaz, sadece *L*-amino asitlerden amino grubunun uzaklaştırılmasını ve böylece bir keto asit ile beraber amonyağın oluşumunu katalizleme özgülüğüne sahiptir (10).

Enzimler hücredeki reaksiyonlarda yan ürün oluşurmazlar, reaksiyonların %100 verimle sonuçlanmasını sağlarlar (14). Enzimler reaksiyon sırasında fiziksel değişiklikler geçirirler de, reaksiyon tamamlandığında tekrar kendi orijinal hallerine geri dönerler (15).



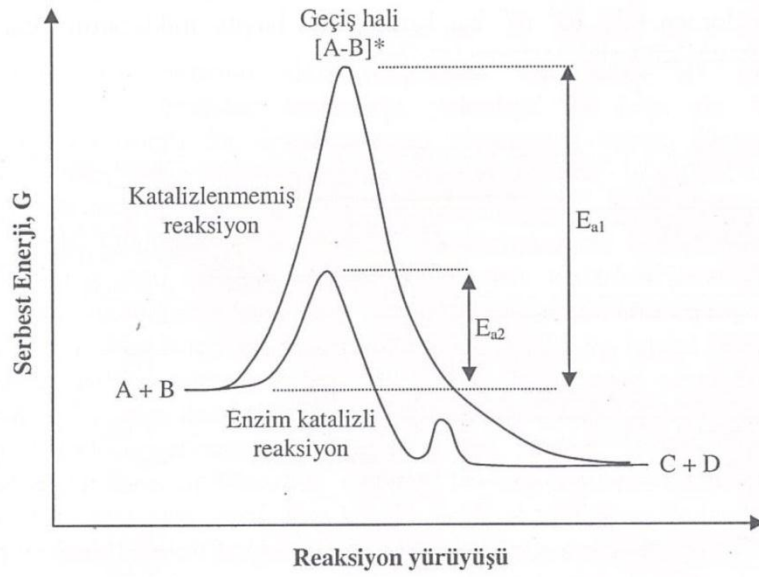
**şekil 1.1** Enzim Substrat İlişkisi (15)

Enzimler, kimyasal reaksiyonların normalden en az milyon defa daha hızlı gerçekteşmesini sağlar. Katalizlenmemiş bir reaksiyonun dengeye varması yavaş olmasına rağmen, enzimler varlığında denge birkaç saniyede sağlanır.



A ve B moleküllerinin yukarıda tanımlandığı şekilde reaksiyon verip C ve D ürünlerini oluşturabilmesi için kimyasal bağı kırabilecek ya da yapabilecek kadar yeterli kinetik enerjile birbirlerine çarpmaları gerekir. Dolayısıyla moleküller geçiş

halinin oluşumunu sağlayacak kadar bir aktivasyon enerjisine ( $E_a$ ) sahip olmalıdır (Şekil 1.2). Geçiş hali yüksek enerjili bir ara üründür ve A ile B reaktanlarının C ve D ürünlerine dönüşebilmeleri için bu enerjiye ihtiyaçları vardır ve geçiş hali oluşur oluşmaz ürünlere varılır. Eğer reaktan moleküllerin çoğu yeterli kinetik enerjiye sahip olmazsa, çok azı geçiş halinin enerjisine varacak ve dolayısıyla çok az ürün oluşacaktır. Ancak çevreden yeterli enerji sağlanırsa geçiş haline daha kolayca varılıp daha fazla ürün oluşması mümkündür.



**Şekil 1.2** Katalizlenmemiş ve Enzim-Katalizli Egzergonik Bir Reaksiyon için Aktivasyon Enerji Dönüşü (10)

Enzim katalizli bir reaksiyonda ise, A ve B reaktanları enzimin aktif bölgesine bağlanıp C ve D ürünlerini oluşturmak üzere etkileşeceklerdir. Ancak enzim varlığında geçiş halinin enerjisi enzimsiz olana göre daha düşüktür. Bunun sebebi, enzimin aktif bölgesinde A ve B substratları daha düşük enerjili yeni bir ürün veya ara ürün oluşturur. Böylece enzimler aktif bölgede substratlar ile etkileşmek üzere sağladıkları gruplar yardımıyla, aktivasyon enerjisini oldukça düşürerek reaksiyonun herhangi bir yönde daha hızlı ilerlemesini sağlayabilir. Bununla birlikte enzimler dengenin yönüne hiçbir şekilde etki etmezler (10).

### 1.1.2. Enzimlerin Yapısı

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu (ribozimler) hariç bütün enzimler protein yapısındadırlar. Bu nedenle enzimler, proteinlere ait tüm yapısal özellikleri gösterirler. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000'un üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır. Bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur; bir enzim amino asit bileşenlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi daima bozulur. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları katalitik aktiviteleri için esastır (11).

Bazı enzimler sadece proteinden oluşurken, bazıları proteinin yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Enzimlerin protein kısmına “*apoenzim*” denir. Bu kısım, enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar. Apoenzim ısı ile kolayca denatüre olur. Yapıları sadece proteinden ibaret olan enzimlere örnek olarak pepsin, tripsin, üreaz, elastaz ve diğer hidrolaz sınıfı enzimler gösterilebilir.

Enzimatik reaksiyonlarda görev yapan ve protein olmayan maddelere “*kofaktör*” denir. Kofaktörler zorunlu iyonları ve koenzim olarak adlandırılan grup transfer moleküllerini içerir. Bunlar enzimatik işlem tamamlandıktan sonra enzimler gibi tekrar eski hallerini alır. Kofaktörler substrat ile beraber aktif bölgeye bağlanarak enzim fonksiyonunun gerçekleşmesine yardımcı olur. Bunlar asit ya da baz gibi fonksiyon yaparak ya bağlı substrata proton salıvererek ya da substrattan proton alarak katalitik işleme katılır. Bazı kofaktörler ise substrattan elektron alır (elektrofilik) veya substrata elektron salıverir (nükleofilik). Kofaktörlerin bu özelliklerine göre kimyasal bağlar kırılır ya da yapılır. Özellikle  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  gibi çok çeşitli metal iyonları kofaktör olarak enzimlerin aktivitesinde rol oynar ve birçok enzimin aktivitesi için gereklidir ki bu türden enzimler “*metalloenzim*” olarak tanımlanır. Örneğin, demir içeren bir enzim olan katalaz, hücrelerde potansiyel hasar yapıcı bir madde olan hidrojen peroksidin parçalanmasını ve hasar yapmayan maddelerin oluşmasını katalizler (10).

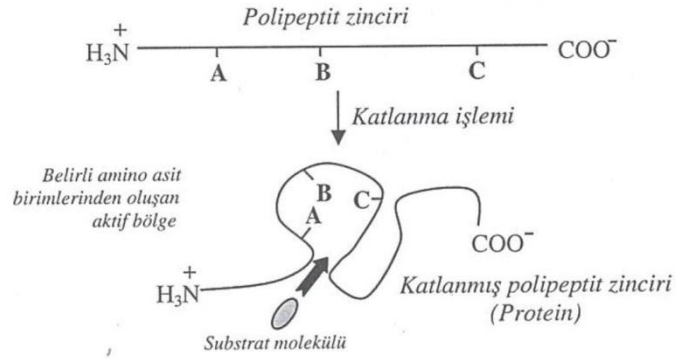
*Koenzimler*, organik ya da inorganik, çok defa fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük molekülü olan kısımdır. Enzimde esas işlev yapan kısım bu kısımdır. Koenzim kısmı genellikle protein kısmından ayrılabilir ve analizlerinde birçok vitamini (tiamin, niasin, riboflavin vs.) bünyesinde bulundurur. Koenzim içeren enzimlere nikotinamid nükleotidli enzimler örnek verilebilir. Bazı koenzimler nükleotid yapısındadır. Örneğin, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP<sup>+</sup>) ve bileşik nükleotid olan koenzim A.

Koenzimler, apoenzimden kolaylıkla ayrılabilir ancak tek başlarına katalitik etki göstermezler. Koenzim apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmışsa, bu sıkı bağlanan kısma “*prostetik grup*” denir. Nükleotid yapısında olan prostetik gruplar da vardır. Örneğin, flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi (12).

Amino asitler yanında amino asit olmayan yapıları da içeren enzimlere “*bileşik (konjuge) enzim*” veya “*holoenzim*” denir (10).

Enzim molekülü üzerinde substrat bağlama özelliğine sahip bir bölge bulunur. Protein zincirinin bu kısmı enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “*aktif bölge*” olarak tanımlanır (12). Bu bölge bir nokta, bir çizgi ve hatta bir yüzey olmayıp, enzimin lineer yapısının değişik noktalarında bulunan grupların biraraya gelerek oluşturdukları 3-boyutlu karmaşık bir bölgedir (1). Aktif bölge, geometrik olarak substratın yerleşebileceği bir cep şeklindedir ve bu cepteki amino asit yan zincirleri özellikle bir türden substrat ile etkileşecek şekilde düzenlenmiştir. Dolayısıyla hem şekil hem de fonksiyonel grup dağılımı açısından farklılık gösteren moleküller enzime etkin bir şekilde bağlanamaz ve böylece ürün oluşturmak üzere herhangi bir enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturamaz. Enzimlerin aktif bölgeleri protein polipeptit zincirinin belirli bir düzende katlanması ve belirli aminoasit yan zincirlerinin biraraya gelmesi ile oluşturulur (Şekil 1.3). Farklı amino asit yan zincirlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri, substratın aktif bölgeye bağlanmasına yardımcı olur. Substrat moleküllerinin bağlanması yanında bu yan zincirler kataliz olaylarına da katılabilir. Örneğin, aspartat ve glutamat gibi yan zincirinde negatif yük

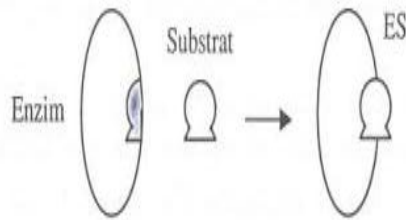
taşıyabilen aminoasitler pozitif yüklü bir substrat ile elektrostatik etkileşim yaparak bağlanabilir. Benzer şekilde lizin, histidin ve arginin gibi pozitif yüklü yan zincir taşıyan aminoasitler de negatif yüklü bir substrat ile bağlanabilir (10).



**Şekil 1.3** Bir Polipeptit Zincirinin Katlanması ve Aktif Bölgenin Oluşumu (10)

Enzimlerin, substratlar ile aktif bölgede uygun ve özel etkileşimi çeşitli modellerle açıklanmıştır. Bunlar; Anahtar-Kilit Modeli ve İndüklenmiş Uyum Modelidir.

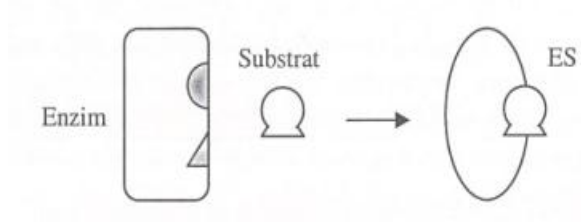
**Anahtar-Kilit Modeli:** Fischer (1894) tarafından önerilen bu modelde enzim-substrat etkileşimi bir anahtarın özel bir kilidin anahtar deliğine yerleştiği gibi, substratın da enzimin aktif bölgesine yerleştiği şeklinde açıklanmıştır. Bu model, enzim özgünlüğünü açıklayabilmesine rağmen enzim katalizini açıklamada yeterli olmamıştır.



**Şekil 1.4** Anahtar-Kilit Modeli (10)



**İndüklenmiş Uyum Modeli:** Koshland (1958) tarafından önerilen bu modelde, hem enzim hem de substrat bağlanma sonucu şeklini değiştirir ve substrata geçiş halini alacak şekilde bir konformasyona zorlanır. Böylece, enzim substratı baskı altında tutar ve doğrudan katalitik olayın oluşmasını sağlar. Bu model için bazen el-eldiven benzetmesi de yapılmaktadır (10).



**Şekil 1.5** İndüklenmiş Uyum Modeli (10)

### 1.1.3. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler, önceleri katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri substrat adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, “-az” eki getirilerek isimlendirilmiştir. Örneğin, üreyi  $\text{CO}_2$  ve  $\text{NH}_3$ 'a parçalayan enzime üreaz; arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz; fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini katalizleyen enzimlere de fosfataz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirlerken, hiçbir bilgi ifade etmeyen bazı enzim adları da biyokimyacılar tarafından kullanılmıştır. Örneğin, pepsin, tripsin ve katalaz gibi. Zamanla birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bunun üzerine enzimler, Uluslararası Enzim Komisyonu (E.C.) tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırmaya tabi tutulmuştur.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri;

1. Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba ayrılmıştır. Her bir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır.

2. Enzim adı iki kısımda verilir. İlki substrat veya substratlarıdır. İkincisi ise katalizlenen reaksiyonun tipinin sonuna “-az” eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar, aralarına iki nokta konularak yazılırlar.
3. Reaksiyonun tabiatını açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonuna yazılabilir.
4. Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. harflerinden sonra ardarda gelen dört rakamdan ibarettir. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir. Mesela E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir. Sözü edilen enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP: D-heksoz 6-fosfotransferaz enzimidir (1).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve kabul edilen sistematik adlandırmada enzimler, 6 büyük sınıfa ayrılırlar; her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır (11).

**1. Oksidoredüktazlar:** İndirgenme ve yükseltgenme olayını katalizleyen enzimlerdir. Oksidoredüktazlar ayrıca dehidrojenazlar ve sitokromlar, oksidazlar, oksijenazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılabilirler. Solunum ve fermentasyon olaylarıyla ilgili enzimler oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Örneğin; katalaz, laktat dehidrojenaz.

**2. Transferazlar:** Fonksiyonel grupların bir molekülden diğerine 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. Örneğin; kreatin kinaz, aspartat transaminaz.

**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. Örneğin; lipaz, üreaz.

**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 tersi bir yolla etkinlik gösterirler. Örneğin; piruvat dekarboksilaz.

**5. İzomerazlar:** Substratın molekül içi değişikliklerini katalizleme özelliğine sahip enzimlerdir. Rasemazlar ve epimerazlar, cis-trans izomerazlar, intramoleküler oksidoredüktazlar, intermoleküler transferazlar, intramoleküler liyazlar ve diğer liyazlar olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin; glukoz-6-fosfat izomeraz.

**6. Ligazlar (Sentetazlar):** Ligazlar iki molekülün birleşmesini kataliz ederler. Bu birleşme için gerekli enerji ATP (Adenozin trifosfat), ADP (Adenozin difosfat) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden sağlanır. Örneğin; piruvat karboksilaz, asetil CoA karboksilaz (16).

#### 1.1.4. Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Etmenler

Enzimler biyolojik sistemlerde çok küçük miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle enzim proteinin miktarından ziyade biyolojik sistemde gösterdiği aktivite miktarı ölçülür (17).

**Bir enzim aktivitesi birimi:** 25°C'de 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak kabul edilmektedir.

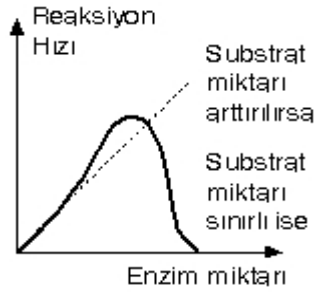
**Özgül (spesifik) aktivite:** Miligram protein başına düşen enzim aktivitesidir. Bu terim daha çok izole edilen enzimin saflığını kontrol etmek için kullanılır.

**Dönüşüm sayısı ( $k_{kat}$ ):** Her bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat moleküllerinin sayısıdır (10).

Enzim reaksiyon hızı üzerine enzim ve substrat konsantrasyonlarının, sıcaklığın, ortam pH'ının, zamanın, reaksiyon ürünlerinin, hormonların, ışık vb. gibi fiziksel faktörlerin etkisi vardır (17).

#### **1.1.4.1. Enzim Konsantrasyonu**

Substratın çok bol olduğu bir ortamda optimal şartlarda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı ( $V_o$ ), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Belirli bir süre sonra ortamda enzimin reaksiyona girebileceği substrat sınırlı olduğundan hız giderek azalmaya başlar (17).



**Şekil 1.6** Enzim Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi (17)

#### **1.1.4.2. Substrat Konsantrasyonu**

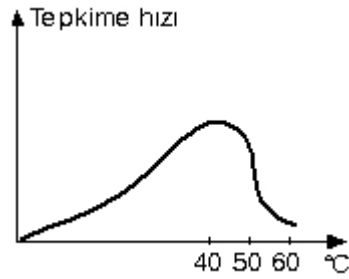
Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe ortamda reaksiyona girebilecek enzim bulunmadığından hız giderek daha az artar ve belirli bir maksimum hız ( $V_{max}$ ) düzeyinde sabit kalır (17).



Şekil 1.7 Substrat Miktarının Reaksiyon Hızına Etkisi (17)

#### 1.1.4.3. Sıcaklık

Enzimatik reaksiyonların hızı sıcaklık artışıyla belirli bir noktaya kadar artar. Belirli bir sıcaklık aşıldıktan sonra enzimler de diğer proteinler gibi denatüre olurlar ve etkilerini kaybederler. Her enzimin substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir maksimum sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa “*optimum sıcaklık*” denir. *In vitro* enzim reaksiyonları genel olarak 37-40°C’de yapılır (17).



Şekil 1.8 Sıcaklığın Reaksiyon Hızına Etkisi (17)

#### 1.1.4.4. Ortam pH’ı

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir pH aralığı vardır. Bu pH’ya enzimin “*optimum pH’ı*” denir. Örneğin; pepsin pH 1-2 aralığında, üreaz ise pH 6-7 aralığında en yüksek aktiviteyi gösterir. Enzimin optimum pH’sının altında ve üstünde reaksiyon hızı azdır. Enzim belirli bir pH’da tamamen etkisiz kalır ve yapısı bozulur (17).

#### **1.1.4.5. Zaman**

Enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalır. Bunun sebebi, reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesidir (17).

#### **1.1.4.6. Reaksiyon Ürünleri**

Enzim reaksiyonu devam ettikçe, reaksiyon ürünleri enzimi inhibe ettikleri için enzim reaksiyonunun hızı azalır. Bu inhibisyonun sebebi, reaksiyon ürünlerinin molekül yapısı bakımından substratı andırmaları ve enzime substrattan daha fazla bağlanmalarındır (12).

#### **1.1.4.7. Işık ve Diğer Fiziksel Etkenler**

Enzimlerin etkisi ışıkla arttırılabilir veya azaltılabilir. Enzim çözeltilerinin kuvvetli çalkalanması da enzimin denatüre olmasına neden olur (12).

#### **1.1.4.8. Hormonlar ve Diğer Biyokimyasal Maddeler**

Hormonlar, aminoasitler ve diğer bazı biyokimyasal maddeler de enzim aktivitesi üzerinde değişiklikler meydana getirirler. Örneğin, östrojenik, androjenik ve bazı steroid gebelik hormonları, glutamat dehidrojenaz enziminin dört alt ünitesini ayrıştırarak enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar ki bu durum, lösin, metiyonin, izolösin, ADP (Adenozin difosfat) tarafından geri çevrilebilir (11).

### **1.1.5. Enzim İnhibisyonu**

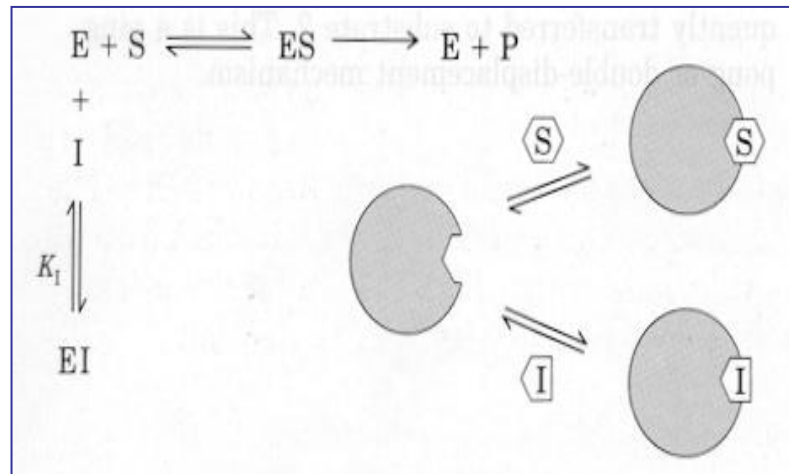
Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına "*inhibisyon*" adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de "*inhibitör*" denilmektedir (1). Enzim inhibitörleri, enzim aktivitesini azaltan ya da tamamen durduran maddelerdir (18). İnhibitörler, genellikle

küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemli bir olaydır. Çeşitli ilaçlar ve zehirli bileşikler de, etkilerini bu yolla gösterirler. Enzimlerin inhibisyonu başlıca iki şekilde meydana gelir (1).

#### 1.1.5.1. Tersinir (Geri Dönüşümlü) Enzim İnhibisyonu

##### *Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu*

Kompetitif inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi enzime tersinir bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir. Kompetitif enzim inhibisyonunda bir kompetitif inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışır. Enzimin aktif bölgesine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez. İnhibitör aktif bölgeyi işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır;  $K_m$  değeri büyür. Enzim-inhibitör (EI) kompleksi oluşturmak üzere enzim ile tersinir olarak birleşir (11). Buna çok klasik bir örnek olarak süksinat dehidrojenazın malonik asitle inhibisyonu gösterilebilir. Süksinik asit, sitrik asit siklusu sırasında süksinat dehidrojenaz enziminin katalitik etkisi ile çok kolaylıkla fumarik aside dönüşebilir. Fakat ortamda malonik asidin bulunması formül yapı benzerliğinden dolayı bu dönüşümü yavaşlatır (18).



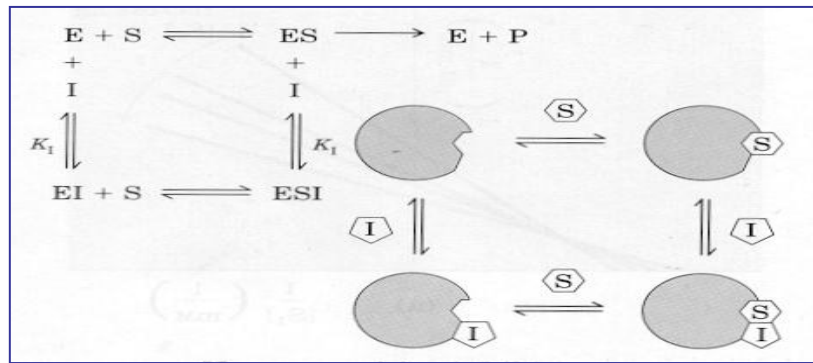
Şekil 1.9 Kompetitif Enzim İnhibisyonu (11)

### *Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu*

Yarışmasız enzim inhibisyonunun substratın konsantrasyonu ile ilişkisi yoktur. Yarışmasız enzim inhibisyonunda hem substrat hem de inhibitör madde aynı zamanda enzime bağlanmaktadır. Enzime yarışmasız inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasını bloke etmez, substrat bağlanması da yarışmasız inhibitörün bağlanmasını bloke etmez (11). İnhibitörün enzimin aktif yeri dışında bir yere bağlanması ile, o enzimin moleküllerinin substratla reaksiyona girme hızında bir azalma meydana gelmektedir. Yarışmasız inhibisyonun en sık görülen şekli, inhibitörün, enzimin yapısında bulunan fonksiyonel gruplarla, bu grupların yapısını bozmadan tersinir bir şekilde birleşmesi halidir.

Bazı enzimler, yapılarında fonksiyonları için esas olan sülfhidril (-SH) grupları taşırlar. Enzimin normal şekilde görev yapabilmesi için -SH gruplarının bozulmadan korunması gerekir. Bu -SH gruplarının metal iyonları tarafından yarışmasız bir şekilde inhibe edilmesi enzimin normal katalitik etkisini sürdürmesine engel olur. Bu çeşit ağır metallere örnek olarak  $Ag^+$ ,  $Hg^{+2}$  ve  $Pb^{2+}$ 'u göstermek mümkündür (18).

Bu tür inhibisyon ile, tepkimenin  $V_{max}$  değeri azaldığı halde  $K_m$  değeri değişmez (11).

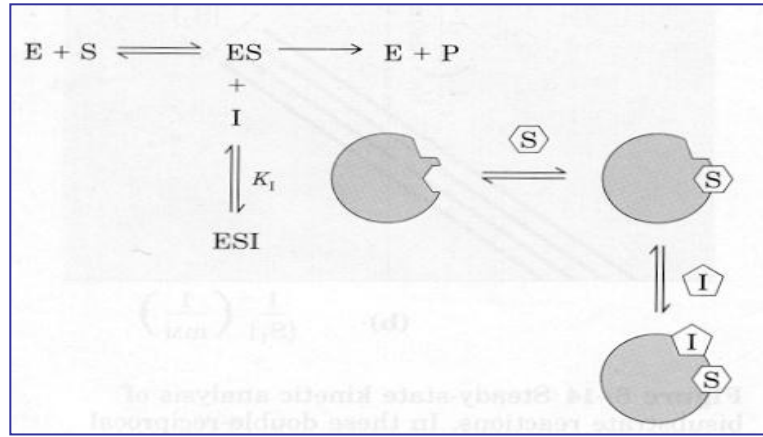


**Şekil 1.10** Nonkompetitif Enzim İnhibisyonu (11)



### ***Unkompetitif (Yarı Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu***

Bu enzim inhibisyonunda inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde unkompetitif inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra substratın enzime bağlı olduğu aktif merkezden başka enzimin aktif bölgesine yerine tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder. Unkompetitif inhibisyon sonucu  $V_{\max}$  değeri azalırken  $K_m$  değeri de küçülür (11).



**Şekil 1.11** Unkompetitif Enzim İnhibisyonu (11)

### ***1.1.5.2. Tersinmez (Geri Dönüşümsüz) Enzim İnhibisyonu***

Tersinmez enzim inhibisyonu, tersinmez inhibitörün enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla tersinmez olarak birleşmesi sonucu meydana gelir. Bu tip inhibisyonlarda aktif bölgeye kovalent olarak bağlanan inhibitör, enzim yapısını bozduğu için geri dönüşüm olmamaktadır (11). Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat (DİFP), enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi ile reaksiyona girerek enzimi inaktive eder (1).

### 1.1.6. Enzimlerin Kullanım Alanları

Bugün tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan vb. birçok endüstriyel alanda enzimler kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanında gelişmelerle elde edilen enzimlerin kullanımının en fazla olduğu alan gıda endüstrisidir. Proteazlar ve amilazlar bu alanda en çok kullanılan enzimlerdir (19). Enzimler, birçok gıdanın yapısında çok az bulunmalarına rağmen gıdalarda önemli görevler üstlenirler. Enzimler, gıdaların doğal yapılarını değiştirebilir ve bazı örneklerde bu değişiklikler kabul edilebilir ama birçok örnekte bu durum istenmez. Bu nedenle istenmeyen durumlarda enzimler inaktive edilirler. Bitkilerin kararması, istenmeyen değişikliklere bir örnektir. Bazı enzimler analitik metodlarda indikatör olarak kullanılır. Örneğin, fosfataz enzimi pastörizasyon işlemlerinde kullanılır.

Enzimler, gıda imalatında katkı maddesi olarak da kullanılırlar. Örneğin, rennin enzimi peynir üretimi sırasında sütte koagülan olarak kullanılır (20).

Yine enzim kullanımının en fazla olduğu alanlardan birisi de deterjan endüstrisidir. Deterjanlar, kullanılacakları alana göre bileşimi değişen kompleks karışımlardır. Bazı deterjanlar alkali koşullarda aktivite gösteren alkali-proteaz (bazik) enzimlerini içerirler. Bazı deterjanların yapımında da amilaz ve lipazlar kullanılmaktadır. Bu enzimlerin etkisi ile özellikle protein, yağ ve nişastanın tesiriyle oluşan kirlilik etkisi bir şekilde temizlenir.

Yapılan pek çok araştırma sonucunda, enzimlerin kullanım alanları giderek artmaktadır. Özellikle son yıllarda rekombinant-deoksiribonükleik asit (DNA) teknolojisine paralel olarak, yeni ve istenilen özellikte enzim elde edilmesi mümkün olmaktadır; buna bağlı olarak da enzim kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (19).

Enzimlerden tıp alanında gittikçe artan bir ölçüde yararlanılmaya başlanmıştır. Enzimlerin nitelik ve nicelik tayinlerinin yapılabilmesi suretiyle kalıtsal anormallikler ve hastalıkların teşhisleri yapılabilmekte ve hastalığın geleceği hakkında fikir edinilebilmektedir. Bunun gibi bazı hastalıkların tedavisinde de enzim preparatlarından ilaç olarak yararlanılmaya başlanmıştır (18).

Kalıtsal olarak enzim yetersizlikleri sonucu ortaya çıkmış bulunan birçok hastalık, bu enzimlerin veya bunların katalize ettikleri reaksiyon ürünlerinin veya substratlarının gösterdikleri azalma veya artışa göre teşhis edilebilirler. Özellikle amino asitlerin metabolizmaları için gerekli enzimlerin bulunmayışı çoğu kez zeka ve gelişim geriliği ile kendini belli eden kalıtsal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aynı şekilde enzim yetersizliği, karbohidratlarla ilgili olarak glikojen depolama bozukluklarına neden olabilir. Lipid metabolizması yönünden de enzim yapımındaki yetersizliklerden doğan Gaucher (Dalak karaciğer ve kemik iliği hücrelerinde glukozilseramid birikimi ile oluşan genetik bir hastalık), Niemann- Pick (Sinir sisteminde kalıcı bozukluğa, karaciğer ve dalak büyümesine yol açan kalıtsal bir hastalık) ve Tay-Sachs (Ölümcül resesif bir hastalık) gibi hastalıklardan söz etmek mümkündür (11).

Eczacılıkta da enzimler kullanılmaktadır. Bu alandaki en iyi örnekler, hazım kolaylaştırıcı bazı ilaçların bileşimindeki besinlerimizin temel bileşenlerinden olan proteini parçalayan proteaz, nişastayı parçalayan amilaz, yağları parçalayan lipaz ve laktozu parçalayan laktaz enzimleridir. Enzimlerin eczacılıkta kullanımına bir diğer örnek de, penisilin amidaz enzimidir (19).

Eczacılık alanında bazı enzimler ilaç olarak kullanılabilir. Karaciğer, safra kesesi, pankreas hastalıklarından kaynaklanan sindirim bozukluklarında protein, karbohidrat ve lipidleri hidroliz eden enzimler ilaç olarak kullanılır. Yara tedavisinde, dokunun oluşması için peptit bağlarını ve heteropolisakkaritleri hidroliz eden enzimler kullanılmaktadır. Enzim inhibitörleride, ilaç olarak kullanılabilir Tablo (1.1) (12).

**Tablo 1.1** İlaç Olarak Kullanılan Enzim İnhibitörleri (12)

İlacın Adı	İnhibe Ettiği Enzim	Tedavi
Aspirin	<i>Prostaglandin Redüktaz</i>	Antienflamatuvar
Sülfanilamid	<i>Dihidrofolat Sentetaz</i>	Antibakteriyel
Hidrazinler	<i>Monoamin Oksidaz (MAO)</i>	Antidepresan, Psikostimulan
Anjiotensin Dönüştürücü Enzim (ACE ) İnhibitörleri	<i>ACE</i>	Antihipertansif

### 1.1.7. Hastalık Tanısında Enzimler

Enzimler genellikle hücrelerin içinde çok miktarda bulunurlar, plazmadaki konsantrasyonları ise hücre içindekine göre çok düşüktür. Hücre zarar gördüğü zaman (örn. virüs veya toksinle) hücre zarı parçalanır ve hücre içindeki enzimler dışarı çıkarlar, böylece plazma seviyeleri aniden  $10^3$ - $10^4$  kat artabilir. Buna iki örnek, hepatit ve miyokard infarktüsü (Mİ)'dür. Mİ'nde koroner arterlerden biri bir pıhtı ile tıkanır ve kalbin o arter tarafından beslenen bölgesi oksijensiz kalır (İskemi). Bunun sonucunda o bölgedeki hücreler hızla bozulmaya başlar ve nekroz olur. Hücrenin içindeki enzimler hücre dışına çıkarlar. Hücre dışı sıvıdan sistematik dolaşıma geçen enzimlerin serum düzeyleri hızla artar. Bu ani artış hastalık tanısında kullanılan çok önemli bir parametredir. Aynı şekilde virüs veya herhangi bir toksinle infekte olan karaciğer hücreleri de nekroz olarak enzimlerini hücre dışına çıkarırlar.

Hastalık tanısında en çok kullanılan enzimler;

***Serum pankreas amilazı:*** Bazı pankreas kanserlerinde ve pankreas iltihabında artar.

***Serum asid fosfataz ve prostat spesifik antijen (PSA):*** Prostat kanserinde artar.

***Kreatin kinaz (CK):*** Kas distrofinde, karaciğer hastalıklarında ve miyokard infarktüsünde artar.

*Glutamat okzalasetat transaminaz; Aspartat transaminaz (GOT; AST):* Miyokard (kalp kası) infarktüsünde, karaciğer hastalıklarında ve sarılıkta artar.

*Laktat dehidrojenaz (LDH):* Kalp, karaciğer, kas hastalıklarında ve bazı kanserlerde (örn. lösemi) artar (12).

## **1.2. Proteazlar**

Proteazlar, proteinlerin yapısındaki peptit bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimlerdir (21).

Proteazlar, fizyolojik olarak temel ve bulunması zorunlu moleküller olduklarından, virüsler, prokaryotlar, mantarlar, bitkiler ve hayvanları kapsayan çok çeşitli organizmalarda ve organizmanın birçok kısımlarında meydana gelirler. Hücrenin normal fizyolojik gelişiminde, başkalaşımında, protein katabolizmasında, yer değiştirmesinde, doku düzenlenmesinde ve gelişme sürecindeki morfojenезде kompleks proseslerden sorumludurlar (22,23).

Memelilerin sindirim sistemlerinde çok önemli bir role sahip olan proteaz enzimi, mide ve pankreasta bol miktarda üretilerek besinlerdeki protein içeriğinin yapı taşlarına ayrılmasını sağlar (24).

Proteazlar genel olarak akışkan olmayan ortamlarda çok düşük hızda reaksiyon verirler veya inaktive olurlar. Bu nedenle kullanılan çözücüye dirençli proteazların araştırılması güncel bir çalışma alanıdır (21).

Ticari alanda dünya çapındaki proteolitik enzim üretim miktarı biyoteknolojide kullanılan herhangi bir diğer enzim miktarından daha fazladır (25). Bugün çeşitli endüstri sektörlerindeki enzim satışlarının yaklaşık %40'ını proteazlar oluşturur. 1914 yılında ilk kez deterjan katkı maddesi olarak uygulanmalarından beri, bu enzimler deterjan endüstrisinde geniş bir alanda kullanılmaktadırlar (22).

Boynuz, tüy, tırnak ve sa gibi lifsel proteinler doğada atık olarak oldukça bol miktarda bulunurlar. Bu atıklar bazı mikroorganizmalardan elde edilen proteazlarla kullanılabilir hale dönüştürülebilir veya yok edilebilirler. Proteazların proteolitik aktivitesi ile protein içerikli bu atıkların parçalanarak giderimi sağlanmaktadır. Bu etkileri ile proteazlar son zamanlarda atık yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kümes atıklarının düzenlenmesi proteazların kullanım alanları arasındadır, bu yolla atıklar ve tüy birikintileri giderilebilmektedir.

Proteazlar fotoğrafçılık sektöründe de kullanılmaktadır. Fotoğraf filmleri üzerinde önemli miktarda gümüş bulunmektedir. Filmlerin yakılması ile yüzeyindeki gümüş geri kazanılmakta ancak bu yöntemle evre kirliliğinin artmasına yol açılmaktadır. Bu işlemede proteazların kullanılması, gmn geri dönüşümü için evre dostu bir yöntem olarak görülmektedir. Filmler zerindeki jelatinin enzim tarafından parçalanması ile üzerinde bulunan gümüş kolayca geri kazanılmaktadır.

Deri endüstrisinde deride istenilmeyen pigmentlerin yok edilmesi, deri yüzeyinden kılların ve tüylerin uzaklaştırılması ve daha düzgün, kullanışlı bir deri yüzeyinin elde edilmesi halen kullanılan toksik kimyasalların yerine proteazların kullanılmaları yeni bir gelişmedir ve proteazlara ilaveten biyoteknolojik önem kazandırmaktadır (21).

Hastalık yapan bakterilerin yaşam döngülerindeki ilişkileri, kanser ve AIDS gibi ağır hastalık vakalarına karşı terapötik ajanlar geliştirmek proteazların potansiyel bir hedef olmalarına izin verir. Geniş eitlilikleri ve özgüllükleri efektif terapötik ajanlar geliştirmede büyük bir avantaj olarak kullanılır (23,26,27).

Bir diğer keşfedilen alan ise proteazların ipek kumaş endüstrisinde ipeğin zamklanması için kullanılmasıdır (24).

Ayrıca, endüstri ve tıp uygulamalarından başka proteazlar temel araştırmalarda da önemli bir rol oynarlar.

Proteazların seçici peptit bağı kırınımları, proteinlerin dizilimi ve yapı-fonksiyon ilişkilerini aydınlatmada kullanılmaktadır (28).

### **1.2.1. Proteazların Sınıflandırılması**

Proteazlar kabaca aktif bölgelerine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Fonksiyonel gruplarındaki aktif bölgeye dayanarak proteazlar ayrıca; serin proteazlar (E.C.3.4.21.), sistein proteazlar (E.C.3.4.22.), aspartat proteazlar (E.C.3.4.23.) ve metallo proteazlar (E.C.3.4.24.) şeklinde sınıflara ayrılırlar (29).

#### ***1.2.1.1. Ekzopeptidazlar***

Ekzopeptidazlar polipeptit zincirinin amino ya da karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederler. Proteinin amino ucundaki peptit bağlarını hidroliz eden ekzopeptidazlar, aminopeptidazlar; karboksil ucundaki peptit bağlarını hidroliz edenler ise karboksipeptidazlar olarak adlandırılırlar (21).

#### ***1.2.1.2. Endopeptidazlar***

Endopeptidazlar, ekzopeptidazların aksine amino veya karboksil uçlarında bulunan peptit bağları yerine iç kısımlarda bulunan peptit bağlarını hidroliz ederler (21).

#### ***1.2.1.3. Sistein Proteazlar (E.C.3.4.22)***

Sistein proteazlar, tiol proteazlar olarak da bilinir ve aktif merkezlerindeki sistein (Cys), histidin (His) ve aspartik asitten (Asp) oluşan üçlü katalitik yapıları ile karakterize edilirler. Sistein, substrat ile kompleks oluşturulmasında etkili olmakta ve aktif merkezlerinde bir -SH grubu içerdiklerinden ve bu grup ağır metal iyonları ve yükseltgeyici ajanlarla kolayca inhibe edildiğinden önemli enzimlerdir (21).

#### ***1.2.1.4. Aspartat Proteazlar (E.C.3.4.23)***

Aspartat proteazlar asit endopeptidazlar olarak da bilinirler. Bu enzimlerin katalitik bölgeleri iki Asp içerir ve bu proteazlar genellikle düşük pH değerlerinde aktivite gösterirler. Molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında olup; pepsin, katepsin D ve E ile rennin aspartat endopeptidazlar bilinen örnekleridir (21).

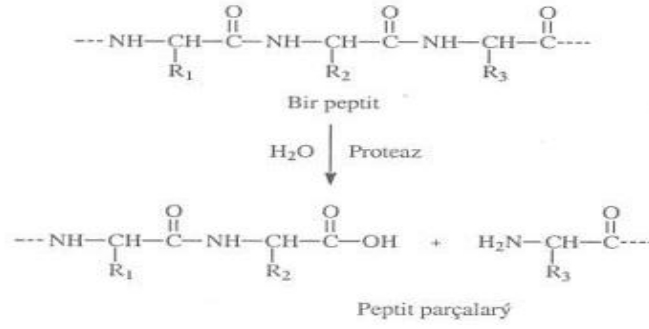
#### ***1.2.1.5. Metallo Proteazlar (E.C.3.4.24)***

Bu grup, etki mekanizması yönünden diğer proteazlara göreceli olarak, en çok farklılık gösteren enzimleri içerirler. Metallo proteazlar aktiviteleri için iki değerlikli katyonlara gerek duyan enzimlerdir. Metallo proteazların yapısında katyon olarak genellikle çinko ( $Zn^{+2}$ ) bulunmaktadır. Bunlar etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi, şelat yapıcı ajanlar tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Bu grup içinde bulunan 30 adet enzim ailesinden 17 tanesi endopeptidaz, 12 tanesi ekzopeptidaz ve birisi hem endopeptidaz hem de ekzopeptidazdır (21).

#### ***1.2.1.6. Serin Proteazlar (E.C.3.4.21)***

Serin proteazlar, katalitik mekanizmaları ayrıntılı bir şekilde bilinen proteolitik enzimlerdir. Aktif bölgelerinde serin (Ser) biriminin varlığından dolayı bu ad ile bilinirler. Tripsin, kimotripsin ve elastaz gibi enzimler birer serin proteaz olarak tanımlanır. Bu enzimler peptit zincirlerindeki peptit bağlarına karşı ilgi duyar ve birbirlerine oldukça benzer mekanizmalar üzerinden bir peptit hidrolizini katalizler (Şekil 1.12) (10).





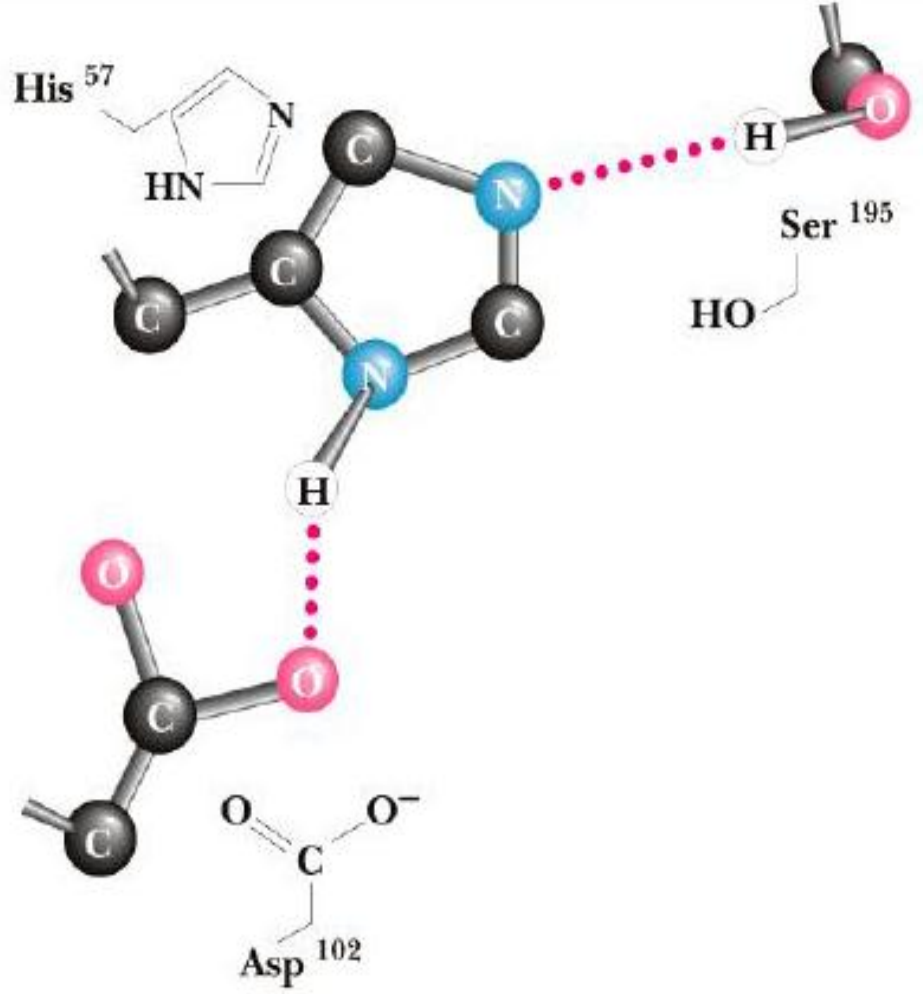
**Şekil 1.12** Proteazların Katalizlediği Reaksiyon (10)

Alkali pH değerlerinde aktif olan bu enzimler geniş bir substrat çeşitliliğine sahiptir, molekül ağırlıkları ise çoğunlukla 18-35 kDa aralığındadır (21). Optimum pH'ları ise 7 ile 11 arasındadır. İzoelektrik noktaları genellikle 4 ile 6 arasında değişmektedir (23).

Serin proteazların aralarında virüsler, bakteriler ve ökaryotlar gibi organizmalarında bulunduğu birçok canlı türü için yaşamsal oldukları öne sürülmektedir (30).

Serin proteazlar bir cep şeklindeki aktif bölgelerinde oldukça korunmuş Histidin (His), Asp ve Ser şeklinde üç polar amino asit içerir ve bu üç amino asit katalitik üçlü olarak tanımlanır (Şekil 1.13) (10). Bu yapı içinde Ser, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir elemandır (21). Bu üç amino asidin geometrik şekillenmeleri aynı olsa da, protein katlanmaları biraz farklıdır (23).

Son yıllarda aktif merkezinde Ser-His-Glu (Glutamat), Ser-Lys (Lizin)/His, His-Ser-His gibi amino asitler olan serin proteazlar da bulunmuştur (31).



Şekil 1.13 Serin Proteazların Aktif Merkezi (31)

Serin proteazlar, belirli sınıf amino asitlerle bağlı olan peptit bağlarını hidrolizlemeyi tercih eder. Tripsin benzeri grup da proteaz, arginin veya lizin gibi bazik amino asitlerden sonraki peptit bağlarını parçalar. Çünkü substrat bağlama merkezinde bu kalıntılarla güçlü bir elektrostatik bağ oluşturabilen bir Asp (veya Glu) bulunmaktadır (32).

Kimotripsin gibi proteazlar non-polar bir substrat bağlama cebine sahiptirler, bu nedenle triptofan, fenilalanin, lösin gibi aromatik aminoasitlere ihtiyaç duyarlar. Elastaz gibi enzimler ise bağlanma bölgelerinde hacimli aminoasitlere (valin ya da treonin) sahiptirler, bu nedenle de alanin gibi küçük hidrofobik kalıntılara ihtiyaç duyarlar (30).

Serin proteazlar DİFP, fenilmetilsülfonilflorür (PMSF) ve tosil-L-lisin klorometil keton (TLCK) tarafından geri dönüşümsüz olarak inhibisyona uğrarlar (21). Bazı serin proteazlar aktif bölgelerinin yanında Cys kalıntıları bulunmasından dolayı p-kloromerküribenzoat (PKMB) gibi bazı tiyol ayıraçları tarafından inhibe edilirler (23). Ayrıca Japon deniz süngerinden (*Theonella*) izole edilen *cyclotheonamides* E2 ve E3 cinsleri de iki yeni serin proteaz inhibitörleridirler (33).

Serin proteazlar, yüksek organizmaya sahip canlılarda çeşitli bir dizi fizyolojik fonksiyonu yürütürler. Bunların arasında en iyi bilinenleri; sindirim, kan pıhtılaşması, fibrinoliz, fertilizasyon ve immun sistemi tamamlayıcı aktivasyonlardır (32).

Serin proteazlar arasında etkileşimler yaygındır ve serin proteazların substratları bazen diğer serin proteazlardır; bunlar inaktif bir zimojen tarafından aktive edilir. Serin proteazların metabolik kaskad yollarındaki gereklilikleri iyi şekilde belgelenmiştir. Kan pıhtılaşması kaskadı önemli bir örnektir. Kan pıhtıları bir seri zimojen aktivasyon sayesinde oluşurlar. Bu enzimatik kaskadta bir etmenin aktif hali bir sonraki etmenin aktivasyonunu katalizler. Burada plazminojen aktivatörlerinin aktivasyonu plazminojenin plazmine dönüşümüne neden olur. Plazmin, fibrin pıhtısının çözülmesi için gereklidir.

Serin proteazların sindirimdeki rolü; bütün pankreatik zimojenlerin (tripsinojen, kimotripsinojen, proelastaz ve prokarboksipeptidaz) yaygın bir aktivatörü olan tripsin etkisiyle sağlanır. Proteazların düzenli etkilerine bir diğer önemli örnek ise apoptozis yoludur. Bağırsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozis yoluyla gerçekleşir (32,34,35).

Serin proteazların yapısal karakterizasyonları ve lokalizasyonlarının kapsamlı analizleri; onların gen ifadeleri, fizyolojik ve patolojik durumlarla olan ilişkilerini anlamamızda ilk adımlardır (36).

### ***1.2.1.6.1. Serin Proteazların Etki Mekanizması***

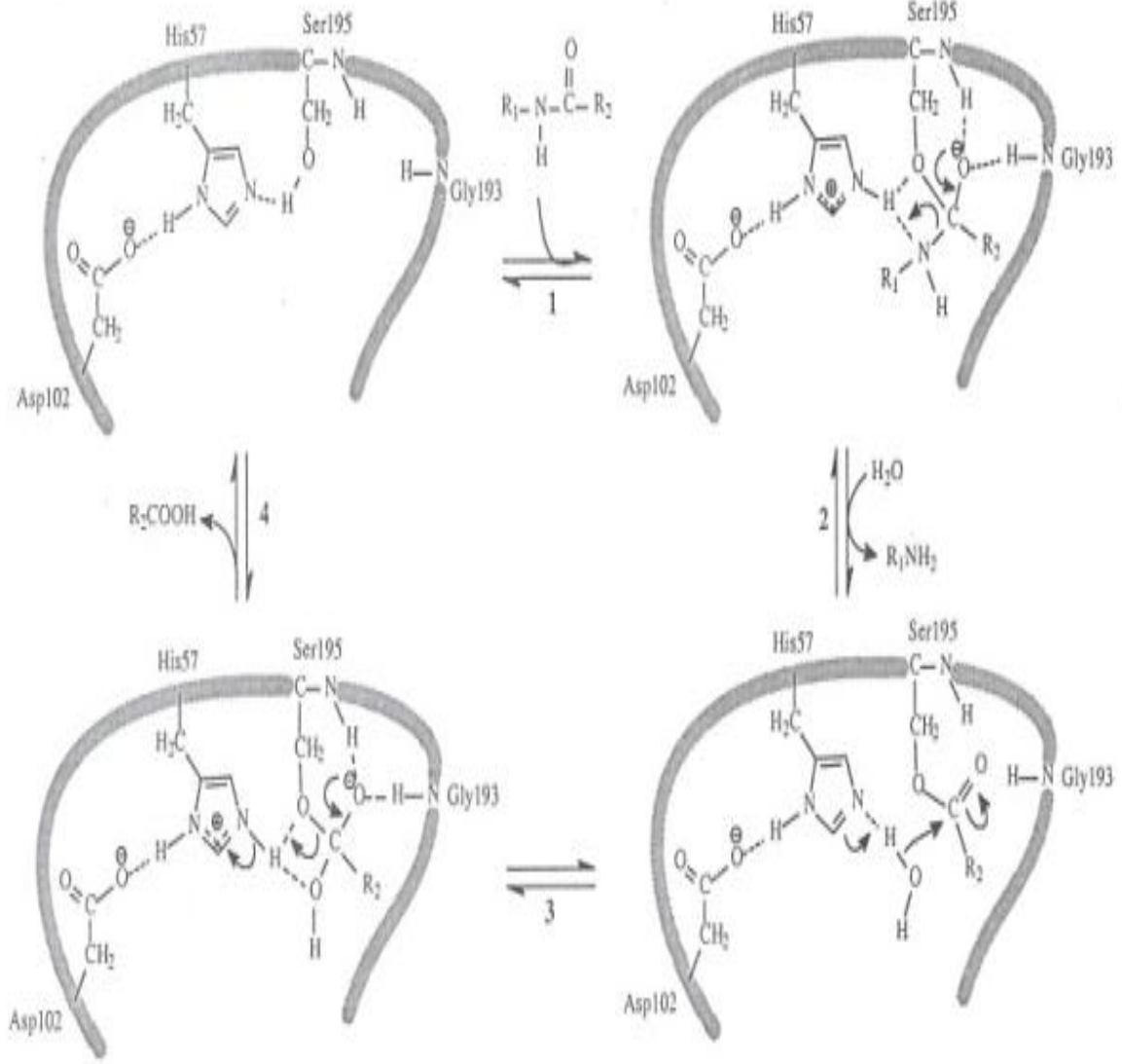
Bütün proteazların herhangi bir peptit bağımlı hidrolize edebilmeleri için üç engeli aşmaları gerekir. Bunlar;

1. Amid azotundan karbonil grubuna elektron aktarımı olduğundan amid bağları çok dayanıklı bağlardır. Proteazlar bir amid bağımlı karbonil oksijeninin genel bir asit ile etkileşmesi ile aktif hale getirirler ve peptit bağımlı kırılmasını sağlayarak rezonans stabilizasyonunun bozulmasına yol açabilirler.

2. Su zayıf bir nükleofildir; proteazlar genellikle genel bir baz ile suyu aktifleştirirler.

3. Aminler kolay ayrılan gruplardır; proteazlar aminler ayrılmadan önce onları protonlarlar. Serin proteazlar bu görevlerini, amino asit veya peptit parçası kaybı ile kovalent şekilde bağlanmış bir enzim-peptit ürününün oluştuğu bir hidroliz için iki-adımlı bir reaksiyonu takip ederek etkili biçimde yerine getirir. Bu açılma basamağını peptidin hidrolizine sebep olan, ara ürüne su tarafından gerçekleştirilen nükleofilik bir saldırının olduğu deaçilasyon prosesi takip etmektedir (30).

Aktif bölgedeki Asp birimi hidrojen bağı ile His yan zincirini belli bir konumda tutar. Parçalanacak substrat aktif bölgeye yaklaştığında His birimi genel bir baz gibi rol oynayarak Ser yan zincirinden bir proton koparır ve böylece Ser yan zincirinin peptit karbonil karbonuna saldırısı için daha nükleofilik yapar. Hemen sonra His yan zincirine katılan proton, oluşan negatif yüklü peptidin amid azotuna transfer olur ve protonlanmış bir amin oluşturur. Peptidin bir parçası bu aşamada ayrılır ve diğer parçası Ser ile bağlanmış olarak kalır. Bu ara ürün kararlı olmasına rağmen bir su molekülünün karbonil karbonuna nükleofilik saldırısı ile bir başka tetrahedral ara ürün oluşmasını sağlar. Bu basamakta His yan zinciri bir genel baz gibi davranarak su molekülünden bir proton koparır. Son olarak His yan zinciri bu protonu Ser yan zincirindeki oksijene salıvererek Ser ile bağlı diğer peptit parçasının ayrılması sağlanır (10).



**Şekil 1.14** Serin Proteaz Reaksiyonunun Basitleştirilmiş Katalitik Mekanizması (10)

### 1.3. Elastazlar

Elastazlar, bağ dokunun önemli proteini olan elastini ayırma özelliğine sahip bir grup serin proteazlardır. Bunlar çoğunlukla akciğerlerde, damarlarda, lenflerde ve deride dağılmış durumdadırlar. Buldukları dokularda enflamatuvar doku hasarının çok önemli mediatörleridirler (37-39).

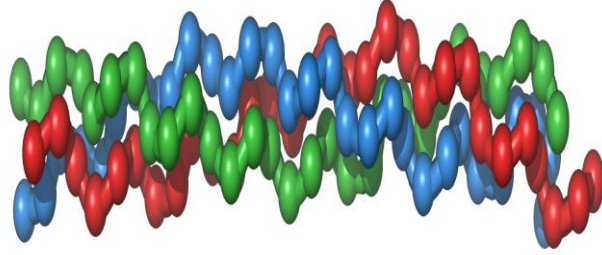
Bağ doku, nispeten az sayıda canlı hücrenin ekstrasellüler matriks denen bir ortam içine dağılmasıyla oluşmuş dokudur. Bağ doku, deri, tendonlar, ligamentler, kıkırdak ve kemikte yaygın olarak bulunur. Bağ dokunun başlıca görevi, diğer dokulara destek olmaktır ki bu görevini ekstrasellüler matrikste yer alan kollajen ve elastin gibi fibriler proteinlerle yerine getirir. Bağ dokunun ana maddesi, büyük ölçüde glikozaminoglikan (mukopolisakkarit) içerir. Bağ dokuda en fazla bulunan glikozaminoglikanlar, hiyalüronik asit ve kondroitin sülfat polimerleridir. Hiyalüronik asit, göz sıvısında, göbek kordonunda, sinoviyal sıvıda ve bazı tümörlerde bol bulunur (40). İnsan ve memeli hayvan bağ dokusunun ve özellikle kıkırdağın başlıca maddesi olan ve polisakkarit sınıfında bulunan kondroitin sülfatla, proteinlerle birleşmiş olarak bulunurlar (1). Bağ doku, galaktoz ve mannoz içerir. Bağ dokunun önemli bazı proteinleri, kollajen, elastin, fibronektin, laminin ve proteoglikanlardır (40).

Kollajen, tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit, fibriler skleroproteindir. Kollajen, hayvanlar aleminde çok yaygındır; memeli hayvanların vücut ağırlığının %6'sını, tüm vücut proteinlerinin %30'unu oluşturur.

Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptit alt biriminden oluşan büklümlenmiş kangal olan üçlü sarmaldır. Kollajenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, deride ve tendonlarda birbirine paralel demetler halinde; akciğerlerde düzensiz bir şekilde; korneada ortogonal tabakalar halinde; kıkırdakta gevşek ağ yapısında; kemik ve dişlerde kalsiyum fosfat kristalleri için matriks oluşturacak şekilde yerleşirler. Kollajen, soğuk suda çözünmez, sıcak suda ve seyreltik asit çözeltilerinde ve alkalilerle kaynatmakla jelatin oluşturur; jelatin de suda kolaylıkla çözünerek koloidal jel çözeltileri oluşturur.

Kollajen, bulunduğu dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur ve dokuya gerilme direnci sağlar. Kollajen, kanın pıhtılaşmasında etkilidir; kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır, kan pıhtısı zamanla büzüldüğü halde kollajen lifleri ağı zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter. Kollajen, yaraların iyileşmesinde de rol oynar.

Kollajen, kondroitin sülfatla 1:1 oranında birleşerek kırırdağı, 9:1 oranında elastin alarak tendonları, kendinin 4 katından çok hidrate kalsiyum fosfat alarak kemikleri oluşturur; deride ise kendisi kadar dermatan sülfat ve 9:1 oranında elastinle birlikte (40).

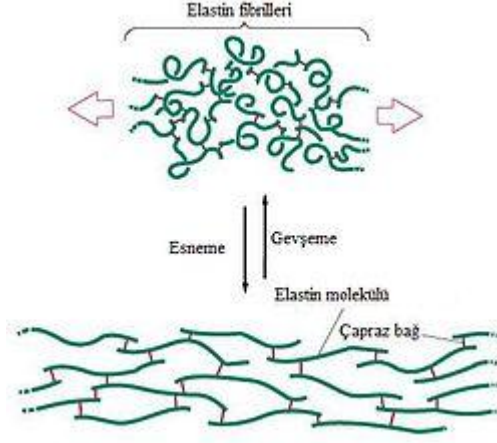


**Şekil 1.15** Tropokollajenin Üçlü (Triplet) Heliks Yapısı (41)

Elastin, fibroblast hücreleri tarafından üretilen yapısal bir proteindir. Elastik bağ dokunun en önemli fibriler skleroproteinidir. En çok bağ dokunun hücrelerarası maddesinde yer almaktadır. Elastin, bulunduğu dokulara (damarlar, deri, akciğer ve diğer esnek dokular) esneklik (elastikiyet) sağlar. Elastinin esnekliği çapraz desmozin bağları ve amorf yapısından kaynaklanır.

Elastin proteininde iki bölüm vardır:

- 1. Hidrofobik Bölüm:** Molekülün esneklik özelliğinden sorumludur.
- 2. Alfa-Helikoidal Bölüm:** Bol miktarda çapraz bağların oluşumunu sağlayan lizin ve alanin amino asitlerini içerir (42).



**Şekil 1.16** Elastinin Yapısı (42)

Elastin, birçok yönlerden kollajene benzer, aralarında yapı bakımından birkaç temel fark vardır (Tablo 1.2) (40).

**Tablo 1.2** Kollajen ve Elastin Arasındaki Farklılıklar (40)

<b>Kollajen</b>	<b>Elastin</b>
Pek çok genetik tip	Tek genetik tip
Üçlü heliks	Uzamaya izin veren dağınık helezon şekilleri
(Gly-X-Y) <sub>n</sub> tekrarlayan yapısı	(Gly-X-Y) <sub>n</sub> tekrarlayan yapının olmayışı
Hidroksilizin varlığı	Hidroksilizin yoktur.
Karbohidrat taşır	Karbohidrat taşımaz.
İntramoleküler aldol çapraz bağlantıları	İntramoleküler desmozin çapraz bağlantıları

Elastinin molekül ağırlığı yaklaşık 68 kDa'dur ve yaklaşık 750 amino asit kalıntısından oluşur. Bunların en başında alanin, prolin, glisin gibi hidrofobik amino asitler bulunur. Bu yüzden de elastinin diğer bir özelliği hidrofobik ve fibril protein olmasıdır. Daha az miktarda olmasına rağmen, lizin amino asiti proteinin yapısında büyük önem taşımaktadır. Dört lizin molekülü bir araya gelince ortaya çapraz desmozin bağı gelir. Lizin genellikle her elastin fibrili ucunda yer alır, bu da fibrilleri



birbirlerine bağlar. Bu yüzden, elastin liziloksidaz enzimi tarafından parçalanabilir. Az miktarda hidroksiprolin bulundurulur.

Elastinin biyosentetik öncüsü tropoelastindir. Tropoelastin hidrofobik değildir, tam tersine hidrofildir ve üretimi hücrelerarası maddesinde gerçekleşir. Üretiminden hemen sonra fibroblast zarının yanında elastik fibril oluşturur.

Tropoelastin fibrilleri birbirlerine çok bağlıdır ve desmozin köprülerinin oluşumunu sağlarlar (42).

Elastinin yıkımı, elastaz vasıtasıyla gerçekleştirilir. Pankreastan salgılanan proelastaz, tripsin ile aktive edilerek elastaza çevrilir. Elastaz, özellikle elastin için proteolitik bir proteazdır; valin ve alanin gibi alifatik yan zincirli amino asitlerin karboksil ucundan moleküllü parçalar; desmozin ve izodesmozin içeren çapraz bağlı peptitler oluşturur. Elastin, pepsin ile yavaş olarak hidroliz olur; ancak tripsin ve kimotripsin ile parçalanmaz (40).

Elastin proteininin bozulması veya yokluğu bazı hastalıklara yol açar. Williams Sendromunda eksik olan 25 genden biri elastindir ve bu sendromda görülen bağ doku kardiovasküler bozukluklara neden olur. Alfa<sub>1</sub>-antitripsin eksikliği, elastinin proteazlar tarafından yıkımına ve akciğer anfizemine yol açar. Marfan Sendromu fibrillin geni FBN1'deki bir mutasyondan kaynaklanır, bunun sonucu meydana gelen bir enflamasyon reaksiyonunda elastin molekülleri proteolize uğrar (42).

Tarihi olarak, elastini hidroliz eden herhangi bir proteinaza “*elastaz*” denir. Fakat artık bu isim, spesifikliklerine göre birbirlerinden ayrılan enzimler grubuna verilmektedir. Pankreatik elastaz (E.C.3.4.21.36) (pankreatopeptidaz E, pankreatik elastaz I), elastin dahil proteinlerin hidrolizlerini Ala-|-Xaa segmentinden gerçekleştirir. Pankreatik elastaz II (E.C.3.4.21.71) ise lösin, metiyonin ve fenilalaninin karbonil gruplarını seçimli olarak ayırır. Lökosit elastaz (E.C.3.4.21.37) (lizozomal elastaz, NE, medullasin), elastin dahil proteinlerin hidrolizlerini Val-|-Xaa segmentinden gerçekleştirir. Elastaz III (E.C.3.4.21.70) (pankreatik endopeptidaz E) ise Ala-|-Xaa segmentinden proteinleri parçalar, fakat elastini hidroliz edemez (43).

### 1.3.1. Pankreatik Elastaz (E.C.3.4.21.36)

Pankreatik elastaz 240 amino asitin 4 disülfür köprüsüyle birbirine çapraz bağlandığı bir tek polipeptid zinciri içeren küresel bir proteindir. Diğer proteinazlar tripsin ve kimotripsin gibi; pankreatik elastazlar da hidrofobik bir merkeze ve geniş benzerlik dizilerine sahiptirler. Pankreatik elastaz tersiyer yapılı bir proteindir. Bu enzim domuz pankreasında pre-proelastaz olarak sentezlenir; enzim proelastaz safhasından sonra zimojen granüllerde depolanır ve daha sonra duodenumlarda tripsin etkisiyle aktif elastaz haline dönüştürülür. Bu proses tripsinojen ve kimotripsinojenin N terminalinin sonundaki molekülün küçük peptit aktivasyonunun yer değiştirmesiyle sonuçlanan prosese benzer ve enzime kendi doğal yapısını kazandırır. Pankreatik elastazın bu iki formu katalitik özellikleri bakımından farklılık gösterir.

Pankreatik elastaz, prostetik grup ya da metal iyonu içermez. Enzimatik aktivitesi sadece 3-boyutlu yapısındaki tek polipeptid zincirinden kaynaklanır. Bu yüzden herhangi bir yapı değişikliğinde ya da denatürasyonda aktivitesini kaybeder.

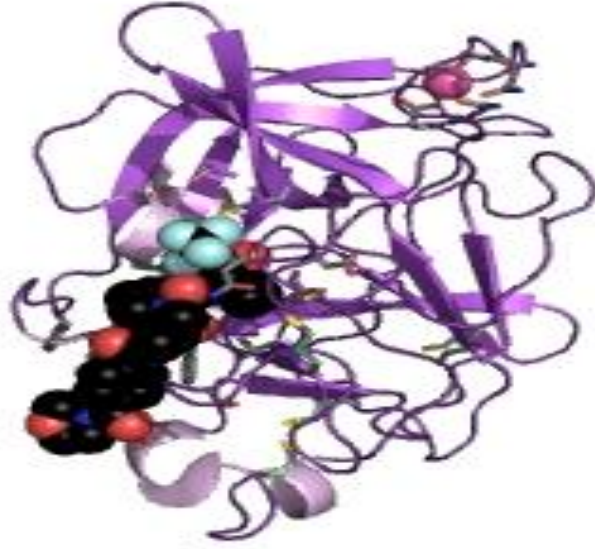
Pankreatik elastaz, geniş bir substrat özelliğine sahip bir serin proteazdır. Glisin, valin, lösin ve özellikle alanin gibi küçük hidrofobik zincirlere sahip amino asit kalıntılarının karbonil grubu sonlarındaki peptit bağlarını ayırır. Pankreatik elastazın yüksüz aromatik zincirlere olan geniş spesifitesi, yapısında çok sayıda alifatik zincir bulunduran elastini ayırabilen enzim olmasıyla açıklanır.

Pankreatik elastaz pH 4,0 ve 10,5 arasında 2°C'de 50 mg/mL tuz çözeltilerinde ve suda çözünebilir. Bu tip çözeltiler pH 6,0'nın altında uzun süre kararlı olarak kalmaktadır. Pankreatik elastaz, yüksek asidik ortamda yapı değişikliğinden kaynaklanan geri dönüşümsüz olarak inaktif forma geçer. Molekül ağırlığı; 25900 kDa, izoelektrik noktası;  $9,5 \pm 0,5$  ve optimum pH'ı 8,8 dir.

Pankreatik elastaz herhangi bir spesifik aktivatöre ihtiyaç duymaz. Ancak, hidroksimetil amino metan (Tris) çözeltisi, sodyum sülfat ya da sodyum dodesil

sülfat (SDS) varlığında pankreatik elastaz aktivitesinin iyi bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

Pankreatik elastaz, DIFP ve PMSF gibi sülfonilflorürler tarafından geri dönüşümsüz olarak inhibe edilir. Ayrıca elastinal, alfa<sub>1</sub>-proteinaz inhibitör ve alfa<sub>2</sub>-makroglobülin tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (44).



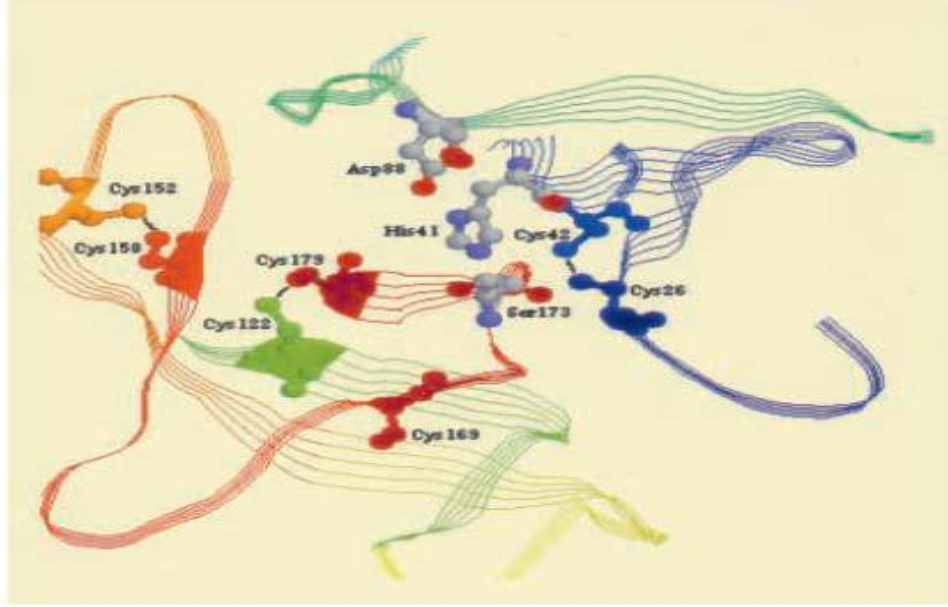
**Şekil 1.17** Domuz Pankreatik Elastaz Enziminin Kristal Yapısı (45)

### **1.3.2. Nötrofil Elastaz (E.C.3.4.21.37)**

NE, (E.C.3.4.21.37); elastin, proteoglikan, fibronektin, kollajen tip 1-4 bağ doku komponentlerini hidrolitik olarak parçalayan proteaz ailesinin bir granül serin proteazıdır (46). Enflamatuar doku hasarının çok önemli bir mediatörüdür. Normal şartlar altında matriks proteinlerinin dönüşümü ile ilgili bir enzimdir ve nötrofil sitoplazmasında lokalize olarak bulunmaktadır (47).

Enzim iki asparagin bağlı karbohidrat yan zinciri ve dört disülfür bağı içeren 218 amino asitten oluşmaktadır (48). NE, 30000 kDa ağırlığında, Asp, Ser ve His aminoasitinden oluşan katalitik üçlüye sahip olan çözülebilir bir glikoproteindir (Şekil 1.18) (49). NE, yaklaşık pH 10'da etkindir (50).

NE, enfeksiyonlu kısımlarda ya da diğerk zarar görmüş dokularda enflamasyonun erken dönemlerinde nötrofillerden salgılanır. Bu durumda polimorfonükleer lökositlerdeki konsantrasyonu çok yüksek olur ( $10^6$  hücrede 3 µg enzim) (51).



**Şekil 1.18** Nötrofil Elastazın Üç Boyutlu Yapısı (52)

NE'nin en önemli fizyolojik fonksiyonu, polimorfonükleer lökosit tarafından fagozite edilmiş immün kompleksler ve bakterileri ayırmasıdır. Enzim aynı zamanda lökositlerin kandan dokuya taşınmasında ve polimorfonükleer lökositlerin programlı ölümünde rol oynar. NE'nin farklı enflamatuar hastalıkların patojenezine dahil oldukları görülmektedir (53). Bunlara ek olarak; akciğerk amfizemi (KOA), kistik fibröz, akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), glomerülo nefrit, romatoid artrit (kireçlenme) ve enfeksiyon hastalıkları gösterilebilir (54).

NE'nin aktivitesi serpins (serin proteaz inhibitörleri) tarafından düzenlenir. Bu inhibitörler, alfa<sub>1</sub>-antitripsin (alfa<sub>1</sub>-proteinaz) ve salgı lökosit peptidaz inhibitörü (SLPI)'dür. Alfa<sub>1</sub>-proteinaz, karaciğerk hücreleri tarafından salgılanır; plazmada da bulunur. Makrofaj ve epitel hücrelerinde de sentez edilir (55). Kalıtsal inhibitör eksikliği olan hastalarda kullanılır (56). SLPI ise makrofajlarda ve akciğerk epitel hücrelerinde bulunur. Amfizemli hastalarda önemli rol oynar (55).

### 1.3.3. Pankreatik ve Nötrofil Elastaz Enzimlerinin İnhibitörleri

Çok sayıda protein yapıda proteinaz inhibitörü karakterize edilmiştir ve bunlar hali hazırda kayda değer bir şekilde dikkat çekmektedirler. Bu durum hedef proteinazların aktivitelerini düzenlemelerinden ileri gelmekte ve aynı zamanda yüksek çözünürlüklü yapı verisinin eldesi onları protein-protein etkileşimleri çalışmalarında uygun hale getirir (57,58).

Proteinaz inhibitörleri bakteriler, hayvanlar ve bitkiler arasında yaygın bir şekilde bulunurlar. Bunlar bitkilerin üreme, depolama ve vejetatif dokularında bulunurlar. Bir depolama proteini olarak savunmada ve düzenlemede rol oynarlar (59,60).

Protein proteinaz inhibitörlerinin çoğu serin proteinaz inhibitörleri olarak karakterize edilir ve bilinir. En az 18 farklı inhibitör ailesi ve bunlardan 12'si için en az 1 tane dördüncül yapı bilinir (58). Bovin pankreatik tripsin inhibitör (BPTI) bunlar arasında en çok üzerinde çalışılan proteinaz inhibitörlerindedir (61).

Birden fazla çeşit proteinaz inhibitörleri arasında serin proteinaz inhibitörleri, üzerinde en çok çalışılan ve baklagil tohumlarından izole edilen inhibitörlerdir (62-65). Serin proteinaz inhibitörleri çeşitli böcek enzimlerine karşı etkilidirler ve bu yüzden haşerelere karşı mücadelede alternatif yol aramak için kullanılırlar (66). Demir hindi (*Tamarindus indica*) bitkisinden izole edilen ve saflaştırılan serin proteaz inhibitörlerinin NE'ını inhibe ettiği bulunmuştur (67).

Kateşin ve epigallokateşin gibi yeşil çaydan (*Camellia sinensis*) izole edilmiş polifenollerin kollajenazın ve elastazın inhibitörleri oldukları bulunmuştur (68). Aselbent reçinesinden izole edilen ve boswellik asit olarak da bilinen triterpenoidler de anti-elastaz aktivitesine sahiptirler (69). Trabzon hurması (*Diospyros kaki*) yaprağından izole edilen polifenoller de anti-elastaz aktivitesi göstermişlerdir (70). Spektrofotometrik yöntemler kullanılarak biberiye bitkisinin (*Rosmarinus officinalis*) de iyi bir anti-elastaz aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (71).

Yerli sülük olan *Hirudo nipponia*'dan izole edilen guamerin olarak isimlendirilen inhibitörün NE ve domuz pankreatik elastazını inhibe ettiği bulunmuştur (72).

Elafinin serin elastazlarının güçlü bir inhibitörü olduğu kanıtlanmıştır. Bu inhibisyonda NE ve domuz pankreatik elastaz enzimleriyle birlikte elafin 1:1 molar kompleksler oluşturmuştur (73).

Glikozaminoglikan polisüfatların polianyonik polimerlerle elektrostatik etkileşimlerinden dolayı, NE'ı inhibe edebildikleri bildirilmiştir (74).

#### **1.3.4. Elastaz Enzimleriyle İlgili Klinik Çalışmalar**

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) patogeneziinde çok önemli rolü olan (NE), amfizemdeki elastolitik aktivitenin başlıca sorumlusudur. Bunun dışında mukus hipersekresyonu ve epitel hücrelerinden interlökin (IL 8) salınımına neden olur. Bu bulgular nedeniyle peptit ya da nonpeptit NE inhibitörlerinin KOAH'daki kullanımları araştırılmaya başlanmıştır (75).

Akut pankreatit, patogenezi halen kesin olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde en çok kabul gören görüş, pankreas içindeki inaktif proenzimlerin, aktif hale geçmeleri ve bezin kendi kendini sindirmesi olayıdır. Bu enzimler ya doğrudan zarar verirler ya da oluşturdukları enflamatuvar olayın sistemik yansımaları sonucunda şoka, solunum sıkıntısına, böbrek yetmezliğine, kardiyak aritmilere ve ölüme neden olurlar. Elastaz-1, özgün elastolitik aktivitesi olan ve aynı zamanda hemoglobin, kazein, fibrin ve albümini de yıkabilen bir enzimdir. Akut pankreatitte başlıca vasküler lezyonlardaki rolü 1968'de tanımlanmıştır. Radyoimmünolojik yöntemlerdeki son gelişmelere kadar, plazmada dolaşan inhibitör kompleksler nedeni ile serum elastaz düzeyleri doğru olarak ölçülememekteydi. Elastaz-1, akut pankreatitli bütün hastalarda, pankreas kanseri olan hastaların çoğunda ve daha az olmak üzere pankreatitli hastalarda yüksek oranlarda saptanmaktadır. Bu enzimin dikkate değer olmasının nedeni amilaz, lipaz ve tripsine kıyasla daha uzun süre serumda yüksek oranlarda bulunmasıdır. Elastaz-1, böbrek yetmezliği durumunda

diğer proteazlara göre daha az etkilenmektedir. Plazma elastazının uzun süreli varlığı geç dönemdeki pankreatit hasarını göstermede özel olarak faydalıdır (76).

Pankreatik elastaz-1, pankreas tarafından üretilen proteolitik bir enzimdir. Bağırsak pasajı sırasında stabildir ve duodenal sıvıdaki konsantrasyonundan daha az miktardaki enzim, dışkıda bulunur. Dışkıda elastaz-1 tayini pankreas ekzokrin fonksiyonunu değerlendirmede kullanılır. Kronik pankreatit, kistik fibroz, Tip-1 diyabet, kolelityazis, kalıtsal pankreatit, kronik enflamatuvar bağırsak hastalıkları, pankreas kanseri, otoimmün pankreatit, doğuştan pankreas yetmezliği ve savunma hücrelerinin azalması (Schwachman-Diamond Sendromu) ve mide asitinin artmasının (Zollinger-Ellison Sendromu) neden olduğu pankreas yetmezliğinde dışkıda elastaz-1 düzeyi azalır. Dışkıda pankreatik elastaz-1 tayininin, pankreas yetmezliği tanısındaki hassasiyetinin %90'dan fazla olduğu bildirilmiştir (77).

Kronik pankreatit; şiddetli olabilen karın ağrısı, pankreasta kalıcı fonksiyon bozukluğu ve yapısal değişikliklerin gözleendiği pankreasın kronik yani uzayan iltihaplı hastalığıdır. İlerleyici bir hastalıktır, çok nadiren geriler. Birçok faktör kronik pankreatit gelişmesine neden olabilir. Bunlar; alkol ve yağlı diyet, idiyopatik (sebebi bilinmeyen) kistik fibrozis, tümör ve travmalardır. Kronik pankreatitte karın ağrısı, kilo kaybı, sindirim bozukluğu ve steatore (dışkı ile aşırı yağ kaybı) gibi belirtiler gözlenir. Kronik pankreatit tanısında; fizik muayene, sekretin testi, serumda enzim ölçümü, dışkıda yağ tayini gibi testlere son dönemde de fekal elastaz testi olarak adlandırılan yeni bir test eklenmiştir. Bu test, pankreas bezinin fonksiyonunu görmeye ve pankreas hastalıklarının tayininde kullanılır. Pankreas yetmezlikleri ve kronik pankreatit tanısında fekal elastaz; i) intestinal geçiş sırasında miktarında herhangi bir değişiklik olmaması, ii) feçeste pankreatik sıvıdan 5-6 kez daha fazla bulunması, iii) uzun süre stabil kalması, iv) nispeten ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedenleriyle çok yararlı bir yöntemdir (78).

NE ve kanser hakkında yapılmış deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Kompleks olay serilerinin sonucunda neoplazmalar (yeniden oluşan doku) metastaza uğrar. Bu süreç için proteazları da içeren çeşitli yıkıcı enzimler gerekmektedir. NE, fizyolojik koşullarda geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir ve aşırı NE sadece

elastinin değil diğer ekstraselüler matriks proteinlerinin de sindirimi ile sonuçlanır. İnsan göğüs kanserinden, akciğer kanserine çeşitli hücre çizgileri immünoreaktif NE üretir. Kanser dokusundaki immünoreaktif NE miktarı, göğüs kanserli ve akciğer kanserli hastaların bağımsız prognostik bir indikatörüdür. Ayrıca, spesifik bir NE inhibitörü, ağır kombine immün yetmezlik sendromu taşıyan farelere nakledilmiş; kanser hücrelerinin gelişimini tamamen baskılamıştır. NE inhibitörünün kullanımı, kanserin istilasını ve metastazını önlemede umut verici bir yol olarak görülebilir (79).

Amfizem, akciğerlerdeki alveol kanallarının, alveol keseciklerinin genişlemesi (dilatasyonu) ve harabiyeti olarak tanımlanır. Bu harabiyet alveol duvarındaki elastin denilen kompleks protein yapılarının enflamatuar hücrelerden salınan elastaz enzimi tarafından bozunması ile ortaya çıkar. Hastalık sessiz ilerler ve ancak ileri evrelerde belirti verir. Bu belirtiler; nefes darlığı, solunum güçlüğü ve fiziksel aktiviteye bağlı olarak çabuk yorulmadır (80). Amfizemde ya proteolitik enzim salınımı artmıştır ya da antiproteolitik aktivitede azalma söz konusudur.

Bugün kabul gören proteaz-antiproteaz hipotezine göre nötrofil ve makrofaj gibi fagositik hücrelerden salgılanan proteolitik enzimler (elastaz, kollagenaz, tripsin) akciğerin yapısal proteinlerini yıkarlar. Akciğerlerin bağ dokusunun %20-30'unu elastin oluşturur. Elastin ile elastaz arasındaki reaksiyon sürekli devam eder ancak normalde elastin yeniden sentez edildiği için harabiyet oluşmaz. Doğal olarak proteazlar ile proteaz inhibitörleri arasında bir denge vardır (81). En önemli proteaz inhibitörlerinden biri alfa<sub>1</sub>-antitripsindir. Alfa<sub>1</sub>-antitripsin eksikliği olan bireyler sigara içtikleri takdirde amfizem gelişme riskleri çok artmıştır. Karaciğerde sentez edilen, serum ve dokularda yaygın olarak bulunan Alfa<sub>1</sub>-antitripsin, nötrofillerden salgılanan proteazların majör inhibitörüdür. Alfa<sub>1</sub>-antitripsin eksikliği ile ilişkili en yaygın fenotipli bireylerin %80'inde erken yaşta, sigara içmeyle şiddeti artan semptomatik amfizem gelişir.

Proteaz-antiproteaz hipotezi sigaranın olumsuz etkisini de açıklar. Sigara içenlerde elastaz miktarı artmış, buna karşın antielastaz aktivitesi azalmıştır. Sigara içenlerin alveollerindeki nötrofillerinde ve makrofajlarında birikir. Nikotin direkt



kemoatraktan (kimyasal çekici) etkisiyle nötrofil ve makrofajları ortama çekerken dumanda bulunan reaktif oksijen türevleri (ROT) de enflamasyona katkı sağlar. Sigara içme sonucu artan makrofajlardaki elastaz, alfa<sub>1</sub>-antitripsin tarafından inhibe edilemediği gibi kendisi de proteolitik olarak sindirilir. Günümüzde elastaza ek olarak makrofaj ve nötrofil kaynaklı matriks MMPs da doku yıkımında rolü olduğu yönünde kanıtlar artmaktadır (82).

Yapılan çalışmalarda sigaranın amfizeme yol açma mekanizması patogenetik bir prototip olarak kabul edilmiştir. Sigara dumanının, akciğerlerde başlıca makrofaj ve nötrofillerde zengin bir enflamasyona yol açtığı gösterilmiştir.

Sigaranın nötrofillerin proteolitik aktivitesini arttırdığını gösteren *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca sigara dumanına maruz kalmanın (aktif ve pasif içenlerde) NE aktivitesini artırdığını *in vivo* çalışmalar da göstermiştir. Artan NE daha fazla doku yıkımını ifade eder (80).

Elastaz aktivitesinin, hem insan göbek kordonu ven endotel hücresinde (HUVEC) E-selektin ifadesinin hem de kanser hücrelerinin onlarla oluşan adezyon reaksiyonunun uyarılmasında biyolojik bir fonksiyonu vardır. Elastin aktivitesinin inhibisyonu, kanser hücrelerinin metastazının kontrolünde etkili bir stratejidir (83).

#### **1.4. Elastaz Enzimi İle İlgili Literatürde Yer Alan Çalışmalar**

Lee ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 150 çeşit bitkinin metil alkollü ekstralarında elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Bu bitkilerden; *Areca catechu* (IC<sub>50</sub> 42,4 µg/mL), *Cinnamomum cassia* (IC<sub>50</sub> 208,7 µg/mL), *Myristica fragrans* (IC<sub>50</sub> 284,1 µg/mL), *Curcuma longa* (IC<sub>50</sub> 398,4 µg/mL), *Alpinia katsumadai* (IC<sub>50</sub> 465,7 µg/mL) ve *Dryopteris cassirrhizomanu* (IC<sub>50</sub> 714,4 µg/mL) en yüksek düzeyde elastaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir (84).

Alasbahi ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada Yemen yöresinde bulunan *Aspilia helianthoides*, *Ceropegia rupicola*, *Kniphofia sumarae*, *Pavetta longiflora* ve *Plectranthus cf barbatus* bitkilerinin diklorometan, metil alkol

ve sulu ekstrelerinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve *Aspilia helianthoides* bitkisinin en yüksek anti-elastaz aktivitesine ( $IC_{50}$  0,4  $\mu\text{g/mL}$ ) sahip olduğu bulunmuştur (85).

Kim ve arkadaşları (2009) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada *Callistemon lanceolatus* bitkisinin etil alkol ekstresinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bitkinin iyi bir elastaz inhibitörü ( $IC_{50}$  20,2  $\mu\text{g/mL}$ ) olduğu bulunmuştur (86).

Masuda ve arkadaşları (2009)'nın yürüttüğü bir çalışmada ise, *Morinda citrifolia* bitkisinin meyve, yaprak ve tohumlarından ayrı ayrı hazırlanan etil alkollü ekstrelerinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bu bitkinin meyvesinin daha yüksek elastaz inhibisyon aktivitesi ( $IC_{50}$  12  $\mu\text{g/mL}$ ) gösterdiği bulunmuştur (87).

Moon ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, Jeju Adası'nda bulunan 263 çeşit bitkinin etil alkol ekstrelerinin elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bu bitkilerden *Cornus walteri* bitkisinin en yüksek elastaz inhibisyon aktivitesine ( $IC_{50}$  26,1  $\mu\text{g/mL}$ ) sahip olduğu bulunmuştur (88).

Sahasrabudhe ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *Garcinia indica* bitkisinin metil alkollü, etil asetatlı ve sulu ekstrelerinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve sulu ekstrenin en iyi elastaz aktivitesi (%81,02) gösterdiği bulunmuştur (89).

Onar ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Epilobium angustifolium* bitkisinin sulu ekstresinde elastaz inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve bitkinin iyi bir elastaz inhibitörü ( $IC_{50}$   $42,72 \pm 2,38$   $\mu\text{g/mL}$ ) olduğu bulunmuştur (90).

Bu çalışma kapsamında, Giresun yöresinde yetişen 15 çeşit yenilebilir bitkinin farklı çözücülerdeki ekstrelerinin, anti-elastaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin spektrofotometrik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Destile Su Cihazı	: Nüve-NS-108
Etüv	: Binder
pH Metre	: Butech
UV-VIS Spektrofotometre	: T80+ PG Instruments
Terazi	: Shimadzu AUx220
Hassas Terazi	: Sartorius
Su Banyosu	: Memmert
Ultrasonikasyon	: Selecta
Otomatik Pipetler	: Brand Pipetleri
Evaporatör	: Büchi Rotavapor R-200

### 2.2. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bitki ekstraksiyonlarında organik çözücü olarak etil asetat ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) (Merck), metil alkol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Merck) kullanıldı. Ekstreleri çözmek için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck) kullanıldı. Tamponun hazırlanması için hidroksimetil aminometan (Tris) (Merck) ve hidroklorik asit (HCl) (Merck) kullanıldı. DeneYlerde substrat olarak N-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilit (STANA) (Sigma), aktivitesi tayin edilecek enzim olarak elastaz (Sigma) kullanıldı.

### 2.3. Enzim İnhibisyonu Tayininde Kullanılan Bitki Materyalleri

Çalışmamızda, anti-elastaz inhibisyon aktivitesi tayinininde kara lahana, kara lahana çiçeği, sakarca, diken ucu, kaldirik, kuzu kulağı, çalı çileği, hoşuran, ısırgan, ezeltire, pazı, mendek, gücükdene, söğüt otu ve yayla pancarı bitkileri kullanıldı.

Giresun yöresindeki bazı köylerden toplanan veya pazarlardan temin edilen bitki materyalleri yıkandı, destile sudan geçirildi ve serin bir yerde kurutuldu.

### 2.3.1. Kara Lahana ve Çiçeği

Yöresel Adı: Pancar

Bilimsel Adı: *Brassica oleracea*



**Resim 2.1** Kara Lahana Bitkisi ve Çiçeği (91)

Kara lahana (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), sarı veya beyaz çiçekli, iki yıllık ve çok yıllık, çoğu Akdeniz çevresi ülkelerinde yetiştirilen bir kış sebzesidir. Killi, derin, serin ve kuvvetli toprak ister. Azotlu gübrelere ihtiyacı fazladır. Kolay göbek bağlaması, kışa daha iyi dayanabilmesi ve kendine has tadı olması için fazla miktarda potasyuma ihtiyaç duyar (92). Lahana türlerinin kalori değerleri düşüktür ve bu açıdan iyi bir diyet besinidir. Çeşitli türleri bulunan lahana sebzesi, besinsel değeri yüksek olan kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum ve demir gibi elementleri içerdiği için bolca tüketilmektedir (93,94).

**Faydaları:** Lahananın şeker ve romatizma hastaları için çok faydalı olduğu bilinmektedir. İçerdiği kükürt ve vitaminler ile kanı temizleyip cildi güzelleştirdiği, bol idrar söktürdüğü, tohumlarının kurt düşürücü olduğu ve vücuttaki suyu ve zehirli maddeleri idrarla dışarı attığı bildirilmiştir. Sadece lahana çeşitlerinde bulunan ve U vitamini olarak adlandırılan vitamin, mide ve bağırsakların iç yüzeyini korur ve midede oluşan yaraların iyileşmesini sağlar (92).

### 2.3.2. Sakarca

Yöresel Adı: Çökülce

Bilimsel Adı: *Ornithogalum umbellatum*



**Resim 2.2** Sakarca Bitkisi (91)

*Ornithogalum* türleri, çoğunlukla çıplak, skapuslu ve soğanlı çok yıllık otsu bitkilerdir. Tıbbi ve ekonomik değerleri vardır (95). Bu tür yumrularının ve diğer bazı parçalarının gastrointestinal sistemi ve kalbin ritmini ciddi şekilde etkileyen bazı bileşikler (konvallotoksin ve diğer glikozitler) ve sponinler taşıdığı bilinmektedir. Tür hem insanlarda hem de hayvanlarda zehirlenmelere neden olmaktadır. Eski zamanlardan beri yumruları kusturucu ve çıban açıcı olarak kullanılmıştır. Taze veya pişmiş yumru çıban üzerine sarılır ve çıbanın olgunlaşip açılmasını sağlar. (96,97).

### 2.3.3. Diken Ucu

Yöresel Adları: Merevcen, Melocan, Özdiken, Silcan,  
Melvocan

Bilimsel Adı: *Smilax excelsa*



**Resim 2.3** Diken Ucu Bitkisi (91)

Kışın yapraklarını dökmeyen, 15 m kadar yükselebilen, dikenli, tırmanıcı bir bitkidir. Yaprakları ok veya mızrak biçiminde, derimsi, kısa saplı, kenarları dikenlidir (98).

**Faydaları:** Halk hekimliğinde, göğüs kanseri, mide ağrısını iyileştirmede (99) ve hazmı kolaylaştırmada kullanılmaktadır (100).

### 2.3.4. Kaldirik

Yöresel Adları: Hodan, Ispıt

Bilimsel Adı: *Trachystemon orientalis*



**Resim 2.4** Kaldirik Bitkisi (91)

30-40 cm yükseklikte, çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları sert tüylü, çiçekleri mavi renklidir. Kuzey Anadolu Bölgesinde kayın ormanları altında yetişir. Tanen, uçucu yağ, nitrat tuzları, müsilaj, saponin ve rezin taşımaktadır (101).

**Faydaları:** Halk arasında idrar arttırıcı, kan temizleyici, yumuşatıcı ve ateş düşürücü (101,102) özellikleri bilinmekte olup göğüs kanserinde, mide ağrısı ve gaz gidermede (99) kullanılmaktadır.

### 2.3.5. Kuzu Kulağı

Yöresel Adları: Labada, Ekşimik, Turşuotu

Bilimsel Adı: *Rumex acetosella*



**Resim 2.5** Kuzu Kulağı Bitkisi (103)

*Polygonaceae* ailesinden, kırmızı dik ve tüsüz gövdeli 15-40 cm boyunda çok yıllık bir bitkidir. Nemli kırlarda doğal olarak yetişir. Ok biçiminde tüsüz yaprakları ve pembemsi renkli çiçekleri vardır (104). Bol miktarda oksalik asit içeren ekşi yaprakları salata olarak yenir.

**Faydaları:** Halk arasında yapraklarından hazırlanan lapalar çıban tedavisinde kullanılır. Koklerinden yapılan ilaçlar kuvvet verici, iştah açıcı ve mşhil olarak da kullanılır (105).

### 2.3.6. Çalı ileği

Yöresel Adı: ileklik

Bilimsel Adı: *Vaccinium myrtillus*



**Resim 2.6** alı ileği Bitkisi (106)

*Vaccinium myrtillus*, Karadeniz Bölgesi'nin doğu kesimi başta olmak üzere yöresel olarak çok farklı isimlerle anılan zms bir meyvedir. Asitli ve organik maddece zengin topraklara sahip ılıman iklim kuşağında yetişebilen zms meyvedir. Türkiye'de 40-42°C Kuzey enlemleri arasında kalan büyük kısmını Karadeniz Bölgesi'nin kapladığı alandaki nispeten yüksek rakımlı, asitli ve organik maddece zengin topraklarda kolayca yetişebilmektedir (107-112).

**Faydaları:** İdrar yolu enfeksiyonlarında antibiyotik gibi işlev görmektedir. Kansere karşı vücudu koruyan enzimleri çalıştırdığı, damarlarda yağ birikimini engelleme özelliğinde olduğu, yağlı bileşiklerin vücuttan atılmasını sağladığı belirtilmektedir. Kan şekerini ve kolesterolü düşürdüğü, bağırsak metabolizmasını düzenlediği, damar sertliği oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (110). Antioksidan içeriği en yüksek olan meyvelerden biridir. Özellikle beyin fonksiyonları üzerine önemli derecede olumsuz etkiye sahip olan Alzheimer hastalığının oluşumunun önlenmesi üzerine önemli derecede etkili olduğu belirtilmektedir (111).

### 2.3.7. Hoşuran

Yöresel Adları: Koşkıran, Horoz İbiği

Bilimsel Adı: *Amaranthus retroflexus*



**Resim 2.7** Hoşuran Bitkisi (91)

Yaprakları sebze gibi yenen, kendiliğinden humuslu topraklarda yetişen bir yıllık bitkidir. Hoşuran özel olarak ekilip yetiştirilen bir bitki değildir. Bir önceki yılın gabalarından dökülen tohumlardan çıkar. Eğer çıktığı arazi sürülüp işlenen bir araziye, daha iyi büyürler ve daha taze olurlar. Bu bitkinin romatizmaya karşı etkili olduğu bilinmektedir (113).

### 2.3.8. Isırgan

Bilimsel Adı: *Urtica dioica / urens*



**Resim 2.8** Isırgan Bitkisi (114)

Çok yıllık otsu bir bitkidir. Sapı dört köşeli, dik, 150 cm kadar uzayan, sürüngen ve çok dallıdır. Yapraklar karşılıklı, eşkenar, yürek-mızrak şeklinde dişlidir. Sap ve yaprakları yakıcı tüylerle kaplıdır. Çiçekler ufak, yeşil, tek cinsiyetli, uç yaprak koltuklarında püskül gibi toplu haldedir (115).

**Faydaları:** Halk arasında idrar söktürücü ve karaciğer temizleyici özelliği bilinmektedir (116). Yaprak ve tohumları egzama, apse, yara, basur, karaciğer yetmezliği, romatizmal ağrılar, iç hastalıkları, diyabet, deri enfeksiyonları, burun kanamaları ve kanser gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca,



mide-bağırsak tümörleri, özefagus kanseri, prostat tedavisinde de kullanılmaktadır (117).

### 2.3.9. Ezeltire

Yöresel Adları: Anason, Enison, Mesirotu

Bilimsel Adı: *Pimpinella anisum*



**Resim 2.9** Ezeltire (Anason) Bitkisi (118)

Özellikle yurdumuzda yaygın olarak yetişen ve kullanılan bir bitki olan anason (*Pimpinella anisum*); Anadolu’da yaygın olarak yetişen *Apiaceae* familyasından aromatik bir bitki olup; eskiden beri yaprak, çiçek ve tohumlarından tonik, antispazmodik, antiseptik, antifungal, sedatif, antidepresan olarak yararlanılmaktadır. Hepatoprotektif etkisi olduğu da düşünülmektedir (119).

### 2.3.10. Pazı

Yöresel Adı: Pezik

Bilimsel Adı: *Beta vulgaris* var. *cicla*



**Resim 2.10** Pazı Bitkisi (81)

Pazı oldukça besleyici bir sebze türüdür. İçeriğinde yüksek miktarda sodyum bulunur. Düşük kalorili olan pazı bitkisi mineraller bakımından fakir bir bitki olmasına karşın askorbik asit (C vitamini) içeriği açısından oldukça zengindir (120,121). Yüksek miktarda A vitamini içeren pazı yaprakları buna bağlı olarak sodyum da içermektedir. Sodyumun yanında pazı içerisinde kalsiyum, fosfor,

magnezyum, demir ve potasyum da bulunmaktadır. Ayrıca pazı içerisinde palmitik, sitrik, oleik (Omega-9), linoleik asit (Omega-6) gibi uçucu yağ asitleri, folik asit, pektin, askorbik asit, fosfolipit, glikolipit ve polisakkaridler de bulunmaktadır (122).

### 2.3.11. Mendek

Yöresel Adı: Baldıran

Bilimsel Adı: *Aegopodium podagraria*



**Resim 2.11** Mendek Bitkisi (91)

Çok yıllık, dik, içi boş gövdeye sahiptir. Taç yaprakları beyaz ya da bazen pembesidir. Taneleri enlemesine silindriktir. Arka ve yan çizgileri ipliksi; yanları çıkıntılıdır. (104,123).

### 2.3.12. Gücükdene

Yöresel Adları: Kurtpençesi, Çıyancık, Kurttırnağı

Bilimsel Adı: *Polygonum bistorta*



**Resim 2.12** Gücükdene Bitkisi (124)

*Polygonaceae* familyasına ait cinsi olup ülkemizde tıbbi amaçla kullanılan ve doğal olarak yayılım gösteren 33 türü bulunmaktadır (125). *Polygonum* cinsinin bazı türleri geleneksel sağaltımda kullanılmakla beraber *Polygonum bistorta*'nın kurutulmuş kök ve rizomlarının antitüsif ve antimikrobiyal özellikleri olduğu bulunmuştur (126). British Herbal Farmakopede dergisinde ise antidiyaretik ve antienflamatuar etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (127).

### 2.3.13. Söğüt Otu

Yöresel Adı: Benlice

Bilimsel Adı: *Polygonum lapathifolium*



**Resim 2.13** Söğüt Otu Bitkisi (128)

*Polygonum lapathifolium* ülkemizde yaygın olarak bulunan ve sulak ortamlarda yetişen tek yıllık bir bitkidir. Ağustos-Eylül aylarında pembe renkte çiçekler açar ve yaprakların üzerinde parmak izi görünümünde lekeler bulunur (125).

### 2.3.14. Yayla Pancarı

Yöresel Adları: Kuş Pancarı, Çobançantası,

Kuş Ayağı Pancarı

Bilimsel Adı: *Capsella bursa-pastoris* L.



**Resim 2.14** Yayla Pancarı Bitkisi (129)

Boyu 55 cm kadar uzayabilen, tek yıllık bir bitkidir. Sapı düzgün, yukarı kısmından dallanmış olup yaprakları saplıdır. Tohumları elips şeklinde olup rengi sarı-kahverengidir (115). Halk hekimliğinde kurt düşürücü, kan temizleyici, bağırsak yumuşatıcı, yaraların iyileşmesini hızlandırıcı, egzama ve göz iltihabını iyileştirici (130); kabızlık önleyici ve idrar söktürücü (131) olarak ve diyabette (132) kullanılmaktadır.

## **2.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması**

Kurutulan bitkilerin sulu, metil alkollü ve etil asetatlı ekstreleri hazırlandı.

### **2.4.1. Sulu Ekstrelerin Hazırlanması**

Bitkiler kurutulup toz haline getirildikten sonra her bir bitkiden 10'ar gr tartılıp cam balona konularak üzerine 100 mL destile su ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğutulduktan sonra mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü ve rota evaporatörde düşük basınç altında su tamamen karışımdan uzaklaştırıldı. Elde edilen herbitki ekstresi anti-elastaz aktivitesi tayini yapılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

### **2.4.2. Metil Alkol ve Etil Asetat Ekstrelerinin Hazırlanması**

10 g kuru bitki tartıldı. Sokslet kartuşuna konuldu. Kartuş sokslet cihaza yerleştirildi. Sokslet cihazının balonuna 100 mL %99'luk metil alkol ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 8 saat reflüks edildi. Elde edilen karışım soğutuldu ve rota evaporatöre yerleştirilerek düşük basınç altında metil alkol karışımdan uzaklaştırıldı. Aynı işlem etil asetat için de gerçekleştirildi. Elde edilen tüm bitki ekstreleri anti-elastaz aktivitesi tayini yapılmaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

## **2.5. Anti-Elastaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi**

Elastaz inhibitör aktivitesi Moon ve arkadaşlarının (2010) yöntemine göre spektrofotometrik olarak tayin edildi (88). Çalışmamızda DMSO ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan herbitki ekstresinden 50 µL alındı. Üzerine 0,2 M pH'ı 7,8 olan Tris-HCl tampon çözeltisinden 0,9 mL ilave edildi. Kontrol çözeltisine 50 µL enzim konuldu. Kör için ise enzim yerine enzim miktarı kadar destile su kullanıldı. Kör, kontrol ve örnek çözeltileri 15 dakika 37°C'de inkübe edildi. İlk inkübasyondan sonra bütün tüplere 5 mM 50 µL STANA ilave edildi ve 37°C'de 30 dakika tekrar inkübe edildi. Örnek ve kontrol çözeltilerinin spektrofotometrede 410 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu.

Yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin anti-elastaz inhibisyon aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{410 \text{ kontrol}} - A_{410 \text{ örnek}}) / A_{410 \text{ kontrol}}] \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  : Kontrol çözeltisinin 410 nm'de köre karşı absorbans değeri.

$A_{\text{örnek}}$  : Örnek çözeltisinin 410 nm'de köre karşı absorbans değeri.

Deneyler 3 kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Hazırlanan bitki ekstralarının elastaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri hesaplandı.

Elastaz enziminin  $IC_{50}$  değeri (Aktivitenin %50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri), absise konsantrasyon, ordinata % elastaz inhibisyon verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kesiminden elde edilen regresyon denkleminde hesaplandı.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Giresun yöresinde yetişen yenilebilir bitkilerin farklı çözücülerdeki ekstralarının anti-elastaz enzim aktiviteleri incelendi.

#### 3.1. Bitki Ekstrelerinin Anti-Elastaz Enzim Aktivitesi

Kara lahana, kara lahana çiçeği, sakarca, diken ucu, kaldirik, kuzu kulağı, çalı çileği, hoşuran, ısırgan, ezeltene, pazı, mendek, gücükdene, söğüt otu ve yayla pancarı bitkilerinin sulu, etil asetatlı ve metil alkollü bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları için hesaplanan inhibisyon değerleri ve konsantrasyon-% elastaz inhibisyon grafikleri yardımı ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 3.1-3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerleri

Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% Elastaz İnhibisyonu	IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)
Çalı Çileği	1x10 <sup>-6</sup>	17,03 ± 4,200	0,0078 ± 0,002
	1x10 <sup>-5</sup>	18,55 ± 2,666	
	1x10 <sup>-4</sup>	21,46 ± 1,626	
	1x10 <sup>-3</sup>	23,11 ± 1,754	
Kuzu Kulağı	1x10 <sup>-6</sup>	38,795 ± 13,612	0,0030 ± 0,003
	1x10 <sup>-5</sup>	39,666 ± 13,661	
	1x10 <sup>-4</sup>	40,755 ± 14,036	
	1x10 <sup>-3</sup>	42,23 ± 12,586	
Yayla Pancarı	1x10 <sup>-1</sup>	36,135 ± 4,518	12,8420 ± 2,210
	1	38,06 ± 5,572	
	10	39,52 ± 6,802	

**Tablo 3.1** (devam)

Diken Ucu	$1 \times 10^{-6}$	$37,44 \pm 14,538$	$0,0043 \pm 0,006$
	$1 \times 10^{-5}$	$38,32 \pm 14,906$	
	$1 \times 10^{-4}$	$39,575 \pm 15,818$	
	$1 \times 10^{-3}$	$41,64 \pm 16,108$	
Kara Lahana	$1 \times 10^{-6}$	$41,91 \pm 1,160$	$0,0002 \pm 0,0001$
	$1 \times 10^{-5}$	$45,32 \pm 4,044$	
	$1 \times 10^{-4}$	$46,69 \pm 4,030$	
Mendek	$1 \times 10^{-4}$	$39,415 \pm 11,505$	$0,1158 \pm 0,031$
	$1 \times 10^{-3}$	$42,3 \pm 10,889$	
	$1 \times 10^{-2}$	$43,755 \pm 11,604$	
	$1 \times 10^{-1}$	$44,81 \pm 12,190$	
Sakarca	$1 \times 10^{-6}$	$30,1 \pm 4,101$	$0,0044 \pm 0,0008$
	$1 \times 10^{-5}$	$31,645 \pm 3,330$	
	$1 \times 10^{-4}$	$33,19 \pm 2,560$	
	$1 \times 10^{-3}$	$35,525 \pm 3,500$	
Kara Lahana Çiçeği	$1 \times 10^{-2}$	$44,14 \pm 2,545$	$3,6520 \pm 2,730$
	$1 \times 10^{-1}$	$46,4 \pm 0,212$	
	1	$47 \pm 0,212$	
Kaldirik	$1 \times 10^{-5}$	$36,49 \pm 0,382$	$0,0500 \pm 0,016$
	$1 \times 10^{-4}$	$37,57 \pm 0,382$	
	$1 \times 10^{-3}$	$38,65 \pm 0,382$	
	$1 \times 10^{-2}$	$40 \pm 0,764$	
Söğüt Otu	$1 \times 10^{-2}$	$24,73 \pm 2,574$	$14,6300 \pm 0,218$
	$1 \times 10^{-1}$	$25,455 \pm 2,567$	
	1	$31,09 \pm 0,254$	
	10	$34,18 \pm 0,509$	
Isırgan	$1 \times 10^{-6}$	$36,085 \pm 1,845$	$0,0034 \pm 0,002$
	$1 \times 10^{-5}$	$38,26 \pm 1,230$	
	$1 \times 10^{-4}$	$39,565 \pm 0,615$	
	$1 \times 10^{-3}$	$42,175 \pm 1,845$	

**Tablo 3.1** (devam)

Hoşuran	$1 \times 10^{-5}$	$39,765 \pm 0,233$	$0,1033 \pm 0,012$
	$1 \times 10^{-4}$	$40,26 \pm 0,467$	
	$1 \times 10^{-3}$	$40,49 \pm 0,467$	
	$1 \times 10^{-2}$	$41,085 \pm 0,233$	
Pazı	$1 \times 10^{-3}$	$17,095 \pm 2,284$	$2,2466 \pm 0,046$
	$1 \times 10^{-2}$	$19,675 \pm 0,460$	
	$1 \times 10^{-1}$	$20,965 \pm 0,460$	
	1	$22,26 \pm 0,452$	
Ezeltere	$1 \times 10^{-6}$	$38,225 \pm 15,110$	$0,0013 \pm 0,0004$
	$1 \times 10^{-5}$	$38,89 \pm 15,202$	
	$1 \times 10^{-4}$	$39,55 \pm 15,287$	
	$1 \times 10^{-3}$	$40,695 \pm 15,209$	
Gücükdene	$1 \times 10^{-4}$	$37,065 \pm 16,723$	$0,4863 \pm 0,684$
	$1 \times 10^{-3}$	$37,745 \pm 17,020$	
	$1 \times 10^{-2}$	$38,865 \pm 17,925$	
	$1 \times 10^{-1}$	$40,035 \pm 16,893$	

Tablo 3.1 incelendiğinde;

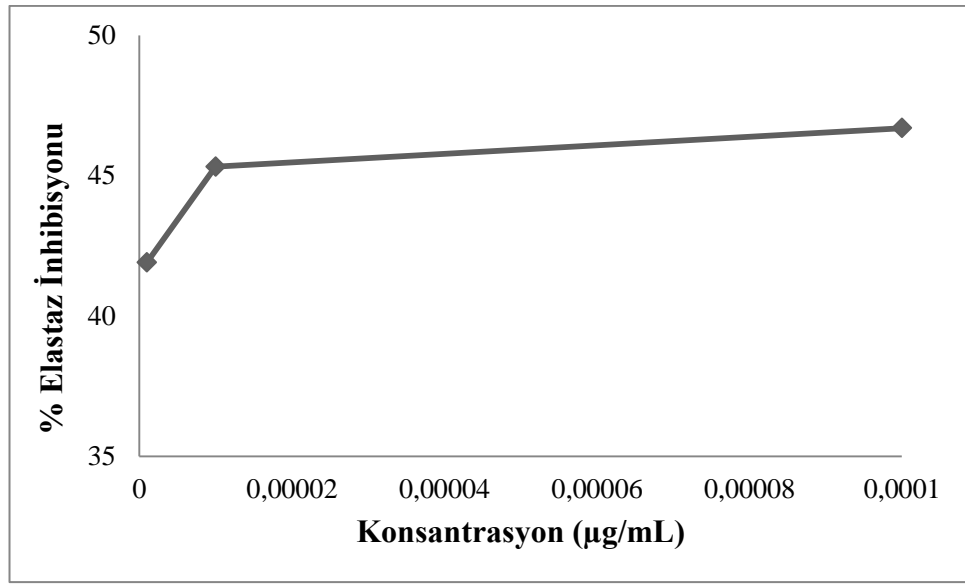
Bitkilerin, elastaz üzerindeki inhibisyon aktivitelerinin büyükten küçüğe sırasıyla kara lahana, ezeltere, kuzu kulağı, ısırgan, diken ucu, sakarca, çalı çileği, kaldirik, hoşuran, mendek, gücükdene, pazı, kara lahana çiçeği, yayla pancarı ve söğüt otu olarak sıralandığı görülmektedir.

Bitkiler içinde  $IC_{50}$  değerinin en düşük olması nedeniyle en yüksek oranda elastazı inhibe eden ekstrenin kara lahananın sulu ekstresi ( $IC_{50}$   $0,0002 \pm 0,0001$   $\mu\text{g/mL}$ ) olduğu görülmektedir. Kara lahanayı takiben ezeltere ( $IC_{50}$   $0,0013 \pm 0,0004$   $\mu\text{g/mL}$ ), kuzu kulağı ( $IC_{50}$   $0,0030 \pm 0,003$   $\mu\text{g/mL}$ ) ve ısırgan ( $IC_{50}$   $0,0034 \pm 0,002$   $\mu\text{g/mL}$ ) bitkilerinin sulu ekstrelerinin elastazı en yüksek oranda inhibe ettiği görülmektedir.

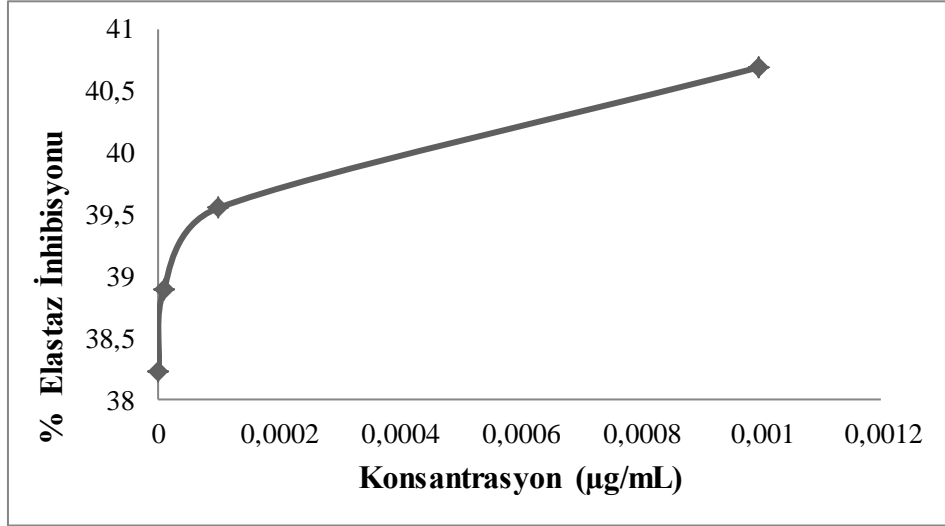


Genel olarak sonuçlara bakıldığında diğer bitkilerin de kabul edilebilir etkin bir elastaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

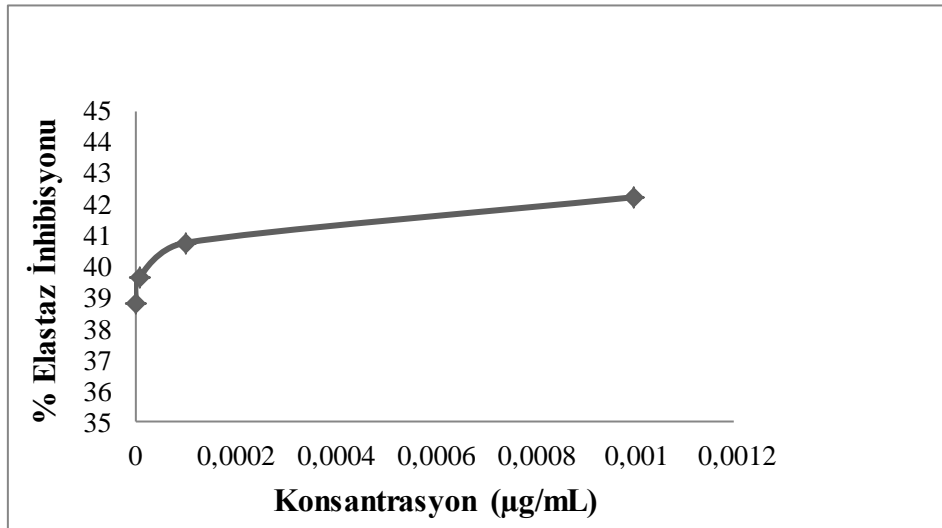
Çalışmamızda, hazırlanan sulu bitki ekstraktları arasında en yüksek elastaz inhibisyonuna neden olan ve en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip ilk dört bitkinin sulu ekstraktlarına ait konsantrasyon-% elastaz inhibisyon grafikleri Şekil 3.1-3.4'de verilmiştir.



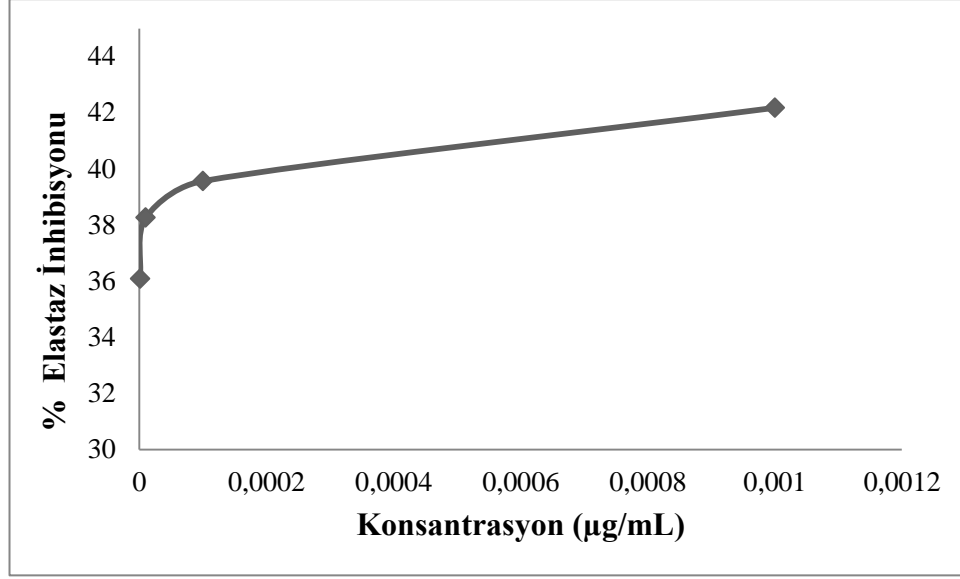
Şekil 3.1 Kara Lahana Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



Şekil 3.2 Ezeltere Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



Şekil 3.3 Kuzu Kulağı Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



Şekil 3.4 Isırgan Sulu Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği

Tablo 3.2 Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Metil Alkollü Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerleri

Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% Elastaz İnhibisyonu	IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)
Çalı Çileği	1x10 <sup>-6</sup>	21,81 ± 10,960	0,0015 ± 0,00019
	1x10 <sup>-5</sup>	22,635 ± 11,024	
	1x10 <sup>-4</sup>	23,855 ± 10,529	
Kuzu Kulağı	1x10 <sup>-6</sup>	34,1 ± 16,405	0,0065 ± 0,006
	1x10 <sup>-5</sup>	35,195 ± 16,780	
	1x10 <sup>-4</sup>	36,255 ± 15,917	
	1x10 <sup>-3</sup>	36,895 ± 15,648	
Yayla Pancarı	1x10 <sup>-4</sup>	33,925 ± 3,882	0,5165 ± 0,488
	1x10 <sup>-3</sup>	37,43 ± 5,515	
	1x10 <sup>-2</sup>	39,06 ± 6,986	
	1x10 <sup>-1</sup>	40,19 ± 7,750	

**Tablo 3.2** (devam)

Ezeltere	$1 \times 10^{-3}$	$32,95 \pm 19,502$	$3,2758 \pm 0,918$
	$1 \times 10^{-2}$	$35,525 \pm 16,369$	
	$1 \times 10^{-1}$	$38,585 \pm 13,074$	
	1	$39,065 \pm 12,905$	
Güçükdene	$1 \times 10^{-6}$	$30,88 \pm 0,566$	$0,0005 \pm 0,0001$
	$1 \times 10^{-5}$	$34,285 \pm 1,350$	
	$1 \times 10^{-4}$	$35,64 \pm 1,923$	
Diken Ucu	$1 \times 10^{-4}$	$35,48 \pm 18,922$	$0,3972 \pm 0,531$
	$1 \times 10^{-3}$	$36,39 \pm 18,710$	
	$1 \times 10^{-2}$	$38,535 \pm 17,289$	
	$1 \times 10^{-1}$	$38,99 \pm 17,183$	
Kara Lahana	$1 \times 10^{-6}$	$30,68 \pm 25,385$	$0,0015 \pm 0,002$
	$1 \times 10^{-5}$	$31,245 \pm 25,548$	
	$1 \times 10^{-4}$	$32,385 \pm 25,873$	
Mendek	$1 \times 10^{-6}$	$37,16 \pm 4,299$	$0,0045 \pm 0,0002$
	$1 \times 10^{-5}$	$38,845 \pm 4,674$	
	$1 \times 10^{-4}$	$40,055 \pm 4,363$	
	$1 \times 10^{-3}$	$41,01 \pm 3,705$	
Sakarca	$1 \times 10^{-6}$	$27,1 \pm 0,141$	$0,0061 \pm 0,001$
	$1 \times 10^{-5}$	$28,435 \pm 0,615$	
	$1 \times 10^{-4}$	$29,645 \pm 0,502$	
	$1 \times 10^{-3}$	$31,69 \pm 0,438$	
Kara Lahana Çiçeği	$1 \times 10^{-3}$	$41,39 \pm 0,396$	$0,9189 \pm 0,113$
	$1 \times 10^{-2}$	$43,33 \pm 1,570$	
	$1 \times 10^{-1}$	$46,39 \pm 5,105$	
	1	$50,275 \pm 0,389$	
Kaldirik	$1 \times 10^{-3}$	$13,125 \pm 0,884$	$1,8671 \pm 9,962$
	$1 \times 10^{-2}$	$14,685 \pm 0,445$	
	$1 \times 10^{-1}$	$15,935 \pm 0,445$	
Söğüt Otu	$1 \times 10^{-6}$	$29,435 \pm 0,573$	$0,0003 \pm 0,0002$
	$1 \times 10^{-5}$	$31,855 \pm 0,573$	
	$1 \times 10^{-4}$	$35,885 \pm 2,850$	

**Tablo 3.2** (devam)

Isırgan	$1 \times 10^{-2}$	$48,295 \pm 0,799$	$0,0994 \pm 0,0008$
	$1 \times 10^{-1}$	$50,285 \pm 0,403$	
	1	$51,42 \pm 0,396$	
Hoşuran	$1 \times 10^{-2}$	$47,685 \pm 0,700$	$0,1007 \pm 0,002$
	$1 \times 10^{-1}$	$49,665 \pm 1,167$	
	1	$50,325 \pm 0,700$	
	10	$51,315 \pm 0,700$	
Pazı	$1 \times 10^{-6}$	$20 \pm 2,220$	$0,0594 \pm 0,015$
	$1 \times 10^{-5}$	$25,095 \pm 0,559$	
	$1 \times 10^{-4}$	$27,45 \pm 0,551$	
	$1 \times 10^{-3}$	$28,04 \pm 0,283$	

Tablo 3.2 incelendiğinde;

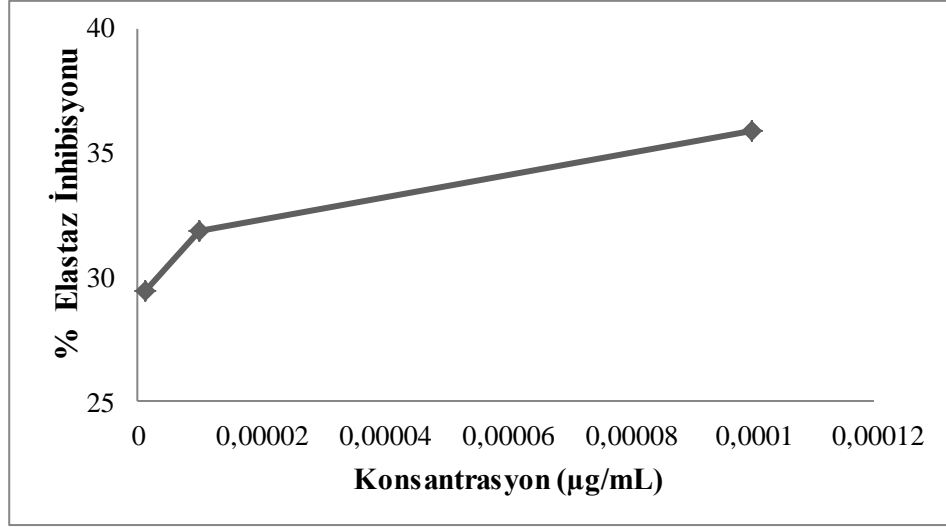
Bitkilerin elastaz üzerindeki inhibisyon aktivitelerinin büyükten küçüğe sırasıyla söğüt otu, gücükdene, çalı çileği, kara lahana, mendek, sakarca, kuzu kulağı, pazı, ısırgan, hoşuran, diken ucu, yayla pancarı, kara lahana çiçeği, kaldirik ve ezeltire olarak sıralandığı görülmektedir.

Bitkiler içinde  $IC_{50}$  değerinin en düşük olması nedeniyle en yüksek oranda elastazı inhibe eden ekstrenin söğüt otunun metil alkollü ekstresi ( $IC_{50}$   $0,0003 \pm 0,0002$   $\mu\text{g/mL}$ ) olduğu görülmektedir. Söğüt otunu takiben gücükdene ( $IC_{50}$   $0,0005 \pm 0,0001$   $\mu\text{g/mL}$ ), çalı çileği ( $IC_{50}$   $0,0015 \pm 0,00019$   $\mu\text{g/mL}$ ), kara lahana ( $IC_{50}$   $0,0015 \pm 0,002$   $\mu\text{g/mL}$ ) ve mendek ( $IC_{50}$   $0,0045 \pm 0,0002$   $\mu\text{g/mL}$ ) bitkilerinin metil alkollü ekstrelerinin elastazı en yüksek oranda inhibe ettiği görülmektedir.

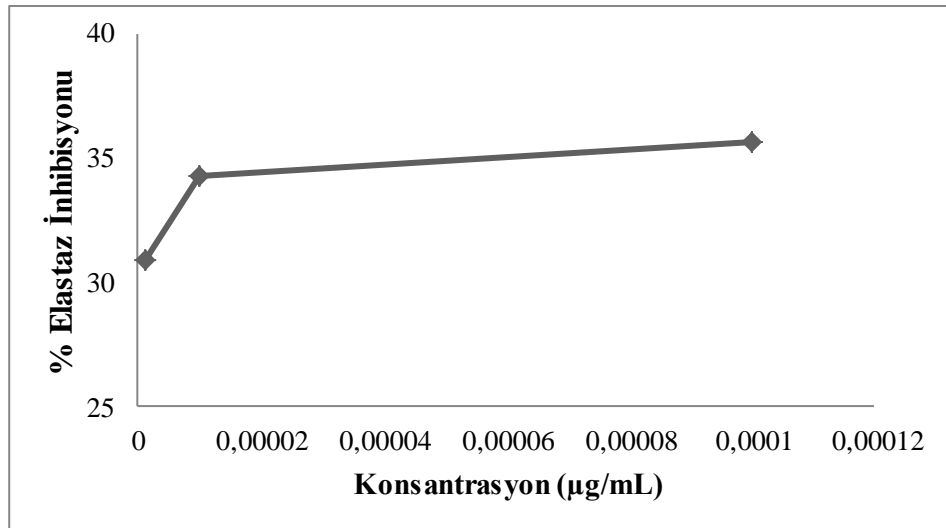
Genel olarak sonuçlara bakıldığında diğer bitkilerin de kabul edilebilir etkin bir elastaz inhibitör aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda, hazırlanan metil alkollü bitki ekstreleri arasında en yüksek elastaz inhibisyonuna neden olan ve en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip ilk beş bitkinin

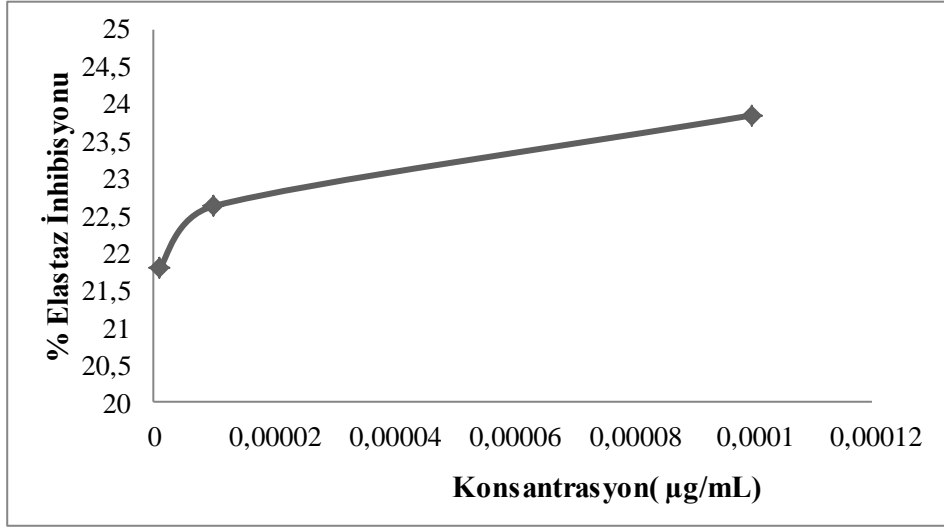
metil alkollü ekstrelerine ait konsantrasyon-% elastaz inhibisyon grafikleri Şekil 3.5-3.9'da verilmiştir.



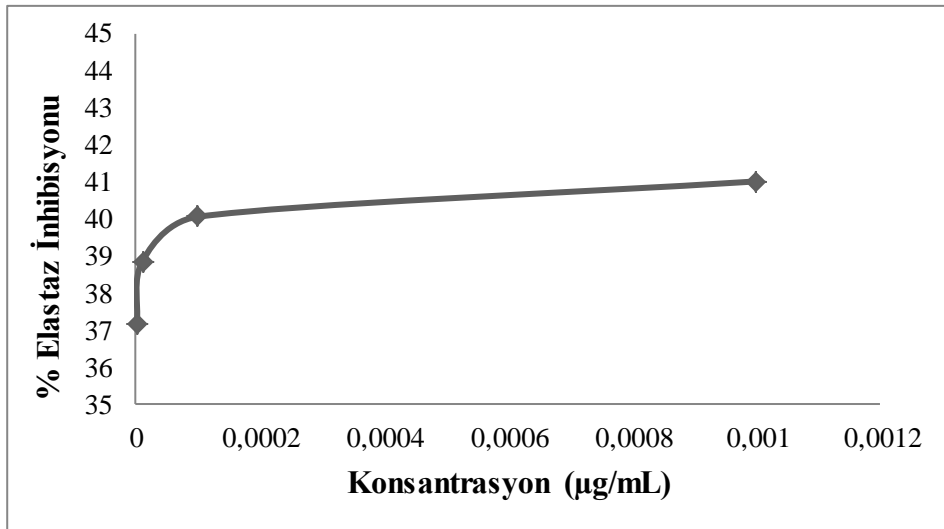
Şekil 3.5 Söğüt Otu Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



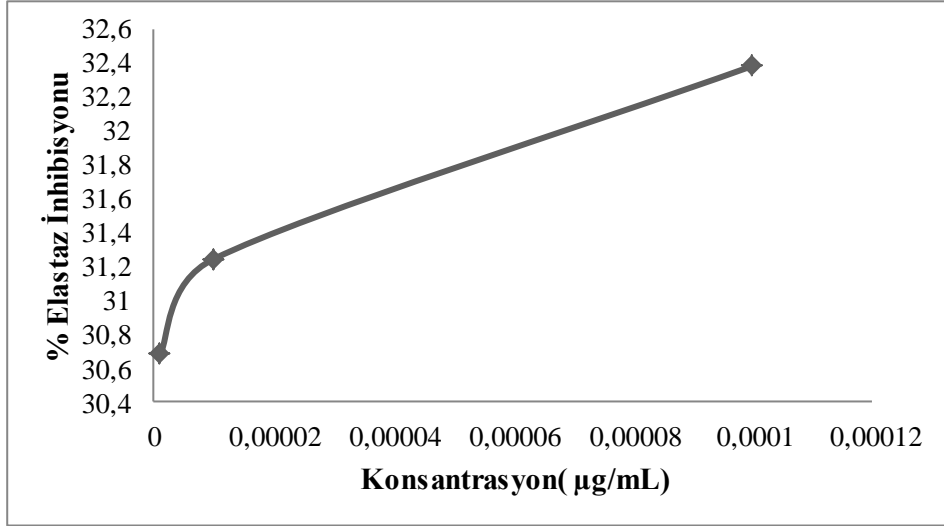
Şekil 3.6 Gücükdene Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



**Şekil 3.7** Çalı Çileği Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



**Şekil 3.8** Mendek Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



**Şekil 3.9** Kara Lahana Metil Alkollü Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği

**Tablo 3.3** Çeşitli Bitkilerden Hazırlanan Etil Asetatlı Ekstrelerin Elastaz Enzimi Üzerindeki % Elastaz İnhibisyonu ve IC<sub>50</sub> Değerleri

Bitki Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% Elastaz İnhibisyonu	IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)
Çalı Çileği	1x10 <sup>-3</sup>	19,115 ± 4,942	6,6014 ± 1,042
	1x10 <sup>-2</sup>	22,55 ± 8,683	
	1x10 <sup>-1</sup>	24,155 ± 7,644	
	1	25,76 ± 6,604	
Kuzu Kulağı	1x10 <sup>-6</sup>	33,755 ± 19,452	0,0055 ± 0,006
	1x10 <sup>-5</sup>	35,875 ± 17,41	
	1x10 <sup>-4</sup>	36,52 ± 17,465	
	1x10 <sup>-3</sup>	37,385 ± 17,515	
Yayla Pancarı	1x10 <sup>-6</sup>	30,78 ± 3,606	0,0079 ± 0,006
	1x10 <sup>-5</sup>	33,575 ± 6,724	
	1x10 <sup>-4</sup>	34,835 ± 6,838	
	1x10 <sup>-3</sup>	35,295 ± 6,654	



**Tablo 3.3** (devam)

Ezeltere	$1 \times 10^{-4}$	$33,055 \pm 16,270$	$0,1081 \pm 0,140$
	$1 \times 10^{-3}$	$36,01 \pm 18,752$	
	$1 \times 10^{-2}$	$36,675 \pm 18,844$	
Güçükdene	$1 \times 10^{-2}$	$30,075 \pm 4,815$	$1,3020 \pm 0,719$
	$1 \times 10^{-1}$	$41,545 \pm 20,372$	
	1	$45,305 \pm 25,010$	
Diken Ucu	$1 \times 10^{-3}$	$37,445 \pm 14,545$	$3,2614 \pm 4,375$
	$1 \times 10^{-2}$	$38,51 \pm 15,174$	
	$1 \times 10^{-1}$	$41,07 \pm 15,032$	
	1	$42,065 \pm 14,969$	
Kara Lahana	$1 \times 10^{-4}$	$27,605 \pm 28,758$	$0,4313 \pm 0,551$
	$1 \times 10^{-3}$	$28,975 \pm 28,758$	
	$1 \times 10^{-2}$	$29,545 \pm 28,928$	
	$1 \times 10^{-1}$	$32,275 \pm 27,004$	
Mendek	$1 \times 10^{-6}$	$47,235 \pm 0,445$	$0,0007 \pm 0,0001$
	$1 \times 10^{-5}$	$48,435 \pm 0,134$	
	$1 \times 10^{-4}$	$49,39 \pm 0,523$	
	$1 \times 10^{-3}$	$50,61 \pm 0,523$	
Sakarca	$1 \times 10^{-5}$	$38 \pm 4,243$	$0,0042 \pm 0,001$
	$1 \times 10^{-4}$	$39,34 \pm 4,723$	
	$1 \times 10^{-3}$	$41,175 \pm 4,490$	
Kara Lahana Çiçeği	$1 \times 10^{-3}$	$40,235 \pm 1,704$	$1,2197 \pm 0,543$
	$1 \times 10^{-2}$	$44,59 \pm 1,061$	
	$1 \times 10^{-1}$	$46,095 \pm 0,219$	
	1	$49,01 \pm 2,885$	
Kaldirik	$1 \times 10^{-6}$	$15,62 \pm 1,768$	$0,0032 \pm 0,001$
	$1 \times 10^{-5}$	$18,125 \pm 0,884$	
	$1 \times 10^{-4}$	$21,25 \pm 1,768$	
	$1 \times 10^{-3}$	$28,75 \pm 3,535$	

**Tablo 3.3** (devam)

Söğüt Otu	$1 \times 10^{-3}$	$19,455 \pm 0,771$	$0,3381 \pm 0,050$
	$1 \times 10^{-2}$	$22,365 \pm 3,345$	
	$1 \times 10^{-1}$	$29,09 \pm 2,574$	
Isırgan	$1 \times 10^{-2}$	$38,26 \pm 1,230$	$3,4764 \pm 0,310$
	$1 \times 10^{-1}$	$40,435 \pm 0,615$	
	1	$42,175 \pm 0,615$	
Hoşuran	$1 \times 10^{-5}$	$36,69 \pm 0,566$	$0,0401 \pm 0,013$
	$1 \times 10^{-4}$	$38,305 \pm 0,573$	
	$1 \times 10^{-3}$	$39,92 \pm 0,566$	
	$1 \times 10^{-2}$	$41,125 \pm 1,138$	
Pazı	$1 \times 10^{-5}$	$22,575 \pm 0,912$	$0,1333 \pm 0,002$
	$1 \times 10^{-4}$	$23,225 \pm 0,912$	
	$1 \times 10^{-3}$	$24,19 \pm 1,372$	
	$1 \times 10^{-2}$	$25,165 \pm 0,912$	

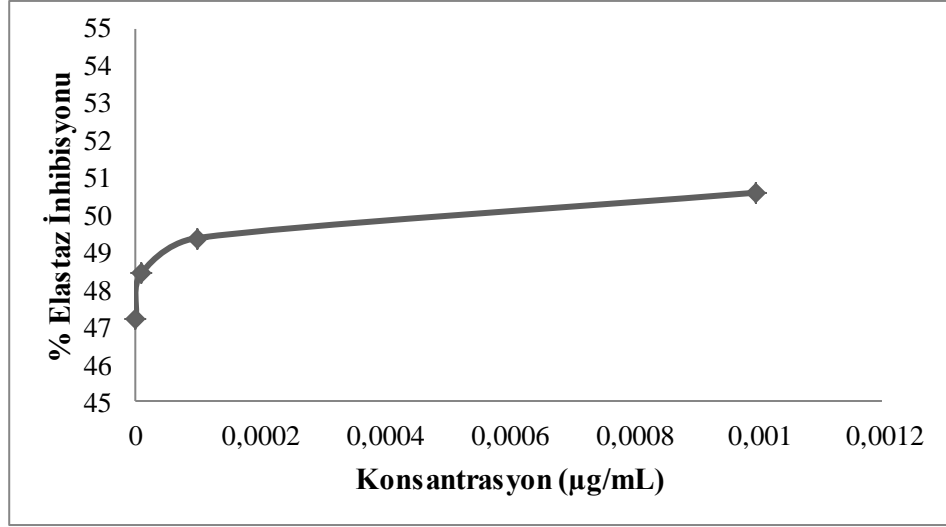
Tablo 3.3 incelendiğinde;

Bitkilerin, elastaz üzerindeki inhibisyon aktivitelerinin büyükten küçüğe sırasıyla mendek, kaldirik, sakarca, kuzu kulağı, yayla pancarı, hoşuran, ezeltere, pazı, söğüt otu, kara lahana, karalahana çiçeği, gücükdene, diken ucu, ısırgan ve çalı çileği olarak sıralandığı görülmektedir.

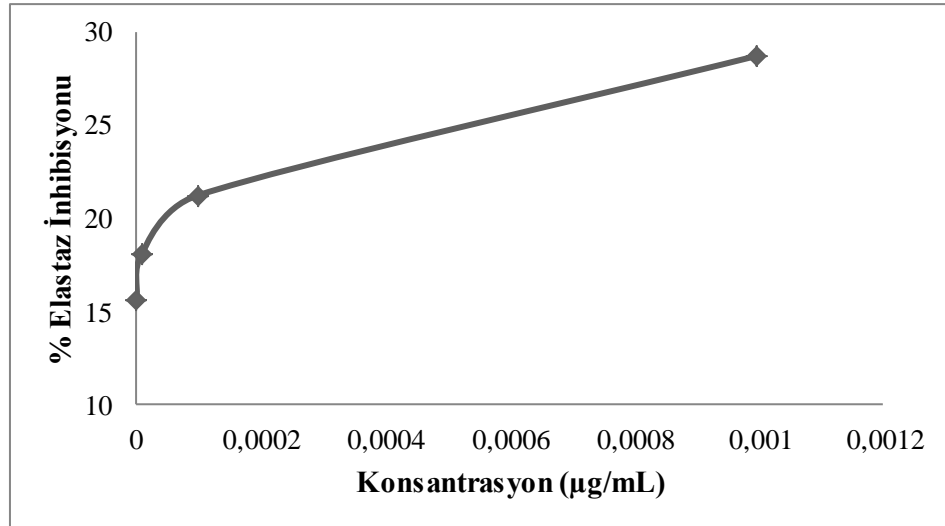
Bitkiler içinde  $IC_{50}$  değerinin en düşük olması nedeniyle en yüksek oranda elastazı inhibe eden ekstrenin mendeğin etil asetatlı ekstresi ( $IC_{50}$   $0,0007 \pm 0,0001$   $\mu\text{g/mL}$ ) olduğu görülmektedir. Mendeği takiben kaldirik ( $IC_{50}$   $0,0032 \pm 0,001$   $\mu\text{g/mL}$ ), sakarca ( $IC_{50}$   $0,0042 \pm 0,001$   $\mu\text{g/mL}$ ) ve kuzu kulağı bitkilerinin ( $IC_{50}$   $0,0055 \pm 0,006$   $\mu\text{g/mL}$ ) etil asetatlı ekstrelerinin elastazı en yüksek oranda inhibe ettiği görülmektedir.

Genel olarak sonuçlara bakıldığında diğer bitkilerin de kabul edilebilir etkin bir inhibitör aktivitesine sahip olduğu söylenebilir.

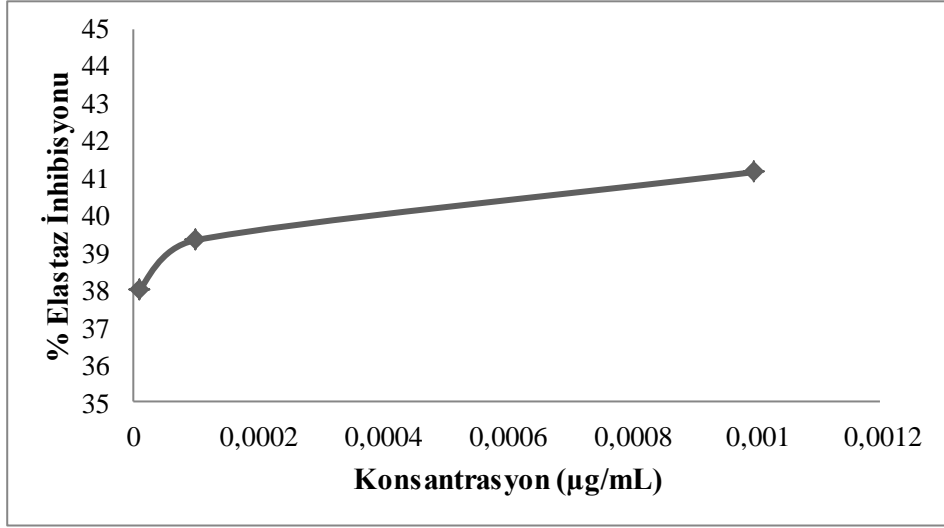
Çalışmamızda, hazırlanan etil asetatlı bitki ekstreleri arasında en yüksek elastaz inhibisyonuna neden olan ve en düşük  $IC_{50}$  değerine sahip ilk dört bitkinin etil asetatlı ekstrelerine ait konsantrasyon-% elastaz inhibisyon grafikleri Şekil 3.10-3.13'de verilmiştir.



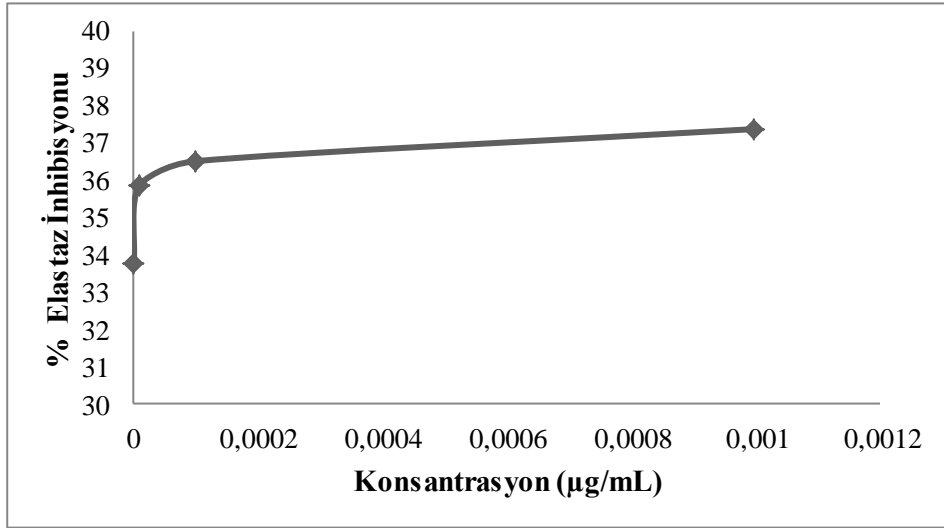
Şekil 3.10 Mendek Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



Şekil 3.11 Kaldirik Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



**Şekil 3.12** Sakarca Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği



**Şekil 3.13** Kuzu Kulağı Etil Asetatlı Ekstresinin Konsantrasyon-% Elastaz İnhibisyon Grafiği

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deri veya cilt, insanlar ve hayvanların vücut ve doku tabakalarından oluşan bir örtü sistemi organıdır. Cilt bizi dışarıya karşı koruyan bir bariyerdir. Aynı zamanda vücut ısısını ve su dengesini korur, çeşitli zararlı maddelerin ter yoluyla vücuttan atılımını gerçekleştirir. Kabaca üç tabakadan oluşur. En altta, destek dokusu olan kollajen, kan damarları ve salgı bezleri bakımından zengin *dermis* tabakası yer alır. Ortada *stratum bazale* denilen sürekli yeni hücrelerin yapıldığı tabaka vardır ki bu hücreler, yavaş yavaş cildin üst tabakalarına doğru yolculuk yaparlar ve yaklaşık 14. günde artık canlılıklarını kaybetmeye başlayarak en üstte birikirler ve *stratum korneumu* (boynuzsu tabaka) oluştururlar. *Stratum bazale*'nin üstünde yer alan tabaka *Stratum spinosum*'dur. Bu iki tabakaya histologlar *Stratum germinativum* da demektedirler (133).

Deri yaşlanması, yaşla birlikte deride oluşan yapısal ve moleküler değişiklikler, genel durum ve tamir işleyişinin ilerleyen bir şekilde azalması ve bozulmasıdır. Deri yaşlanması intrinsek (içsel-genetik) ve ekstrinsek (dışsal-fotoyaşlanma) nedenlere bağlı olarak gelişir. İntrinsek yaşlanma, genetik olarak programlanmış, kaçınılmaz olan doğal bir süreçtir. Çevresel faktörlerin etkisiyle intrinsek yaşlanma erken başlayabilir veya hızlı seyredebilir. İntrinsek deri yaşlanmasında kas kaybı (atrofi) ve elastisite kaybı gözlenir. Fotoyaşlanma olarak da adlandırılan ekstrinsek yaşlanma ise, daha çok ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kalma sonucunda deride gözlenen kronolojik yaşlanma belirtilerinin abartılmış şeklidir (134).

Güneş ışınları gibi UV ışınlarına maruz kalmak, sigara içmek ve çevre kirliliği gibi çevresel faktörler ve doğal yaşlanma süreci, serbest oksijen radikallerin oluşumuna katkıda bulunup derideki enflamatuar süreci etkiler. Elastaz ve katepsin G gibi nötrofillerden salınan proteazlar enflamasyon ve MMPs aktivasyonunu daha da artırır (135).

Güneş ışınları uzun (infrared) ve kısa dalga boylarından (UV-A, UV-B ve UV-C) oluşmaktadır. UV-A ışınının dalga boyu 320-380 nm'dir ve derinin derin tabakalarına (dermis) ulaşır ve yayılır. UV-A ışını yıl boyunca ve gün içinde değişik saatlerde, mevsimlerde veya hava koşullarında değişmeksizin etkili olmaktadır. UV-B ışının dalga boyu 290-320 nm'dir ve derinin üst tabakasını (epidermis) etkiler. UV-B ışını yaz aylarında ve yüksek rakımlı yerlerde daha yoğundur. Güneş ışınları deride zaman içerisinde incelme, elastikiyetin bozulması (kırışıklık), kuruluk, pigmentasyon değişikliği, kılcal damarların belirginleşmesi, fotoyaşlanma ve deri kanserinin oluşma riskinin artması gibi olumsuz etkiler göstermektedir (136).

Yaşlanma sürecini açıklamaya çalışan birçok teori ileri sürülmüştür. Örneğin, moleküllerin çapraz bağlar teorisi, genlerin yaşlanması teorisi, serbest radikal teorisi gibi (137-140). Gerçekten de, yaşlanma teorileri içinde serbest oksijen radikallerinin kronik, birikici etkisi ile yaşlanmayı açıklayan görüş, günümüzün önde gelen teorilerinden biridir. Bu teoriye göre küçük ama bütün yaşam boyunca süren antioksidan sistemdeki defekt yaşlanmaya neden olmaktadır (138,141,142). Bu teorinin başlıca kanıtlarından birisi, serbest oksijen radikallerinin yoğun bir şekilde oluşmasına yol açan iyonize edici radyasyonun, normal yaşlanmaya benzer sonuçlar üretmesi ve yaşam süresini kısaltmasıdır (138,141).

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlıkları düşük ve aynı zamanda reaktif olan atom, atom grubu veya moleküller olarak tanımlanır. Aşırı oksidatif stres, sellüler antioksidan savunma mekanizmalarını zayıflatarak hücre içindeki dinamik oksidan-antioksidan dengeyi bozar. ROT, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin yüzey reseptörlerini aktive ederek protein kinaz kaskadı yoluyla sinyal iletimine neden olur. Sinyal iletimini takiben aktive olan nükleer transkripsiyon kompleks AP-1'i hem dermis hem de epidermiste MMPs uyararak kollajen ve elastik fibril yıkımına yol açar (143).

Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından süpürülmesi mümkündür. Son zamanlarda yaygın olarak antioksidan aktiviteye sahip maddelerin terapötik ajan gelişimi ele alınmaktadır (144). E ve C vitaminleri, flavonoidler,  $\beta$ -karoten, ubikinon, lipoik asit, melatonin, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal

maddeler enzimatik olmayan antioksidan sistemlerdir (145). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarında özellikle C ve E vitamini, eser elementler ve mineraller gibi mikro besin maddelerinin oksidatif strese karşı koruyucu etkileri tanımlanmıştır. Hastalar yaşlanmayı önlemek için çoğunlukla tezgah üstü ürünleri almaktadır. Bunlardan en popüler olanlar vitamin, mineral ve botanik ekstraktlardır. Antiaging etkide önerilen mekanizmaları antioksidan özellikleriyle kollajen sentezini uyarıp, parçalanmasını önlemektir (146).

Bazı hastalıkların önlenmesinde toplumların gıda alışkanlıklarının önemli bir rolü olduğu gözlenmiştir. Bu konuda yapılan bilimsel çalışmalar, gıda olarak kullanılan bazı ürünlerin sağlık üzerine yararlı etkileri olduğunu doğrulamıştır. Bunun sonucu olarak gıda olarak kullanılan bazı ürünlerin bir kısmı besin desteği olarak tıbbi amaçlarla pazarlanmaya başlanmıştır. Küreselleşen dünyada insanların ve toplumların uzayan yaşam süresinin yanı sıra nitelikli yaşam sürme ihtiyacı ön plana çıkmıştır. Dünyada kaliteli yaşam sürmek isteyen kişiler, kimyasal ve sentetik ürünlerin yan etkilerinden kaçınmak için doğal yaşam tarzına ve doğal ürünler kullanmaya başlamıştır (147).

İnsanlar çok eski dönemlerden beri bitkileri gıda olarak, boya elde etmek, süs bitkisi ve tedavi amacıyla kullanmışlardır. Bu bitkilerin halk hekimliğindeki kullanımını antik çağdan itibaren devamlı bir artış göstermektedir (116). Özellikle son yıllarda, çoğu insan sentetik ilaçların yan etkilerinden dolayı bitkisel tedaviye yönelmiştir. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır (148).

Son zamanlarda, yenilebilir bitkilerden izole edilen fitokimyasalların yeni biyolojik özellikleri üzerine odaklanılmıştır. Çünkü yüzlerce yerli bitki türü, küresel olarak günlük diyetinde sebze, meyve, baharat ve çay olarak kullanılmaktadır. Birçoğu da geleneksel ilaçlar içinde yer almaktadır. Yenilebilir bitkiler, çeşitli biyolojik aktivite gösteren flavonoidler, vitaminler, terpenoidler alkaloidler, organosülfürler, pigmentler ve diğer fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar açısından zengindirler (149). Bununla birlikte bitkiler yüksek antioksidan aktiviteye sahip

bileşikler içermektedirler (150). Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging gibi birçok biyolojik fonksiyon, bu antioksidanlardan kaynaklanmaktadır (151).

Terpenoidler, flavonoidler ve fenolik bileşenlerin anti-elastaz aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (152).

Bitki orjinli pentasiklik triterpeneoid metabolitleri hem sentetik peptit substratları hem de elastinin NE ile hidrolizini inhibe etmektedir. Diğer nonspesifik NE inhibitörleri yağ asitleri ve trisülfonik asittir. Kao grubu tarafından spesifik deri fibroblast elastaz aktivitesinin inhibisyonunu UV'ye bağlı kırışıklık oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, topikal N-fenil-lösil-triptofan uygulamasının deri fibroblast elastazını inhibe ederek UV'ye bağlı kırışıklık oluşumunu önlediği bulunmuştur. Bu da hem NE hem de fibroblast elastazını bloke etme stratejisini koruma sağlayabilir (136).

Böylece, yenilebilir bitkilerin elastaz kontrolü için bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmamızda, Giresun yöresinde yetişen bitkilerin elastaz enziminin inhibitörü olup olmadığı araştırıldı.

Kara lahana (*Brassica oleracea*), vitamin ve mineraller açısından oldukça zengin bir soğuk iklim sebzesidir. Yeşil klorofil pigmentleri içinde bol miktarda beta-karoten, askorbik asit (C vitamini) ve kalsiyum barındırır. Koyu yapraklı olanları daha fazla beta-karoten içerir. Antioksidan ve fotokimyasal özellikleri olan kara lahana bitkisi birçok kanser türünün ve kalp hastalığı riskinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (153). Kara lahana oldukça zengin besin içeriği ile insanların günlük besin miktarını karşılayabilecek nitelikte olan önemli bir sebzedir (154). Çalışmamızda kara lahana bitkisinden hazırlanan sulu ekstrenin, diğer bitkilerin sulu ekstrelerine oranla düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu yani elastaz enzimini en yüksek oranda inhibe ettiği bulundu (Tablo 3.1).

Söğüt otu bitkisi türüne göre değişmekle beraber içerdikleri nişasta, antrasen, tanen ve flavonoidlere bağlı çeşitli farmakolojik etkilere yol açtığı belirtilmiştir. (126). Çalışmamızda söğüt otu bitkisinden hazırlanan metil alkollü ekstrenin, diğer



bitkilerin metil alkollü ekstrelere oranla daha yüksek oranda elastaz enzimini inhibe ettiği ve düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu bulundu (Tablo 3.2).

Mendek, tüm dünya ülkelerinde diüretik, sedatif, yara iyileştirici olarak bilinmekte olup gut ve siyatik hastalığında kullanılmaktadır (123). Yapısında furano kumarin ve kuarsetin glikozid bulunmaktadır (155). Çalışmamızda mendek bitkisinden hazırlanan etil asetatlı ekstrenin, diğer bitkilerin etil asetatlı ekstrelere oranla daha yüksek oranda elastaz enzimini inhibe ettiği ve düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu bulundu (Tablo 3.3).

Kuzu kulağı, kateşin ve epikateşin gibi tanenler (156) ve flavonoidlerce (105) zengindir. Çalışmamızda kuzu kulağı bitkisinden hazırlanan sulu ve etil asetatlı ekstrelere yüksek oranda elastaz enzimini inhibe ettiği bulundu (Tablo 3.1) ve (Tablo 3.3).

Sonuç olarak, çalışmamızda kullandığımız 15 bitkinin sulu, metil alkolü ve etil asetatlı ekstrelere tümünde elastaz inhibitör etkisi saptanmıştır. Bunlardan sulu bitki ekstrelere kara lahana, ezeltire, kuzu kulağı ve ısırgan; metil alkollü ekstrelere söğüt otu, gücükdene, çalı çileği, kara lahana ve mendek; etil asetatlı ekstrelere mendek, kaldirik, sakarca ve kuzu kulağının elastaz inhibitör etkisi diğer bitkilere göre daha yüksek oranda bulundu.

Çalışmamızda, yüksek elastaz inhibitör etkisi gösteren karalahana, söğüt otu ve mendeğin elastaz inhibitörü olarak kırışıklık gidermede, cilt beyazlatmada, kuru cilt ve deri kanseri gibi rahatsızlıklarda fitoterapotik ajan olarak kozmetik sektöründe bitkisel ilaç olarak kullanımının uygun olacağı ileri sürülebilir.

Bu çalışmada elastaz enzimini en yüksek oranda inhibe eden bitkilerin etken maddelerinin izole edilerek yapı tayinlerinin yapılması ve bu maddelerin enzim inhibisyonlarının *in vivo* deneylerle de kanıtlanması için daha ileri düzeyde çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

1. Khrevioğlu, İ. Ö. ve Keha, E. E. 2009. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, İstanbul.
2. Çepel, S. 2011. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 1, İstanbul.
3. Dinç, Y. 2009. Üreaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 1, İstanbul.
4. Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L. and Horneback, W. 2007. Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. *Current Topics in Developmental Biology*.79: 99-155.
5. Robert, L. 2001. Extracellular Matrix and Aging: A Review of Mechanisms and Interventions. *Cosmetics and Toiletries* 116: 61-70.
6. Daamen, W. F., Verkamp, J. H., Van Hest, J. C. M. and Kuppevelt, T. H. 2007. Elastinas a Biomaterial for Tissue Engineering. *Biomaterials* 28: 4378-4398.
7. Nar, H., Werle, K., Bauer, M. M. T., Dollinger, H. and Jung, B. 2001. Crystal Structure of Human Macrophage Elastase (MMP-12) in Complex with a Hydroxamic Acid Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 312: 743 - 751.
8. Partelli, S., Frulloni, L., Minniti, C., Bassi, C., Barugola, G., Onofrio, M., Stefano, C. and Falconi, M. 2012. Faecal Elastase-1 is an Independent Predictor of Survival in Advanced Pancreatic Cancer. *Elsevier* 44: 945-951.

9. Vandivier, R. W., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Bratton, D. L., Penvari, C. and Brown, K. K. 2002. Elastase-Mediated Phosphatidylserine Receptor Cleavage Impairs Apoptotic Cell Clearance in Cystic Fibrosis and Bronchiectasis *Journal of Clinical Investigation* 109: 661-70.
10. Güner, S. 2007. *Biyokimya I*. Kradeniz Teknik Üniversitesi Kitap Satış Bürosu, Trabzon.
11. Altınışik, M. 2009. *Enzimler*. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf>. Web adresinden 12 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
12. Can, A. ve Akev, N. 2008. *Eczacılık Fakültesi Öğrencileri İçin Biokimya Dersleri*. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul.
13. Onat, T., Emerk, K. ve Sözman, E. Y. 2002. *İnsan Biokimyası*. Palme Yayıncılık.
14. Tüzün, C. 1997. *Biyokimya Üçüncü Baskı*. pp. 124-125, Palme Yayınları, Ankara.
15. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Ersoz, A., Dikmen, N., Menten, G. and Özgünen, T. 1993. *Harper'ın Biokimyası*. pp. 978-975-953-311-3, Barış Kitapevi.
16. Tekman, Ş. ve Öner, N. 1981. *Genel Biyokimya Üçüncü Baskı*. pp. 351-367, Fatih Yayınevi, İstanbul.
17. Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A. M. 2006. *Biokimya*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
18. Bingöl, G. 1977. *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ders Kitabı Serisi, Ankara.

19. <http://www.renkliweb.com/kultursanat/enzimlerin-kullanim-alanlari-ve-amaclari.html#ixzz1GmnYKDxG>. Web adresinden 12 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
20. Göğüş, F. ve Fadilolu, S. 2006. *Food Chemistry*. pp. 975-591-871-x, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
21. <http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/3404/4282.pdf>. Web adresinden 12 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
22. Gupta, R., Beg, Q. K. and Lorenz, P. 2002. Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 15-32.
23. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635.
24. <http://www.belgeler.com/blg/1d3c/proteaz-enziminin-fiziksel-adsorpsiyon-kovalent-ve-iyonik-balanma-metotlari-ile-immobilizasyonu-immobilization-of-protease-enzyme-by-physical-adsorption-covalent-and-ionic-binding-methods>. Web adresinden 14 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
25. Niehaus, F., Bertaldo, C., Kahler, M. and Antranikian, G. 1999. Extremophiles as A Source of Novel Enzymes for Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 711-729.
26. Kudrya, V. A. and Simonenko, I. A. 1994. Alkaline Serine Proteinase and Lectin Isolation from The Culture Fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 505-509.
27. Kim, W., Cho, K., Kim, Y., Park, H., Chol, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. and Lee, S. 1996. Purification and Characterization of A Fibrinolytic Enzyme

Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jangs. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2482-2488.

28. Ladenstein, R. and Antranikian, G. 1998. Proteins from Hyperthermophiles: Stability and Enzymatic Catalysis Close to The Boiling Point of Water. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 61: 37-85.
29. Menon, A. S. and Goldberg, A. L. 1987. Protein Substrates Activate The ATP-Dependent protease La by Promoting Nucleotide Binding and Release of Bound ADP. *Journal of Biological Chemistry* 262: 14929-14934.
30. Hendstrom, L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews* 102: 4501-4532.
31. Dodson, G. and Wlodawr, A. 1998. Catalytic Triads and Their Relatives. *Trends in Biochemical Sciences* 23: 347-352.
32. Yousef, G. M., Kopolovic, A. D., Elliott, M. B. and Diamandis, E. P. 2003. Genomic Overview of Serine Proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305: 28-36.
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599274>. Web adresinden 28 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
34. Bhoola, K., Ramsaroop, R., Plend, J., Cassim, B., Dlamaini, Z. and Naicker, S. 2001. Kallikrein and Kinin Receptor Expression in Inflammation and Cancer. *Biological Chemistry* 382: 77-89.
35. [http://en.wikipedia.org/wiki/Serine\\_protease](http://en.wikipedia.org/wiki/Serine_protease). Web adresinden 05 Temmuz 2012 tarihinde edinilmiştir.
36. Walker, B. and Lynas, J. F. 2001. Strategies for The Inhibition of Serine Proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 596-624.

37. Bode, W., Meyer, E. and Powers, J. C. 1989. Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity, and Mechanism-Based Inhibitors. *Biochemistry* 28: 1951-63.
38. Nenan, S., Boichot, E., Lagente, V. and Bertrand, C. P. 2005. Macrophage Elastase (MMP-12): A Pro Inflammatory Mediator? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 167-72.
39. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. 2001. The Role of Elastases Secreted by Fibroblast in Wrinkle Formation: Implication Through Selective Inhibition of Elastase Activity. *Photochemistry and Photobiology* 74: 283-290.
40. Altınışık, M. 2011. *Dokular*, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-23.pdf>. Web adresinden 13 Haziran 2011 tarihinde edinilmiştir.
41. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kollajen>. Web adresinden 28 Kasım 2012 tarihinde edinilmiştir.
42. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Elastin>. Web adresinden 28 Kasım 2012 tarihinde edinilmiştir.
43. ODB. 2011. *Elastas*. Oxford Dictionary of Biochemistry. <http://www.answers.com/topic/elastase>. Web adresinden 28 Kasım 2011 tarihinde edinilmiştir.
44. [http://www.servade.com/servaWeb/www\\_root/documents/Pancreatic%20Elastase\\_20939-31.pdf](http://www.servade.com/servaWeb/www_root/documents/Pancreatic%20Elastase_20939-31.pdf). Web adresinden 06 Temmuz 2012 tarihinde edinilmiştir.
45. Cregge, R. J., Durham, S. L., Farr, R. A., Gallion, S. L., Hare, C. M., Hoffman, R. V., Janusz, M. J., Kim, H. O., Koehl, J. R., Mehdi, S., Metz, W. A., Peet, N. P., Pelton, J. T., Schreuder, H. A., Sunder, S. and Tardif, C. 1998. Inhibition of Human Neutrophil Elastase 4, Design, Synthesis, X-ray

- Crystallographic Analysis and Structure-Activity Relationships for A Series of P2-Modified, Orally Active Peptidyl Pentafluoroethyl Ketones. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 2461-2480.
46. Havemann, G. and Gramse, M. 1984. Physiology and Pathology of Neutral Proteinases of Human Granulocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 164: 1–20.
47. Fujike, K., Shinguh, Y., Yamazaki, A., Hatanaka, H., Okamoto, M. and Okuhara, M. 1999. Inhibition of Elastase Induced Acute Inflammation and Pulmonary Emphysema in Hamsters by A Novel Neutrophil Elastase Inhibitor FR901277. *Inflammation Research* 48: 160-167.
48. Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W. and Travis, J. 1987. Primary Structure of Human Neutrophil Elastase. *Biochemistry* 84: 2228-2232.
49. Crocetti, L., Giovannoni, M. P., Schepetkin I. A., Quinn, M. T., Khlebnikov, A. I., Cilibrizzi, A., Piaz, V. D., Graziano, A. and Vergelli, C. 2011. Design, Synthesis and Evaluation of N-benzoylindazole Derivatives and Analogues as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 4460-4472.
50. Starkey, P. M. 1977. in *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (Barrett, A. J., ed.) pp. 57-89, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
51. Liou, T. G. and Campbell, E. J. 1995. Nonisotropic Enzyme-Inhibitor Interactions: A Novel Nonoxidative Mechanism for Quantum Proteolysis by Human Neutrophils. *Biochemistry* 34: 16171-16177.
52. Kim, W. M. and Kang, K. 2000. Enzymatic and Molecular Biochemical Characterizations of Human Neutrophil Elastases and A Cathepsin G-like Enzyme. *Molecular Cells* 10: 498-504.

53. Bieth, J. G., Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, F. F. 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.
54. Bernstein, P. R., Edwards, P. D. and Williams, J. C. 1994. *Inhibitors of Human Leukocyte Elastase*. pp. 59-120, Elsevier, Amsterdam.
55. Gua, Y., Leeb H. M., Simonc, S. R. and Golub, L. M. 2011. Chemically Modified Tetracycline-3 (CMT-3): A Novel Inhibitor of The Serine Proteinase Elastase. *Pharmacological Research* 64: 595- 601.
56. Crystal, R. G. 1996. Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin Deficiency. *Biology-Pathogenesis-Clinical Manifestations-Therapy*. Markel Dekker, New York.
57. Bode, W. and Huber, R. 1992. Natural Protein Proteinase Inhibitors and Their Interaction with Proteinases. *European Journal of Biochemistry* 204: 433-451.
58. Bode, W. and Huber, R. 1994. Proteinase-Protein Inhibitor Interactions. *Fibrinolysis* 8: 161-171.
59. Ryan, C. A. 1990. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.
60. Shewry, P. R. and Lucas, J. A. 1997. *Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens*. pp. 136-192, Academic Press, London.
61. Creighton, T. E. 1992. The Disulfide Folding Pathway of BPTI. *Science* 256: 111-112.
62. Oliveira, A. S., Franco, O., Melo, F., Grossi de Sa, M. F., Bloch, C. and Sales, M. P. 2002. Activity Toward Bruchid Pest of A Kunitz-Type Inhibitor



from Seeds of The Algaroba Tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 7: 122-132.

63. Macedo, M. L. R., Mello, G. C., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Marangoni, S. and Matos, D. G. G. 2002. Effect of A Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra Mollis* Seeds on The Development of *Callosobruchus Maculatus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 891-898.
64. Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. and Macedo, M. L. R. 2002. Purification and Characterization of A New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra Mollis*. *Journal of Protein Chemistry* 20: 625-632.
65. Oliva, M. L. V., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F. C., Araujo, M. S. A., Silveira, V. F., Auerswald, E. A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, U. M. and Sampaio, C. A. M. 2000. *Leucaena Leucocephala* Serine Proteinase Inhibitor: Primary Structure and Action On Blood Coagulation, Kinin Release and Rat Paw Edema. *Biochemical et Biophysica Acta* 1477: 64-74.
66. Reckel, G. R. K., Kramer, K. J., Baker, J. E., Kanost, M. R., Fabrick, J. A. and Behnke, G. A. 1997. *Proteinase Inhibitors and Resistance of Transgenic Plants to Insects*. pp. 157-183, *The Role of Transgenic Plants*, London.
67. Fook, J. M. S. L. L., Macedo L. L. P., Moura G. E. D. D., Teixeira F. M., Oliveira A. S., Queiroz, A. F. S. and Sales M. P. 2005. A Serine Proteinase Inhibitor Isolated from *Tamarindus Indica* Seeds and Its Effects on The Release of Human Neutrophil Elastase. *Life Sciences* 76: 2881-2891.
68. Kim, Y., Uyama, H. and Kobayashi, S. 2004. Inhibition Effects of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates on Proteinases Causing Proteolytic Degradation of Extracellular Matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320: 256-261.

69. Melzig, M. F., Loser, B. and Ciesielskis, S. 2001. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Phenolic Compounds from Plants. *Pharmazie* 56: 967-970.
70. An, B., Kwak, J., Park, J., Park, T., Lee, J., Son, J., Jo, and C. Byun, M. 2005. Inhibition of Persimmon (*Diospyros kaki*) Leaf on Human Skin. *Dermatologic surgery* 31: 848-855.
71. Baylac, S. and Racine, P. 2004. Inhibition of Human Leukocyte Elastase by Natural Fragrant Extracts of Aromatic Plants. *International Journal of Aromatherapy* 14: 179-182.
72. Kim, H., Chu, T. T. T., Kim, D. Y., Kim, D. R., Nguyen, C. M. T., Choi, J., Lee, J. R., Hahn, M. J. and Kim, K. K. 2008. The Crystal Structure of Guamerin in Complex with Chymotrypsin and The Development of An Elastase-Specific Inhibitor. *Journal of Molecular Biology* 376: 184-192.
73. Oliver, W., Jens, S., Harry, G., Jenice, A. Y. and Enno, C. 1990. Elafin: An Elastase-Specific Inhibitor of Human Skin. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 14791-14795.
74. Baici, A., Salgam, P., Fehr, K. and Böni, A. 1980. Inhibition of Human Elastase from Polymorphonuclear Leucocytes by A Glycosaminoglycan Polysulfate. *Biochemical Pharmacology* 29: 1723-1727.
75. Barnes, P. J. 2002. *Future Therapies*, In: Asthma and COPD. pp. 641-656, North Yorkshire, J&L Composition Ltd.
76. [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/genel\\_cerrahi/dr\\_mert\\_mahsuni\\_s evinc.pdf](http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/genel_cerrahi/dr_mert_mahsuni_s evinc.pdf). Web adresinden 15 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
77. <http://www.sistemlaboratuvari.com.tr/detay.asp?id=2499>. Web adresinden 29 Kasım 2012 tarihinde edinilmiştir.

78. <http://www.kemalaslan.com/FEKAL%20ELASTAZ.pdf>. Web adresinden 15 Haziran 2012 tarihinde edinilmiştir.
79. Takashi, S., Satoshi, T., Takao, M., Michiko, H., Miva, A., Miyuki, T., Takashi, F. and Jun-Ichi, Y. 2006. Neutrophil Elastase and Cancer. *Surgical Oncology* 15: 217-222.
80. Özkul, B. M. ve Erdoğan, Y. 1990. Amfizemin Patogenezi. *Solunum Hastalıkları* 1: 79-86.
81. [http://168.144.121.167/SLNMFH659DEHJH47DWJ3/Dergi/solunum%20191\\_742-747.pdf](http://168.144.121.167/SLNMFH659DEHJH47DWJ3/Dergi/solunum%20191_742-747.pdf). Web adresinden 04 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
82. <http://www.toraks.org.tr/uploadfiles/book/file/2422011175444-119123.pdf>. Web adresinden 05 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
83. Fumiaki, N., Masaiko, H., Akihiro, O. and Muneyuki, S. 2000. Elastase Activity Enhances The Adhesion of Neutrophil and Cancer Cells to Vascular Endothelial Cells. *Journal of Surgical Research* 94: 153-158.
84. Lee, K. K., Kim, J. H., Cho, J. J. and Choi, J. D. 1999. Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity and Their Anti-Inflammatory Effects. *International Journal of Cosmetic Science* 21, 71-82.
85. Alasbahi, R. and Melzig, M. 2008. The *in vitro* Inhibition of Human Neutrophil Elastase Activity by some Yemeni Medicinal Plants. 2008. *Scientia Pharmaceutica* 76: 471-483.
86. Kim, J. H., Byun, J. C., Bandi, A. K. R., Hyun, C. G. and Lee, N. H. 2009. Compounds with Elastase Inhibition and Free Radical Scavenging Activities from *Callistemon lanceolatus*. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 914-920.

87. Masuda, M., Murata, K., Fukuhama, A., Naruto, S., Fujita, T., Uwaya, A., Isami, F. and Matsuda, H. 2009. Inhibitory Effects of Constituents of *Morinda citrifolia* Seeds on Elastase and Tyrosinase. *Journal of Natural Medicines* 63: 267-273.
88. Moon, J. Y., Yim, E. Y., Song, G., Lee, N. H. and Hyun, C. G. 2010. Screening of Elastase and Tyrosinase Inhibitory Activity from Jeju Island Plants. *EurAsian Journal of BioSciences* 4: 41-53.
89. Sahasrabudhe, A. and Deodhar, M. 2010. Anti-Hyaluronidase, Anti-Elastase Activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany* 6: 299-303.
90. Onar, H. C., Yusufoglu, A., Türker, G. ve Yanardağ, R. 2012. Elastase, Tyrosinase and Lipoxygenase Inhibition and Antioxidant Activity of An Aqueous Extract from *Epilobium angustifolium* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 716-726.
91. <http://yukaritepekoyu.tr.gg/Y.oe.remizin-Bitki--Oe-rt.ue.leri.htm>. Web adresinden 02 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
92. Gündoğdu, A. 2005. Doğu Karadeniz Bölgesinde Yetişen Karalahanalarda (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Bazı Element Tayinleri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi pp. 37-40 Trabzon.
93. Farnham, M. W., Grusak, M. A. and Wang, M. 2000. Calcium and Magnesium Concentration of Inbred and Hybrid Broccoli Heads. *Journal of American Society for Horticultural Science* 125: 344-345.
94. Pennington, J. A., Bowse and Churches. 1994. *Food Values, Portions Commonly Used*, 16<sup>th</sup> ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

95. Baytop T. 1996. *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi 2. Baskı*. pp. 146, Nobel Tıp Kitabevleri.
96. Blackwell, W. H. 1990. *Poisonous and Medicinal Plants*. pp. 329. Published by Prentice-Hall, USA.
97. Baytop, T. 1999. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. pp. 480, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
98. Baytop, T. 1984. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul.
99. Yeşilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaiski, Y., Takeda, Y. and Tanaka, T. 1999. Traditional Medicine in Turkey IX: Folk Medicine in North-West Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 195-210.
100. Şimşek, I., AYTEKİN, F., Yeşilada, E. ve Yıldırım, Ş. 2004. An Ethnobotanical Survey of The Beypazarı, Ayaş and GÜDÜL District Towns of Ankara Province (Turkey). *Economic Botany* 58: 705-720.
101. Karagöz, A., Turgut, K. N., Çakır, Ö., Demirgan R. ve Arı, Ş. C. Bazı Yüksek Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Antiviral Aktivite Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir-Turkey.
102. Akçin, Ö. E., Kandemir, N. ve Akçin, Y. 2004. A Morphological and Anatomical Study on a Medicinal and Edible Plant *Trachystemon orientalis* (L.) G. Don (Boraginaceae) in The Black Sea Region. *Turkish Journal of Botany* 28: 435-442.
103. <http://www.sifalibitkitedavisi.com/kuzu-kulagi.html>. Web adresinde 02 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.

104. Davis, P. H. 1967. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburg University Pres, Edinburgh.
105. Zeybek, U. ve Zeybek N. 2002. *Farmasötik Botanik*. Ege Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi. Yayınları, İzmir.
106. <http://www.forumpaylas.net/ziraat-tarim-hayvancilik/55096-cali-cilegi-vaccinium-myrtillus-tarimi.html>. Web adresinden 10 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
107. Eck, P. and Gough, R. E. 1990. *Small Fruit Crop Management*, Pentice Hall, New Jersey.
108. Çelik, H. Bazı Yüksek Çalı Yaban Mersini Çeşitlerinin Rize'deki Performanslarının Saptanması Üzerine Araştırmalar, 1. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Ekim 2003, Ordu-Turkey.
109. Çelik, H. 2004. Türkiye İçin Yeni Bir Meyve Likapa (Yaban Mersini). *Hasad Aylık Gıda Tarım ve Hayvancılık Dergisi*, 20: 42-51.
110. Çelik, H. 2005. *Yaban Mersini (Likapa) Yetiştiriciliği*. Hasad Yayınları, Samsun.
111. Çelik, H. Karadeniz Meyvesi İçin Yeni Bir Meyve Türü Yaban Mersini (Likapa), 2.Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Eylül 2006, Tokat-Turkey.
112. Çelik, H. 2007. Rize İçin Mükemmel Bir Meyve Maviyemiş (Likapa). *Çaykur Rizespor Dergisi* 2: 92-97.
113. De Natale, A. and Pollio, A. 2007. Plants Species in the Folk Medicine of Montecorvino Rovella (Inland Campania, Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 109: 295-303.

114. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Is%C4%B1rgan>. Web adresinden 02 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
115. Makaklı, B. ve Dinçer, M. 1985. *Zararlı Otlar*. Çağ Matbaası, Ankara.
116. Koca, İ., Hasbay, İ. ve Bostancı, Ş. Samsun ve Çevresinde Sebze Olarak Kullanılan Bazı Yabani Bitkiler ve Tüketim Şekilleri. Samsun Sempozyumu, 13-16 Ekim 2011, Samsun-Türkiye.
117. Türel, İ., Ertekin, A., Oto, G., Çelikezen, F. Ç. ve Yaşar, S. 2009. *Urtica Dioica* L. (Isırgan Otu)'nin Metanol ve Su Ekstraktının 7,12-dimetilbenz(a)antrasen Uygulanan Tavşan Tüylerindeki İz Element Seviyeleri Üzerine Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15: 511-515.
118. [http://www.egekoy.com/v1/resim28/goster.asp?klasor=resim/1ege\\_koyu&dosya=ezeltere.jpg&dosya\\_no=88](http://www.egekoy.com/v1/resim28/goster.asp?klasor=resim/1ege_koyu&dosya=ezeltere.jpg&dosya_no=88). Web adresinden 11 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
119. Launert, E: 1981. *Edible and Medicinal Plants, Covers Plants in Europe, a Drawing of Each Plant, Quite a Bit of Interesting information*. Hamlyn.
120. Pokluda, R. and Kuben, J. 2002. Comparison of Selected Swiss Chard (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* L.) Varieties. *Horticultural Science* 29: 114-118.
121. Alibas, I. 2006. Characteristics of Chard Leaves during Microwave, Convective, and Combined Microwave-Convective Drying. *Drying Technology* 24: 1-11.
122. Bolkent, Ş., Yanardağ, R., Tabakoğlu, O. A. ve Saçan, Ö. Ö. 2000. Effects of Chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) Extract on Pancreatic B Cells in Streptozotocin-diabetic Rats; A Morphological and Biochemical Study. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 251-259.

123. Stefanovic, O., Comic L., Stanojevic, D. and Solujic-Sukdolak, S. 2009. Antibacterial Activity of *Aegopodium podagraria* L. Extracts and Interaction Between Extracts and Antibiotics. *Turkish Journal of Biology* 33: 145-150.
124. <http://www.gulresmi.info/kurtpencesi-kurttirnagi-ve-faydalari>. Web adresinden 02 Ocak 2013 tarihinde edinilmiştir.
125. Coode, M. J. E., Cullen, J. and Polygnum, L. 1967. The Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh. *Edinburgh University Press* 2: 269-81.
126. Martindale, W. 1993. Martindale the Extra Pharmacopoeia, 30th ed. The Pharmaceutical Press, London.
127. Duwejua, M., Zeitlin, I. J., Waterman, P. G. and Gray, A. I. 1994. Anti-Inflammatory Activity of *Polygonum Bistorta*, *Guaiacum Officinale* and *Hamamelis Virginiana* in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46: 286-290.
128. <http://yukaritepekoyu.tr.gg/Y.oe.resel-Di%26%23287%3Ber-Bitki-T.ue.rlerini-G.oe.rmek.i%E7inT%26%23305%3Bklay%26%23305%3Bn%26%23305%3Bz.htm>. Web adresinden 02 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
129. [http://www.ulusalpu.com/Bitkiler/Bitkiler\\_1.htm](http://www.ulusalpu.com/Bitkiler/Bitkiler_1.htm). Web adresinden 10 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
130. Kaya, İ., İncekara, N. ve Nemli, Y. 2004. Ege bölgesi'nde Sebze Olarak Tüketilen Yabani Kuşkonmaz, Sirken, Yabani Hindiba, Rezene, Gelincik, Çoban Değneği ve Ebegümececinin Bazı Kimyasal Analizleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (Journal of Agricultural Sciences)* 14: 1-6.



131. Toksoy, D., Bayramoğlu, M. ve Hacısalihoğlu, S. 2010. Usage and the Economic Potential of the Medicinal Plants in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Journal of Environmental Biology* 31: 623-628.
132. Tuzlacı, E. ve Doğan, A. 2010. Turkish Folk Medicinal Plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical Journal* 14: 136-143.
133. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Deri>. Web adresinden 07 Ocak 2013 tarihinde edinilmiştir.
134. [http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr\\_50891.htm](http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr_50891.htm). Web adresinden 07 Ocak 2013 tarihinde edinilmiştir.
135. <http://www.dermoday.com/dosyalar/1234889587.pdf>. Web adresinden 29 Kasım 2012 tarihinde edinilmiştir.
136. [http://www.mc.metu.edu.tr/pdf/ODTU\\_SRM\\_brosur\\_gunes.pdf](http://www.mc.metu.edu.tr/pdf/ODTU_SRM_brosur_gunes.pdf). Web adresinden 17 Aralık 2012 tarihinde edinilmiştir.
137. Davies, G. and Nickol, D. 1990. *Aging in mammals, The Biology of Aging*. pp 40-61, Harper/Row Publishers, New York.
138. Harman, D. 1993. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implication. *Drugs & Aging* 3: 60-80.
139. Robbins, S. L., Cotran, R. S. and Kumar, V. 1989. *Diseases of Aging. Pathologic Basis of Diseases*. pp 543-552, WB Saunders Company.
140. Shorr, R. I. and Carnes, M. 1988. Theories of aging. pp 11-19, Wisconsin Medical Journal.
141. Harman, D. 1988. Free Radicals in Aging. *Mole Celli Biochemistry* 84: 155-161.

142. Nohl, H. 1993. Involvement of Free Radicals in Ageing, A Consequence or Cause of Senescence. *British Medical Bulletin* 49: 653-667.
143. [http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr\\_50892.html](http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr_50892.html). Web adresinden 07 Ocak 2013 tarihinde edinilmiştir.
144. Butterfield, D. A. 2004. Proteomics: A New Approach to Investigate Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Research* 1000: 1-7.
145. Cornelli, U. 2010. Treatment of Alzheimer's Disease with A Cholinesterase Inhibitor Combined with Antioxidants. *Neurodegenerative Disease* 7: 193-202.
146. [http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr\\_50896.html](http://kozmetikdermatolojiozel.turkiyeklinikleri.com/abstract-tr_50896.html). Web adresinden 07 Ocak 2013 tarihinde edinilmiştir.
147. Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willet, WC., Philips, K. M., Jacobs, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The Total Antioxidant Content of More than 3100 Foods, Beverages, Spices, Herbs and Supplements Used Worldwide. *Nutrition Journal* 9: 1-11.
148. Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C. 1994. Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimutajenik Etkilerinin Amest-salmonella Test Sistemi İle Araştırılması. *The Turkish Journal of Botany* 18: 117-122.
149. Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. 2003. Suppression of *Helicobacter pylori* Induced Gastritis by Green Tea Extract in Mongolian Gerbils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310: 715-719.

- 150.** Ho, C. T., Ferraro, T., Chen, Q., Rosen, R. T. 1994. Phytochemical in Teas and Rosemary and Their Cancer Preventive Properties. Food Phytochemicals for Cancer Prevention. II. Tea, Spices and Herbs. (Eds) Ho, C.-T., Osawa, T., Huang, M. T., Rosen, R. T. ACS Symposium Series 547. American Chemical Society, Washington DC. 2-9.
- 151.** Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H. and Osawa, T. 1991. Antioxidizing Component, Musizin, in *Rumex Japonicus* Houtt. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68: 735-739.
- 152.** Lee, K. K., Choy, J. J., Park, E. J. and Choiy, J. D. 2001. Anti-Elastase and Anti-Hyaluronidase of Phenolic Substance from *Areca Catechu* as A New Anti-Ageing Agent. *International Journal of Cosmetic Science* 23: 341-346.
- 153.** Alibaş, I. 2009. Microwave, Vacuum and Air Drying Characteristics of Collard Leaves. *Drying Technology* 27: 1266-1273.
- 154.** Gündoğdu, A., 2005. Doğu Karadeniz Bölgesinde Yetişen Karalahanalarda (*Brassica oleracea* var. *acephala*) Bazı Element Tayinleri. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, pp. 165, Trabzon.
- 155.** Harborne, B. J. and Baxter, H. 2001. *Chemical Dictionary of Economic Plants*, John Wiles and sons Ltd., England.
- 156.** Stoggl, W. M., Huck, C. W. and Gunther, K. 2004. Structural Elucidation of Catechin and Epicatechin in Sorrel Leaf Extracts Using Liquid-Chromatography Coupled to Diode Array-, Fluorescence-, and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Separation Science* 27: 524-528.

## ÖZGEÇMİŞ

22.02.1986 tarihinde Kars İli'nde doğdu. İlkokul öğrenimini Hacı Halil Köyü İlkokulu'nda (Kars), ortaokul öğrenimini Vali Kutlu Aktaş Okulu'nda (İzmir), lise öğrenimini Salih Dede Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde (İzmir) tamamladı. 2006 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu.