

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI DOĞAL BİTKİ EKSTRELERİNİN ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Khalid S. ABDALRAHMAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI DOĞAL BİTKİ EKSTRELERİNİN ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Khalid S. ABDALRAHMAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Hiperglisemi sürecinde, renal glomerüler ve tübüler hücreler, periferik sinir sistemi ve retina dokusunda aldoz redüktaz enzim aktivitesi yüksektir ve nefropati, nöropati ve retinopati gibi uzun süreli diyabetik komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca aldoz redüktaz enzimi, lipid aldehytler, glutatyon ile birleşmiş lipid aldehytler, fosfolipidler, aterosjenik aldehytler ve steroidler gibi çeşitli bileşiklerin indirgenmesini katalizleyerek sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, endotoksinler ve allerjenler ile başlatılan sinyallerin iletiminde aracılık etmekte ve doku metabolizmasında bozukluklar yaratmaktadır. Bu durum sonucunda meme, kolon, karaciğer, akciğer, prostat, yumurtalık ve endometriyal (rahim) kanseri gibi değişik kanserler gelişebilir. Diyabetik komplikasyonlar ve değişik kanserlerin oluşumunu geciktirmek veya engellemek amacıyla bulunmuş olan çok sayıda farklı aldoz redüktaz inhibitörleri bazı yan etkilerinden dolayı klinik olarak kullanılmamakta ve günümüze dek yan etkileri olmayan aldoz redüktaz inhibitörlerinin araştırılması devam etmektedir. Tez çalışmamızda, polifenol ve özellikle flavonoid bileşikleri içeren *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Reseda lutea* L. ve *Echinops ritro* L. bitki özütlерinin sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılmış aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. İncelenen örneklerin arasında *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. yaprakları özütü aldoz redüktaz enzim aktivitesini % 90 oranı ve 231.5 ng/mL IC50 değeri ile inhibe etmiştir. Gelecekte, *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. yaprakları özütü diyabetik komplikasyonların ve çeşitli kanserlerin gelişimini engellemek amacı ile daha fazla araştırılabilir.

Temmuz 2013, 41 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Reseda lutea* L., *Echinops ritro* L., aldoz redüktaz inhibisyonu, diyabet, kanser

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION THE EFFECTS OF SOME NATURAL PLANT EXTRACTS ON ALDOSE REDUCTASE ENZYME ACTIVITY

Khalid S. ABDALRAHMAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

The high activity of aldose reductase in the renal glomerular and tubular cells, peripheral nervous system and retinal tissue during hyperglycemia has been implicated in the development of long term diabetic complications such as diabetic nephropathy, diabetic neuropathy and diabetic retinopathy. Also, aldose reductase enzyme mediates the molecular signaling induced by cytokines, chemokines, growth factors, endotoxins and allergens by catalyzing the reduction of lipid aldehydes, glutathione conjugates of lipid aldehydes, phospholipids, atherogenic aldehydes and steroids leading to disorders in normal tissue metabolism. As a result of this process breast, colon, liver, lung, prostate, ovarian and endometrial cancers may develop. Many different aldose reductase inhibitors that have been found to delay or to prevent the emergence of diabetic complications and various cancers are not used clinically because of their side effects. Till today, the researches on the aldose reductase inhibitors that have no side effects are carried on. In this thesis, the effects of extracts of *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Reseda lutea* L. and *Echinops ritro* L. that contain polyphenols and especially flavonoids on partially purified aldose reductase enzyme activity were investigated. Among the samples, the extract of *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. leaves has inhibited the aldose reductase enzyme activity with 90 % ratio and 231.5 ng/mL of IC₅₀ value. In the future, the extract of *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. leaves can be investigated further to prevent the development of diabetic complications and various cancers.

July 2013, 41 pages

Key Words: *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Reseda lutea* L., *Echinops ritro* L., aldose reductase inhibition, diabetes, cancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında sabır ve hoşgönülle bana destek olan, bilgilerini bana esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren, bana engin fikirler ve tecrübelerini sunan saygı değer Doç. Dr. Yasemin G. İŞGÖR ve saygı değer Yrd. Doç. Dr. S. Belgin İŞGÖR'e,

Tez çalışmamda kullandığım bitki örneklerini toplayan, sistematik tür teşhislerini yapan ve ekstrakt edilmeye hazır şeklinde bana sağlayan, saygı değer Doç. Dr. Fatmagül GEVEN ve ekibine,

Her zaman bana ister maddi ister manevi destek olan sevgili aileme,

Suyunu içtiğim ve ekmeğini yediğim Türkiye Cumhuriyeti'ne,

Laboratuvar ortamında benimle yan yana çalışan, içermde her birisinin güzel hatıraları olan sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve bana yalnızlığı hiç hissettirmeyen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Khalid S. ABDALRAHMAN
Ankara, Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1 <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	2
2.2 <i>Reseda lutea</i> L.	2
2.3 <i>Echinops ritro</i> L.	3
2.4 Aldoz Redüktaz Enzimi.....	4
2.5 Aldoz Redüktaz Enziminin Detoksifikasyondaki Rolü.....	6
2.6 Glukoz Metabolizması ve Diyabette Aldoz Redüktaz Enzimine Bağlı Komplikasyonlar.....	7
2.7 Aldoz Redüktaz Enzimi ve Kanser.....	9
2.8 Aldoz Redüktaz Enziminin İlaç Direncindeki Rolü.....	10
2.9 Sentetik Aldoz Redüktaz İnhibitörlerine Genel Bakış.....	11
2.10 Bitki Kaynaklı Aldoz Redüktaz İnhibitörlerine Genel Bakış.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal.....	17
3.2 Yöntem.....	18
3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması ve ekstraksiyon aşamasına hazırlanması.....	18
3.2.2 Bitki ekstraksiyonu.....	18
3.2.3 Bitki özütlerinin polifenol miktar tayini.....	19
3.2.4 Bitki özütlerinin flavonoid miktar tayini.....	20
3.2.5 Aldoz redüktaz enziminin izolasyonu.....	21
3.2.6 Protein miktar tayini.....	21
3.2.7 Aldoz redüktaz enzim aktivite tayini.....	23
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	31
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	41

SİMGELER DİZİNİ

AKR'lar	Aldo-Keto Redüktazlar
AKR1	Aldo-Keto Redüktaz 1
AKR1A	Aldehit Redüktazlar
AKR1B	Aldoz Redüktazlar
AKR1C	Hidroksisteroid/Dihidrodiol
	Dehidrogenazlar
AKR1D	Steroid 5 β -Redüktazlar
ALDH	Aldehit Dehidrogenaz
AR	Aldoz Redüktaz
ARL-1 protein	Aldoz Redüktaz Benzeri-1 protein
BSA	Sığır Serum Albümini
COX-2	Siklooksigenaz-2
Cu ⁺²	Bakır İyonu
CYP-450	Sitokrom P-450
Cys.	Sistein
DDS	Distile Deiyonize Su
DL-GA	DL-Gliseraldehit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilin Diamin Tetra Asetik Asit
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
GA	Gallik Asit
H ⁺	Proton
H ⁻	Hidrit
His.	Histidin
IC50	% 50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon
<i>in vitro</i>	Laboratuar Ortamında veya Yapay Koşullarda
<i>in vivo</i>	Canlı Ortamda veya Yaşayan Koşullarda
MAPK'lar	Mitojen ile Aktifleştirilen Protein Kinazlar
Na ⁺	Sodyum İyonu
Na ⁺ -K ⁺ -ATPaz	Sodyum-Potasyum-Adenozin Trifosfataz
Na ⁺ -K ⁺ -Tartarat	Sodyum-Potasyum-Tartarat
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OD/dk	Dakikadaki Absorbans Değişimi
pKa	İyonlaşma Sabiti
PKC	Protein Kinaz C
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florid

RAR

RXR

SDH

TPI

Trp.

TÜBİVES

Tyr.

USFDA

VEGF

Retinoik Asit Reseptörü

Retinoid X Reseptörü

Sorbitol Dehidrogenaz

Trioz Fosfat İzomeraz

Triptofan

Türkiye Bitkileri Veri Servisi

Tirozin

Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	2
Şekil 2.2	<i>Reseda lutea</i> L.	3
Şekil 2.3	<i>Echinops ritro</i> L.	4
Şekil 2.4	Aldoz redüktaz enziminin kristal yapısı.....	5
Şekil 2.5	Polyol yolağının ilk iki aşaması.....	7
Şekil 2.6	Diyabetik nöropati patogeneğinde miyoinositol yolu.....	8
Şekil 2.7	Daunorubisinin aldoz redüktaz enzimi yoluyla indirgenmesi.....	11
Şekil 2.8	Arlestatin, tolrestat, epalrestat, zopolrestat, sorbinil, fidalrestat, minalrestat ve ranirestat.....	13
Şekil 4.1	AR enzim aktivite eğrisi (Spektrometreden alınan aktivite eğrisi).....	27
Şekil 4.2	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	28
Şekil 4.3	<i>Reseda lutea</i> L. bitki çiçeği özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	28
Şekil 4.4	<i>Reseda lutea</i> L. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	29
Şekil 4.5	<i>Echinops ritro</i> L. bitki çiçeği özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	30
Şekil 4.6	<i>Echinops ritro</i> L. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Bitki özütlerinin toplam polifenol miktar tayinin çalışma şeması.....	19
Çizelge 3.2	Bitki özütlerinin toplam flavonoid miktar tayinin çalışma şeması.....	20
Çizelge 3.3	Protein miktar tayinin çalışma şeması.....	22
Çizelge 4.1	Bitki özütlerinin toplam polifenol ve toplam flavonoid miktarları.....	26

1. GİRİŞ

Aldoz redüktaz (AR) enzimi glukoz metabolizmasının ilk aşamasında glukozun sorbitole dönüşümünü gerçekleştirerek hücrelerin enerji ihtiyacını sağlamaktadır. Ayrıca AR enzimi yoluyla toksik aldehytlerin eşlenik alkollere çevirilmesi ve oluşan alkollerin diğer mekanizmalar eşliğinde sülfat ile birleşmesi toksik aldehytlerin zararsız halde vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

Öte yandan renal glomerüler ve tübüler hücreler, periferik sinir sistemi ve retina dokusu gibi glukoz alımı için insüline gereksinimi olmayan dokularda AR enzim aktivitesi yüksektir ve glukozun sorbitole dönüşümü fazladır. Yüksek seviyede üretilen sorbitolün dokularda birikmesi dokularda stres yaratmakta ve nefropati, nöropati ve retinopati gibi uzun süreli diyabetik komplikasyonlara neden olmaktadır. Ayrıca AR enzimi lipid aldehytler, glutatyon ile birleşmiş lipid aldehytler, fosfolipidler, aterojenik aldehytler ve steroidler gibi çeşitli bileşiklerin indirgenmesini katalizleyerek sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, endotoksinler ve allerjenler ile başlatılan sinyallerin iletiminde aracılık etmektedir. Lipid peroksidasyonundan üretilen lipid aldehytler oksidatif strese yol açarak ve doku metabolizmasında ve sinyal iletiminde bozukluklar yaratarak değişik proteinlerin yüksek gen ifadesine neden olmaktadır. Değişik proteinlerin yüksek gen ifadesi sonucunda meme, kolon, karaciğer, akciğer, prostat, yumurtalık ve endometriyal (rahim) kanseri gibi değişik kanserler görülmektedir.

AR enzimi α/β fıçı modelinde ve aktif bölgesi substrat veya inhibitör madde ile etkileşime girebilen hidrofobik ve hidrofilik kısımlar taşımaktadır. İnhibitör maddeler bu bölgeyle ne kadar uyumlu olursa enzim aktivitesinin de o oranda azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle enzimin inhibisyonu için çeşitli AR inhibitörleri geliştirilerek diyabetik komplikasyonlar ve kanserlerin oluşumunu engellemek ya da geciktirmek amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda planladığımız tez çalışmamızda polifenol ve özellikle flavonoid bileşikleri içeren *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Reseda lutea* L. ve *Echinops ritro* L. bitki ekstraktlarının (özütlerinin) AR enzim aktivitesi üzerine olan etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.

Diplotaxis tenuifolia (L.) DC. (Şekil 2.1), Brassicaceae ailesine ve *Diplotaxis* cinsine ait çok yıllık bitki türüdür. Dünyada genel olarak Güney ve Orta Avrupa, Kuzey Batı Afrika, Kırım, Kafkasya ve Batı Suriye’de dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise, Kuzey Anadolu ve Batı Anadolu bölgelerinde dağılım göstermektedir. Yabani Roka adı ile tanınan *D. tenuifolia* halk tarafından ham veya pişmiş halinde salata ve çorbada kullanılmaktadır. *D. tenuifolia*’nın fitokimyasal yapısında Brassicaceae ailesinin birçok türü gibi yüksek miktarda glukozinolat, flavonoid, fenolik bileşikler ve vitamin C bulunmaktadır. Ayrıca *D. tenuifolia* yüksek miktarda kuersetin türevleri de içermektedir (Bennett vd. 2006, Martinez-Sanchez vd. 2007, Jin vd. 2009, Anonim 2013).



Şekil 2.1 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. (Anonim 2013)

2.2 *Reseda lutea* L.

Reseda lutea L. (Şekil 2.2) halk arasında Muhabbet çiçeği olarak tanınmaktadır. *R. lutea* Resedaceae ailesine ve *Reseda* cinsine ait tek veya iki veya çok yıllık bitki türüdür. Dünyada genel olarak İran’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise; Güney Doğu

Anadolu, Batı Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde dağılım göstermektedir. *Reseda* cinsine ait olan 60 tür dünya çapında tanınmaktadır, ama bunlardan sadece 15 tür Türkiye’de dağılım göstermektedir. *R. lutea* ve *Reseda luteola* Türkiye’de boya maddesi olarak el dokuması halılarda kullanılmaktadır (Davis 1979, Doğan 2001, Kızıl ve Kayabaşı 2005, Anonim 2013).

Kimyasal açıdan *R. lutea* bitki tohum ve mirosin hücreleri karbohidratlar, glikozitler, antosiyaninler, flavin ve flavonoidler içermektedir. Ayrıca bitki tohumunda linolenik asidin bulunduğu ve bitki yağ asidi içeriğinin % 60’ını oluşturduğu bilinmektedir. Boya maddesi olarak da luteolin içermekte ve bu maddenin özellikle çiçeklenme döneminde yükselmesi bilinmektedir (Doğan 2001, Kızıl ve Kayabaşı 2005).



Şekil 2.2 *Reseda lutea* L. (Anonim 2013)

2.3 *Echinops ritro* L.

Halk arasında topuz olarak tanınan *Echinops ritro* L. (Şekil 2.3), Asteraceae ailesine ve *Echinops* cinsine ait çok yıllık bitki türüdür. Dünyada genel olarak Güney ve Orta Avrupa, Güney ve Orta Rusya, Kırım, Kafkasya, Transhazar, Türkistan ve Sibirya’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise; Kuzey Batı Anadolu, Batı Anadolu, Güney Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinde dağılım göstermektedir. *E. ritro*’nın fitokimyasal yapısında kuinolin alkaloidler, seskiterpenler, tiyofenler, yağ asitleri ve alkanlar

bulunmaktadır. Ayrıca *E. ritro*'nın yapısında kuersetin bulunmaktadır (Bohm ve Stuessy 2001, Fokialakis vd. 2006, Anonim 2013).

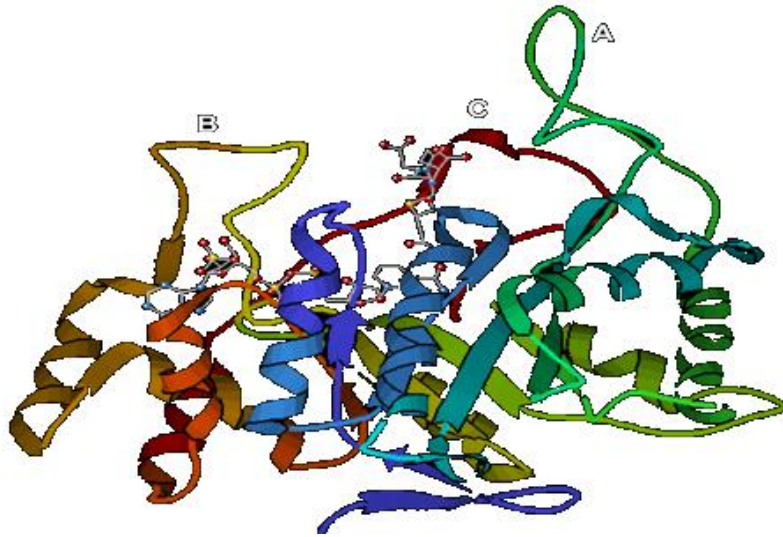


Şekil 2.3 *Echinops ritro* L. (Anonim 2013)

2.4 Aldoz Redüktaz Enzimi

Aldo-keto redüktazlar (AKR'lar), oksidoredüktazlar olarak da adlandırılan bu enzimler indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NADPH) kofaktör olarak kullanmakta ve aldehit ve ketonlarda bulunan karbonil gruplarını indirgeyerek bunların birincil (primer) veya ikincil (sekonder) alkollere dönüşümünü gerçekleştirmektedirler. Metabolizmada oluşan bu alkoller bir dizi tepkime sonucunda sülfat veya glukuronidler ile birleşerek vücuttan atılmaktadırlar. Dolayısıyla AKR'lar eliminasyon reaksiyonlarında önemlidir. Aldo-keto redüktaz (AKR) süper ailesi 14 üyeden oluşmaktadır. Bunlardan aldo-keto redüktaz 1 (AKR1) ailesi; aldehit redüktaz (AKR1A), aldoz redüktaz (AKR1B), hidroksisteroid/dihidrodiol dehidrogenaz (AKR1C) ve steroid 5 β -redüktaz (AKR1D) alt ailelerden oluşmaktadır. AKR süper ailesi enzimlerinin şeker ve lipid aldehitleri, steroid hormonlar, prostaglandinler ve kanserojenler gibi çok farklı molekülleri substrat olarak kullandığı bilinmektedir. Bu nedenle AKR'lar ksenobiyotikler ve kanserojenleri metabolize eden enzimler olarak da kabul edilmektedirler (Hyndman vd. 2003, Penning 2004).

Enzim komisyonu tarafından 1.1.1.21 kodu verilen ve AKR süper ailesinin üyesi olan AR enzimi, aldehytlerin indirgenmesini katalizleyen monomerik bir enzimdir. AR enzimi 1956 yılında sperm hücrelerine enerji kaynağı sağlayan enzim olarak Hers tarafından tanımlanmıştır. 1959 yılında Heyningen kataraktogenez sürecinde AR enziminin katalizlediğinde oluşan sorbitol ve galaktitolün fare lenslerinde biriktiğini göstermiştir. Kinoshita ise, 1981 yılında polyollerin lenslerdeki birikmesinin intraselüler ozmotik strese neden olabileceğini belirtmiştir. Daha sonraki çalışmalarda AR enziminin lens ve diğer dokulardaki aldozları polyollere çeviren tek enzim olduğu ve bu yüzden de hiperglisemi oluşumunda temel görevi olduğu belirtilmiştir. AR enziminin 316 amino asitten oluştuğu ve moleküler ağırlığının 36 kDa olduğu bilinmektedir. İnsan plasenta AR enzimi ve domuz AR enzimi incelenerek, trioz fosfat izomeraz (TPI) enzimine benzerlik gösteren AR enzim yapısı ilk olarak 1992 yılında belirlenmiştir. Bu yapıda dış yüzeyde bulunan sekiz α -sarmal iç yüzeyde yer alan sekiz paralel β -iplikler aracılığıyla birbirlerine bağlanmaktadır (Hers 1956, Heyningen 1959, Kinoshita vd. 1981, Petrash vd. 1992, Srivastava vd. 2005, Oates 2008, Alexiou vd. 2009) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Aldoz redüktaz enziminin kristal yapısı (Barski vd. 2008)

NADPH ile etkileşime giren terminal karboksil bölge, enzimin aktif bölgesini temsil etmektedir. AR enzimi, katalizlediği reaksiyonlarda NADPH'dan bir hidrit (H^-) ve çözültiden de bir proton (H^+) alıp karbonillere eklemektedir. Substratlar ile AR

enziminin bağlanması enzimin aktif bölgesindeki amino asit kalıntılarına bağlıdır. Aktif bölgenin yakınında yer alan 298. Sistein (Cys.) kalıntısı enzimin katalitik aktivitesini ve inhibitörlere karşı duyarlılığını kontrol etmektedir (Petrash vd. 1992).

2.5 Aldoz Redüktaz Enziminin Detoksifikasyondaki Rolü

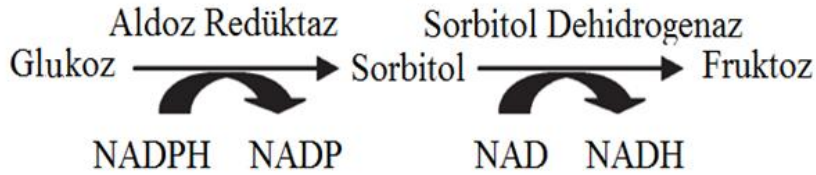
AR enziminin substratını tanıması ve buna bağlanması, enzimin aktif bölgesindeki yük dağılımıyla ve dolayısıyla hidrofobik etkileşimlerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca AR enziminin aktif bölgesindeki hidrofobik amino asitlerden oluşan dizinin varlığı sayesinde enzimin hidrofobik aldehitlere gösterdiği afinite (ilgi) hidrofilik aldolara gösterdiği afiniteden daha fazla olduğu gösterilmiştir (Srivastava vd. 1999, Srivastava vd. 2005).

Aldehitler genel olarak lipid peroksidasyonu ve ksenobiyotik transformasyonu yoluyla üretilen, oldukça toksik bileşiklerdir. Bu bileşiklerin hücrelerde birikmesinin metabolik yolakta ciddi sorunlara neden olduğu belirlenmiştir. Bu sorunlar arasında istenmeyen protein çarpaz bağlanmalarının oluşması, enzimlerin inaktifleşmesi, protein ve deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinin inhibisyonu, mitokondri hasarı ve DNA yapısında bozunmalar sayılabilir. Bu ve benzeri birçok mekanizmanın birarada etkinleşmesiyle kontrolsüz hücre çoğalmasına (proliferasyonuna) neden olduğu da belirlenmiştir. AR enziminin aldehitlerin detoksifikasyonundaki rolü ise, bu toksik aldehitleri, eşlenik alkollere çevirmesi tepkimesini katalizlemesiyle gerçekleşmektedir. Burada oluşan alkollerin diğer mekanizmalar eşliğinde sülfat ile birleştirilerek toksik aldehitlerin zararsız halde vücuttan uzaklaştırılması mümkün olur (Srivastava vd. 1995, Vander Jagt vd. 1995, Sarye vd. 1997, Srivastava vd. 2005, Kumar ve Reddy 2007).

Tüm bunlara ek olarak AR enziminin lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan aldehitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan kritik enzimlerden birisi olduğu belirlenmiştir. AR inhibitörlerinin kullanımı sonrasında iltihaplanmanın artması ve benzeri sonuçlar, AR enziminin detoksifikasyondaki etkinliğini göz önüne çıkarmaktadır (Rittner vd. 1999, Shinmura vd. 2002, Srivastava vd. 2005).

2.6 Glukoz Metabolizması ve Diyabette Aldoz Redüktaz Enzimine Bağlı Komplikasyonlar

AR enzimi glukoz metabolizmasının ilk aşamasında glukozun sorbitole dönüşümünü sağlamaktadır. Sorbitol ise, sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimi tarafından okside edilerek fruktoza çevrilmektedir (Crabbe 1991) (Şekil 2.5).

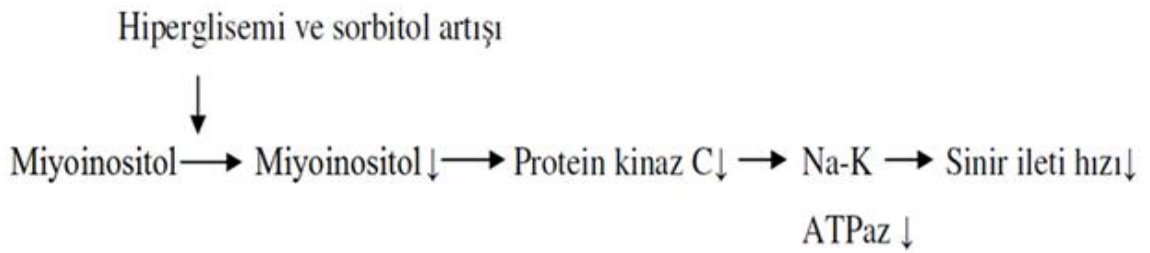


Şekil 2.5 Polyol yolağının ilk iki aşaması (Patra ve Chua 2010)

Hiperglisemi sürecinde glukozun AR enzimi yoluyla sorbitole dönüşümü ozmotik strese neden olabilmektedir. Ozmotik stres de fonksiyon bozukluğu, sinyal bozukluğu veya yoğun hücre ölümü gibi sonuçlara neden olmaktadır. Sonuçta diyabetik retinopati, diyabetik nöropati ve diyabetik nefropati gibi hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Ancak AR enziminin aktif bölgesinde hidrofobik amino asitlerin bulunması nedeniyle, hidrofilik aldozlara gösterdiği afinite düşüktür. Böylece glukozun AR enzimi tarafından sorbitole indirgenmesi AR enzimi için ikincil görev olarak kabul edilmektedir ve çoğu kez sorbitolün herhangi bir dokuda birikmesi hastalık yaratacak seviyeye ulaşmamaktadır (Srivastava vd. 1999, Srivastava vd. 2005, Alexiou vd. 2009).

Diyabetik hastalarda, polyoller diyabetik retinopati olarak bilinen hücre hasarına neden olabilmektedir. Diyabette retina dokusu gibi glukoz alımı için insüline gereksinimi olmayan dokularda AR enzim aktivitesi yüksektir. Buna bağlı olarak sorbitol oluşumu da fazladır. Bu mekanizma sonucu oluşan polyoller hücre membranından difüzyonu kolay olmadığı için hücre içinde birikir ve ozmotik stres yaratarak vasküler endotel hücre hasarı oluştururlar. Hücre hasarı ve mikrovasküler tıkanma sonucu olarak da retinal iskemi ve hipoksisi oluşur. Vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) uyarılması ile beslenemeyen alanları kanlandırmak için normalde bulunmayan kollateral damarların oluşumu ve diyabetik retinopati ortaya çıkar. Benzer şekilde periferik sinir

sisteminde de glukozun hücre içine girişi insülininden bağımsızdır ve AR enzim aktivitesi yüksektir. Buna göre de, miyoinositol taşıyıcılarının kompetatif inhibitörü olan glukoz miktarlarının azalması hücre içi miyoinositol miktarlarını da azaltamaktadır. Hücre içi miyoinositol miktarlarının azalması ise, sodyum-potasyum-adenozin trifosfataz ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$) enzim aktivitesini düşürmekte ve hücre içi sodyum iyonunun (Na^+) birikmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda ozmolaritenin artması, hücre zar yapısının bozulması ve periferik sinirlerde sinir ileti hızlarının yavaşlaması ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.6) (Çelik 2005, Karayalçın 2007, Aladağ 2008).



Şekil 2.6 Diyabetik nöropati patogenezinde miyoinositol yolu (Karayalçın 2007)

Benzer şekilde, glukozun hücre içine girişinin insülininden bağımsız olması ve yüksek AR enzim aktivitesi yoluyla diyabetik nefropati de ortaya çıkmaktadır. Diyabetik hiperglisemi ile böbreklerde yani renal glomerüler ve tübüler hücrelerde NADPH tüketimi ve sorbitol üretimi artarak hücre içi miyoinositol miktarları ve $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ enzim aktivitesi azalmaktadır. Bunun sonucunda hücre içi Na^+ atılamaması ve ozmolarite artması ortaya çıkmaktadır. Ayrıca sorbitolün artması ile NADPH azalması glutatyon metabolizmasını bozmakta ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu metabolik süreçlerin sonunda vasküler hasar artarak perisitlerin fonksiyonu bozulmakta ve böylece doku iskemisi ve hipoksisi artmaktadır. Ortaya çıkan iskemik ve hipoksik durum VEGF'nin sentezini uyararak yeni kan damarlarının oluşumuna ve diyabetik nefropatinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Polyol yolağının aktivasyonunu inhibe ederek nefropatinin azaltılabileceğini bildiren çalışmalar vardır. Ancak bu amaçla kullanılan AR inhibitörlerinin yeri halen tartışmalıdır (Tuğrul 2002).

2.7 Aldo Redüktaz Enzimi ve Kanser

AR enzimini kodlayan gen primitif sinyallere yanıt göstererek ve ozmotik ve oksidatif stres nedenleriyle yüksek derecede ifade edilmektedir. Kanserli insan karaciğer dokularının % 29'unda, kanserli insan meme dokularının % 17'sinde, kanserli insan yumurtalık, serviks ve rektum dokularının ise, % 20'sinde AR enziminin yüksek gen ifadesi belirlenmiştir (Saraswat vd. 2006, Alexiou vd. 2009).

Ayrıca kanserli insan karaciğer dokularının % 54'ünde, skuamöz hücreli akciğer karsinomlarının % 84.4'ünde ve akciğer adenokarsinomlarının % 29.2'sinde aldoz redüktaz benzeri-1 proteinin (ARL-1) yüksek gen ifadesi belirlenmiştir (Cao vd. 1998, Fukumoto vd. 2005, Penning 2005).

Ayrıca AR enziminin yüksek gen ifadesi karaciğer, akciğer, meme, serviks ve kolon kanserlerinin ilerlemesine de neden olduğu belirlenmiştir. AR enzimi kanser hücrelerinin büyümesine veya hayatta kalmasına gerekli olan genlerin yüksek derecede ifade edilmesine aracılık etmekte ve kanser hücrelerinin anti kanser ilaçlara karşı dayanıklılığını yükseltmektedir. AR enzimi değişik mekanizmalar yoluyla birçok kanser türünün metabolizmasında arabulucu olarak belirlenmiştir (Alexiou vd. 2009, Balendiran vd. 2009, Nishinaka vd. 2011).

AR enzimi lipid aldehitler, glutasyon ile birleşmiş lipid aldehitler, fosfolipidler, aterojenik aldehitler ve steroidler gibi çeşitli bileşiklerin indirgenmesini katalizleyerek sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, endotoksinler ve allerjenler ile başlatılan sinyallerin iletiminde aracılık etmektedir (Yadav vd. 2010).

Kolon kanserinin gelişiminde büyüme faktörleri, sitokinler ve lipopolisakkaridler gibi endotoksinlerin hücre zarında bulunan özgül reseptörlerle bağlanması hücre içindeki NADPH oksidaz enzimi uyarmaktadır. NADPH oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonların yoluyla üretilen serbest oksijen radikalleri de lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu yoluyla üretilen lipid aldehitler ve glutasyon ile birleşmiş lipid aldehitler AR enzimi yoluyla indirgenerek protein kinaz C (PKC) enziminin uyarılmasına neden olmaktadır. PKC enzimi ise, transkripsiyon faktörlerini

aktive ederek prostaglandinlerin biyosentezindeki ilk iki basamakları katalizleyen Siklooksigenaz-2 (COX-2) enzimini kodlayan genlerin transkribe edilmesine ve kontrol edilemeyen kolon epitelyal hücrelerinin çoğalmasına yol açmaktadır (Tammali vd. 2006, Tammali vd. 2007).

Bazı tümörlerin oluşumunda ise, AR enzimi izoprenil aldehytleri (farnesal ve geranilgeranial) izoprenil alkollere (farnesol ve geranilgeraniol) çevirmektedir. İzoprenil alkoller de fosforile edilerek pirofosfatlara (farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfat) dönüşmektedir. Pirofosfatlar ise, G-proteinlerine prenil grubu ekleyerek bu tür proteinlerin hücre zarına bağlanmasına ve mitojen ile aktive edilen protein kinazların (MAPK'lar) uyarılmasına neden olmaktadır. MAPK'ların uyarılması da hücre çoğalması ve tümör oluşumuna yol açmaktadır (Matsunaga vd. 2012).

Akciğer kanserinde ise, aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimi yoluyla retinoik asitlere çevrilen retinaller ve daha sonra retinoik asitlerin de retinoik asit reseptörü (RAR) ve retinoid X reseptörüne (RXR) bağlanması yoluyla hücrelerin farklılaşma mekanizması AR enziminden etkilenmektedir. AR enzimi, retinalleri retinollere çevirerek hücre içi retinoik asit miktarlarını düşürmekte ve hücrelerin anormal çoğalma ve farklılaşmasına neden olmaktadır (Penning 2005, Heringlake vd. 2010).

2.8 Aldoz Redüktaz Enziminin İlaç Direncindeki Rolü

AR enziminin yüksek gen ifadesi kanser hücrelerinin anti kanser ilaçlara karşı gösterdiği dayanıklılığı yükseltmektedir (Nishinaka vd. 2011).

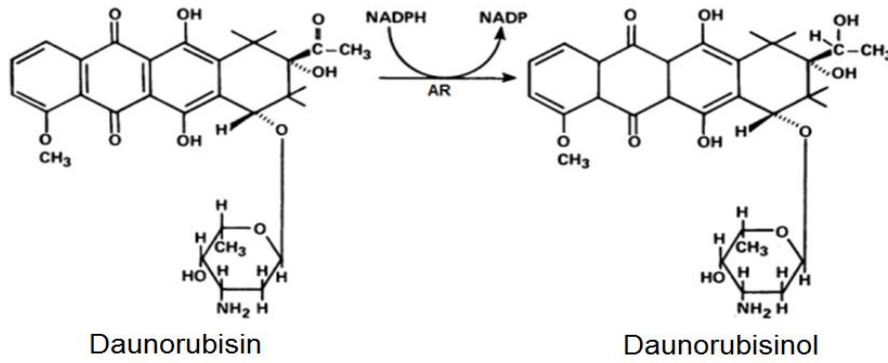
Medülloblastomlarda (beyincik tümörlerinde) siklofosfamide karşı dayanıklılık araştırıldığında AR enziminin sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır. AR enzimi siklofosfamidin bir ara ürünü olan aldofosfamidi alkofosfamide çevirerek bu ilacın etki mekanizmasını durdurmaktadır (Matsunaga vd. 2012).

Siklofosfamidin etki mekanizmasında ilk önce siklofosamid sitokrom P-450 (CYP-450) enzimi tarafından 4-hidroksisiklofosfamide çevrilmiştir. 4-hidroksisiklofosamid aldofosfamide dönüşebilir bir metabolittir. Aldofosamid de β -

eliminasyon reaksiyonu ile fosfamid mustard ve akroleine parçalanmaktadır. Fosfamid mustard da bir alkilleme ajanı olarak DNA'ya alkil grubu ekleyerek DNA replikasyonunu durdurmaktadır. AR enzimi ise, siklofosfamidin ara ürünü olan aldofosfamidi alkofofosfamide çevirerek siklofosfamid metabolizmasını kaydırmakta ve etkisini kaybettirmektedir (Zhang vd. 2006, Surabhi 2007).

Ayrıca antrasiklin antibiyotikleri lösemi, lenfoma, meme, endometriyal, yumurtalık ve akciğer kanserleri gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan en etkin ilaçlardan birisidir. Kanser tedavisinde antrasiklinlerin geniş kullanılmasına rağmen, AR enzimi antrasiklin antibiyotiklerini eş alkollere çevirerek etkilerini kaybettirmektedir (Matsunaga vd. 2012).

Bir antrasiklin antibiyotiği olan daunorubisinin alkole çevrilerek etkinliğinin azaltılması mekanizması Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Daunorubisinin aldoz redüktaz enzimi yoluyla indirgenmesi (Ahmed vd. 1981)

2.9 Sentetik Aldoz Redüktaz İnhibitörlerine Genel Bakış

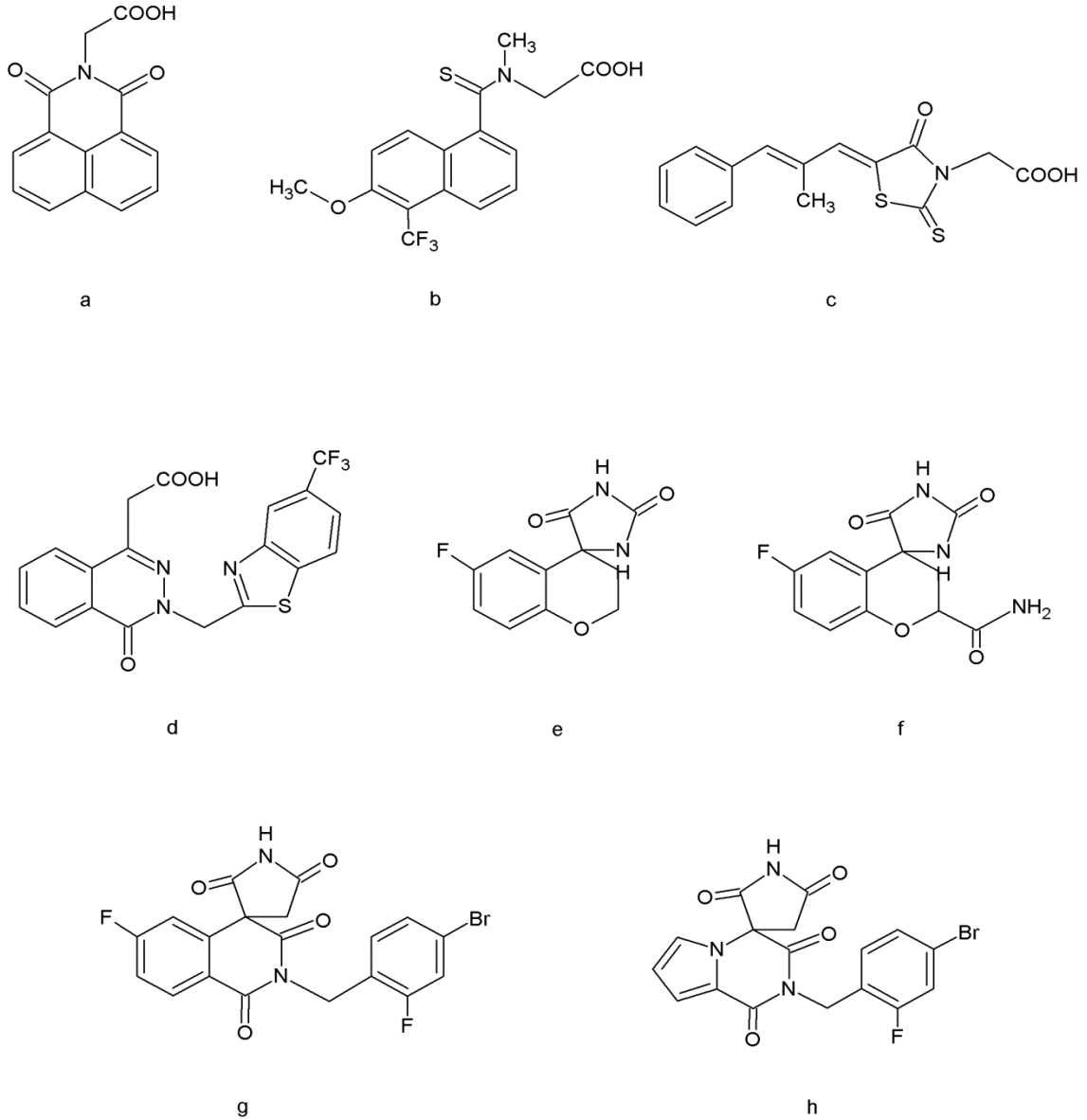
AR inhibitörlerinin çoğu asidik grup taşımaktadır. Bu asidik gruplar kofaktörün nikotinamid kısmı ve enzimin 48. Tirozin (Tyr.), 110. Histidin (His.) ve 111. Triptofan (Trp.) amino asit kalıntıları ile hidrojen bağı kurarak AR enzimini inhibe ederler. AR inhibitörlerinin diğer bir ortak özelliği ise, yapılarında enzim lipofilik bölgesi ile

bağlanan bir veya birden fazla aromatik grupların bulunmasıdır. Bir dizi araştırma sonrasında karboksilik asit yapısı içeren benzimidazol, fenil ve pirol türevli asetik asit bileşikleri ve tianosinolinon karboksilik asit türevleri AR inhibitörleri olarak tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Yapılmış birçok araştırmada aralarında arlestatin, tolrestat, epalrestat ve zopolrestat (Şekil 2.8 sırayla a, b, c ve d) bulunduğu belli başlı karboksilik asit bileşiklerinin AR enzimine karşı inhibitör etkileri çok çalışılmıştır, ancak bugüne dek bunlardan sadece epalrestatin ilaç olarak kullanımı Japonya’da onay almıştır (Alexiou vd. 2009).

Karboksilik asit AR inhibitörlerinin asit iyonlaşma sabiti (pKa) değerlerinin düşük olması nedeniyle yetersiz terapötik etki göstermektedirler. Bu nedenle de pKa değerleri daha yüksek olan hidantoin AR inhibitörlerinin tasarımına ilgi artmıştır. Ancak hidantoin AR inhibitörlerinden kaynaklanan toksisite ve diğer yan etkiler bu inhibitörleri de kullanılamaz hale getirmiştir. Bugüne dek sorbinil ve fidalrestat (Şekil 2.8 sırayla e ve f) üzerinde en fazla durulan ve araştırılan hidantoin sınıfı inhibitörleri olarak bilinmektedir (Pau vd. 2004, Alexiou vd. 2009).

Karboksilik asit türevleri AR inhibitörlerinin yetersiz terapötik etkileri ve Hidantoin türevleri AR inhibitörlerinin de istenmeyen yan etkilerinden dolayı, yapısal olarak farklı çok sayıda AR inhibitörleri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu amaçla sentezlenmiş olan ariltiyazolidin, N-nitrometilsülfonanilid, sülfonilpiridazinon, hidroksifenil, benzensülfamid ve piridoindol türevleri gibi birçok AR inhibitörlerinin yanı sıra minalrestat ve ranirestat (Şekil 2.8 sırayla g ve h) gibi spiroimid türevleri de tasarlanmıştır. Spiroimid (tetrahidropirol-pirazin) türevlerinin AR inhibitörü olarak etkinliği domuz lensi AR enzimi üzerinde test edilmesiyle gösterilmiştir. Bu grup bileşikler arasında (–) ve (+) enantiyomerleri de bulunan ranirestatın en etkili inhibitör olduğu, özellikle (–) enantiyomerin diğer enantiomere kıyasla *in vitro* şartlarda 10 kat ve *in vivo* şartlarda da 500 kat daha etkili olduğu testler sonucunda belirlenmiştir. Ancak bu bileşik ve türevlerinin de henüz klinik kullanıma uygunluğu belirlenmediğinden ilaç olarak onayı söz konusu olmamıştır. Öte yandan yüksek *in vitro* AR enzimi inhibisyonu gösterdiği bulunmuş olan birçok AR inhibitörü halen *in vivo* deneylerle takip edilmekte ve bu inhibitörlerin bir kısmının Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (USFDA) tarafından

ilaç olarak onaylanması beklenmektedir (Negoro vd. 1998, Pau vd. 2004, Alexiou vd. 2009).



Şekil 2.8 a, b, c, d, e, f, g, ve h sırayla arlestatin, tolrestat, epalrestat, zopolrestat, sorbinil, fidalrestat, minalrestat ve ranirestat (Alexiou vd. 2009)

2.10 Bitki Kaynaklı Aldoz Redüktaz İnhibitörlerine Genel Bakış

Günümüze dek 8000 polifenol bileşeni tanınmakta ve toplam 10 sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunların arasında 4000 bileşik flavonoidler sınıfında yer almaktadır. Flavonoidler ise; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler, antosiyanidinler,

proantosiyandinler, flavanlar ve auronlar olarak sınıflandırılmaktadırlar (Lopez-Lazaro 2002, Fernandez vd. 2005, Chahar vd. 2011).

Yüksek bitkilerde doğal olarak bulunan flavonoidler bitki fizyoloji ve biyokimyasında büyük önem taşımakta ve antioksidan, enzim inhibitörü ve toksik bileşiklerin öncüleri olarak davranmaktadırlar. Flavonoidler memeli enzim sistemindeki birçok enzimi inhibe ederek önemli metabolizma yollarını etkilemektedir. Bitkilerden saflaştırılan polifenoller ve özellikle flavonoidlerin bir kısmının AR enzimi inhibisyonunda etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca Flavonoidler ile AR enziminin inhibe edilmesini hedefleyen araştırmaların birisinde sıçan dokularında sorbitolün birikmesi takip edilerek AR enziminin inhibe edilmesi göz önüne çıkarılmıştır. Bu da diyabetik komplikasyonların önlenmesinde flavonoidlerin faydalı olabileceğini belirtmektedir (Lim vd. 2001, Lopez-Lazaro 2002, Fernandez vd. 2005, Patel ve Mishra 2012).

Sığır lens AR enzimi üzerine çalışılan diğer bir araştırmada Amaryllidaceae, Papilionaceae, Polygonaceae ve Anacardiaceae ailesi bitki özütlerinin % inhibisyon değerleri sırayla 1, 8, 14 ve 92 olarak bulunmuştur. Ayrıca Zingiberaceae, Melastomataceae ve Myrtaceae ailesi bitki özütlerinin % inhibisyon değerleri sırayla 14-75, 0-51 ve 40-88 aralıklarında olduğu bulunmuştur. Sapotaceae ve Umbelliferae ailesi bitki özütleri ise, AR enzim aktivitesini hiç etkilemediği belirtilmiştir (Guzman ve Guerrero 2005).

Aynı araştırmada Lamiaceae ailesine ait olan *Nepeta cataria* ve Ericaceae ailesine ait olan *Vaccinium myrtillus* bitki özütlerinin ekstraksiyonunda farklı çözümlerin kullanımı ile değişik % inhibisyon değerlerinin elde edildiği gösterilmiştir. *N. Cataria*'nın ekstraksiyonunda distile su, diklorometan ve etanolün kullanılması ile sırayla % 9, % 18 ve % 21 AR enzimi inhibisyonu görülmüştür. *V. myrtillus*'un ekstraksiyonunda ise, distile su ve etanolün kullanılması ile sırayla % 32 ve % 67 AR enzimi inhibisyonu görülmüştür. Bu da çözgenin içeriği ile ilişkili olarak, polifenol ve flavonoidlerin farklı oranlarda çözünmelerini sağlayarak bitki özütünün etkinliğini değiştirdiğini göstermektedir (Guzman ve Guerrero 2005, Ghasemzadeh vd. 2011).

Türkiye’de çalışılan bir araştırmada ise; Lamiaceae ailesine ait olan *Ocimum basilicum*, *Lavandula stoechas* ve *Melissa officinalis*, Fabaceae ailesine ait olan *Glycyrrhiza glabra* ve Tiliaceae ailesine ait olan *Tilia tomentosa* bitki özütlerinin sıçır lens AR enzimine olan inhibitör etkilerinin % 50 inhibisyon sağlayan konsantrasyon (IC50) değerleri sırayla 45.89, 39.28, 54.15, 25.53 ve 31.76 µg/mL olarak bulunmuştur (Onay 2008).

Diğer bir çalışmada Acanthaceae ailesine ait olan *Adhatoda vasica*, Caesalpiniaceae ailesine ait olan *Caesalpinia bonduc* ve *Cassia fistula* ve Oxalidaceae ailesine ait olan *Biophytum sensitivum* bitki özütlerinin sıçan lens AR enzimine olan inhibitör etkileri incelenmiştir. İsimleri geçen bitkilerin arasında en yüksek inhibitör etkinlik gösteren *C. fistula*’nın IC50 değeri 154 µg/mL olarak bulunmuştur (Gacche ve Dhole 2011).

Sıçan lens ve rekombinant insan AR enzimi üzerine çalışılan diğer bir araştırmada Gentianaceae ailesine ait olan *Gentiana lutea* bitki özütünün ekstraksiyonunda farklı çözümlerin kullanımı ile değişik IC50 değerlerinin elde edildiği belirlenmiştir. *G. lutea*’nın ekstraksiyonunda eter, metanol, etanol ve distile suyun kullanılması ile sıçan lens AR enzimi üzerine olan inhibitör etkilerinin IC50 değerleri sırayla 79, 112, 114 ve 260 µg/mL olarak bulunmuştur. Rekombinant insan AR enzimi üzerine olan inhibitör etkilerinin IC50 değerleri ise, sırayla 36, 23, 82 ve 70 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu da çözümlerin maddenin türüne bağlı olarak, polifenol ve flavonoidlerin farklı çözümler kullanımı ile farklı oranlarda çözünmelerini ve bitki özütünün de o oranda polifenol ve flavonoid madde içerdiğini göstermektedir (Ghasemzadeh vd. 2011, Akileshwari vd. 2012).

Bitki özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin incelenmesini amaçlayan diğer bir çalışmada Burseraceae, Lythraceae, Lamiaceae ve Myrtaceae ailesi bitki özütlerinin sıçan lens ve böbrekten saflaştırılan AR enzime ve rekombinant insan AR enzime olan ılımlı inhibitör etkilerinin IC50 değerleri 5-60 µg/mL olarak belirlenmiştir (Rao vd. 2012).

Diyabetik komplikasyonlar ve kanserlerin oluşumunda etkili olduğu bildirilen AR enziminin günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda henüz biyolojik anlamda uygun

bir inhibitörü bulunmamaktadır. Bu nedenle doğada bulunan ve polifenol ve özellikle flavonoid bileşikleri içeren diğer çalışmalarımızda farklı enzimleri inhibe ettiğini gördüğümüz *D. tenuifolia*, *R. lutea* ve *E. ritro* bitki özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan inhibitör etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmamızda kullandığımız cihazlardan en önemlileri Kırık Buz Makinesi (AF 80 Agion Silver), Otomatik Pipetler (BIOHİT), Derin Dondurucu -20 °C (BOSCH), Rotari Evaporatör (BÜCHI), Vorteks (Heidolph), Derin Dondurucu -80 °C ve Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj (Hettich), Hassas Terazı ve pH Metre (Mettler Toledo), Distile Su Cihazı ve Distile Deiyonize Su Cihazı (MILLIPORE), Homojenatör (Pro), Yüksek Devirli Masaüstü Soğutmalı Santrifüj (Sigma), dual spektral özellikte Mikroplaka Okuyucusu (SpectraMax M2), Spektrometre (T80 UV/VIS Spectrometer), Sıvı Azot Tankı (THERMO 5) ve Manyetik Karıştırıcı (WiseStir) ilgili firmalardan temin edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız önemli kimyasallar ve diğer sarf malzemelerinden İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) (GERBU), Mikroplaka (BRAND), Sodyum-Potasyum-Tartarat ($\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Tartarat}$, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba), Sodyum Karbonat (Na_2CO_3) (Fisher Scientific), Alminyum Klorür (AlCl_3) (Fluka), Mikroplaka (Greiner Biione), Bakır Sülfat Pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Etanol, Gallik Asit (GA), Kuersetin, Sodyum Hidroksit (NaOH) ve Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (CH_3)₂SO, Lityum Sülfat (Li_2SO_4) ve Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) (Riedel-de Haën), Sığır Serum Albümini (BSA), DL-Gliseraldehit (DL-GA), Etilin Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) ve Sodyum Asetat (CH_3COONa) (Sigma), Amonyum Sülfat [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve Metanol (Sigma-Aldrich) ve Fenil Metil Sülfonil Florid (PMSF) (Thermo Scientific) ilgili firmalardan çoğunluğu moleküler analiz kalitesinde temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması ve ekstraksiyon aşamasına hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleri (*D. tenuifolia*, *R. lutea* ve *E. ritro*) Temmuz-Ağustos ayları içerisinde Ankara'nın çeşitli bölgelerinden Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fatmagül GEVEN ve ekibi tarafından toplanmış ve sistematik tür teşhisleri yapılmıştır.

Bitki örnekleri toplandıktan sonra arazi şartlarından kaynaklanan kirlilikten yıkama yoluyla arındırılmış, havalandırılan temiz odada iki haftalık süre içerisinde kurutularak etiketlenmiş ve uygun saklama kutularına alınmıştır.

Belli bitki kısımlarının ekstraksiyon aşamasına hazırlanması için bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla iyice ezilmiş ve tamamen toz haline getirilmiştir.

3.2.2 Bitki ekstraksiyonu

Toz halinde olan bitki örneklerinin ekstraksiyonu için % 99'luk metanol çözgeni kullanılmıştır (Cowan 1999).

Bitki ekstraksiyon işlemi 2 gr toz bitki örneğine 20 mL çözgen (toz ağırlık/çözgen hacim oranı 1/10 olacak şekilde) eklenmesiyle başlatılmıştır. Hazırlanan karışımlar 30 dakika iyice karıştırıldıktan sonra 24 saat +4 °C'de bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunuda +4 °C'den alınan örnekler +4 °C'de 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüplerde oluşan çökelti atılarak sıvı fazdaki çözgen alınmış ve +40 °C'de uygun basınçta (337 mbar) rotari evaporatör yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen konsantre özüt çözünebildiği miktarda DMSO'da çözünmüştür. Çözünen bitki özütleri alikotlar halinde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.3 Bitki özütlerinin polifenol miktar tayini

Çalışmamızda polifenol miktar tayini için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır (Slinkard ve Singleton 1977).

Bu metotta fenolik madde standardı olarak GA kullanılmıştır. Stok GA çözeltisinden 50, 100, 200 ve 400 µg/mL'lik çözeltiler DMSO ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Organik boya olarak da 1/10 oranında distile deiyonize su ile seyreltilen FCR kullanılmıştır.

Kör tüpüne 0.1 mL DMSO, standart tüplerine sırayla 0.1 mL 50, 100, 200 ve 400 µg/mL GA çözeltisi ve örnek tüplerinin her birine de 0.1 mL DMSO ile seyreltilen bitki özütü eklenmiştir. Sonra tüplerin her birine 1 mL FCR karıştırılarak eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda tüplerin her birine 1 mL % 2'lik sodyum karbonat çözeltisi karıştırılarak eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda bütün tüpler köre karşı 750 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak polifenol miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Bitki özütlerinin toplam polifenol miktar tayinin çalışma şeması

Kör	Standartlar				Örnek
0.1 mL DMSO	0.1 mL 50 µg/mL GA	0.1 mL 100 µg/mL GA	0.1 mL 200 µg/mL GA	0.1 mL 400 µg/mL GA	0.1 mL Bitki Özütü
1 mL FCR	1 mL FCR	1 mL FCR	1 mL FCR	1 mL FCR	1 mL FCR
5 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek					
1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃	1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃	1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃	1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃	1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃	1 mL % 2'lik Na ₂ CO ₃
1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek ve köre karşı 750 nm'de spektrofotometrik olarak okutma					

3.2.4 Bitki özütlerinin flavonoid miktar tayini

Bitki özütlerinin toplam flavonoid miktarı alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir (Chang vd. 2002).

Bu metotta flavonoid madde standardı olarak kuersetin kullanılmıştır. Stok kuersetin çözeltisinden 25, 50 ve 100 µg/mL'lik çözeltiler % 80'lik etanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Renk oluşumu için % 10'luk alüminyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

Kör tüpüne 0.5 mL % 95'lik etanol, standart tüplerine sırayla 0.5 mL 25, 50 ve 100 µg/mL kuersetin çözeltisi ve örnek tüplerinin her birine de 0.5 mL DMSO ile seyreltilen bitki özütü eklenmiştir. Sonra tüplerin her birine 1.5 mL % 95'lik etanol, daha sonra 0.1 mL % 10'luk alüminyum klorür, daha sonra 0.1 mL sodyum asetat ve son olarak da 2.8 mL DMSO karıştırılarak eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda bütün tüpler köre karşı 415 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak flavonoid miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Bitki özütlerinin toplam flavonoid miktar tayinin çalışma şeması

Kör	Standartlar			Örnek
0.5 mL % 95'lik Etanol	0.5 mL 25 µg/mL Kuersetin	0.5 mL 50 µg/mL Kuersetin	0.5 mL 100 µg/mL Kuersetin	0.5 mL Bitki Özütü
1.5 mL % 95'lik Etanol	1.5 mL % 95'lik Etanol	1.5 mL % 95'lik Etanol	1.5 mL % 95'lik Etanol	1.5 mL % 95'lik Etanol
0.1 mL % 10'luk AlCl ₃	0.1 mL % 10'luk AlCl ₃	0.1 mL % 10'luk AlCl ₃	0.1 mL % 10'luk AlCl ₃	0.1 mL % 10'luk AlCl ₃
0.1 mL CH ₃ COONa	0.1 mL CH ₃ COONa	0.1 mL CH ₃ COONa	0.1 mL CH ₃ COONa	0.1 mL CH ₃ COONa
2.8 mL DMSO	2.8 mL DMSO	2.8 mL DMSO	2.8 mL DMSO	2.8 mL DMSO
30 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek ve köre karşı 415 nm'de spektrofotometrik olarak okutma				

3.2.5 Aldoaz redüktaz enziminin izolasyonu

Deneylerde kullanılan AR enzimi normal şartlarda yetiştirilen sığırların karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Kesilen sığırdan alınan karaciğer dokusu, bekletmeden sıvı azot içerisine konulup laboratuvara taşınmıştır ve -80°C 'de saklanmıştır.

İzolasyon işlemi daha önce optimize edilmiş (İşgör 1997, Onay 2008) metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu metodda özetle -80°C 'de saklanmış karaciğer dokusu makas yardımıyla küçük parçalara kesilip 1 mM EDTA ile yıkanmıştır. Daha sonra karaciğer dokusunun tartısı alınıp üç katı 1 mM EDTA 50 μM PMSF ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. % 40 doygunluk için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 22.6 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. % 40 doygunluktaki süpernatantı % 50 doygunluğa ulaştırmak için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 5.8 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. % 50 doygunluktaki süpernatantı % 75 doygunluğa ulaştırmak için elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 15.9 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10000 rpm'de 25 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellet 50 mM sodyum klorür ile çözünüp -80°C 'de saklanmıştır.

3.2.6 Protein miktar tayini

Çalışmamızda protein miktar tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Alkalın ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgenmektedir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr., Trp. ve Cys. amino asitleri FCR'nde bulunan fenol yapısını indirgeyerek mavi renk oluşumunu sağlamaktadırlar. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır ve 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Lowry vd. 1951).

Bu metotta protein madde standardı olarak BSA kullanılmıştır. Stok BSA çözeltisinden 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL’lik çözeltiler distile deiyonize su (DDS) ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Lowry reaktifi için % 1’lik bakır sülfat pentahidrat, % 2’lik $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -Tartarat ve % 2’lik sodyum karbonatlı 0.1 N sodyum hidroksit sırayla 1/1/100 oranında karıştırılmıştır. Organik boya olarak da 1/1 oranında DDS ile seyreltilen FCR kullanılmıştır.

Kör tüpüne 0.5 mL DDS, standart tüplerine sırayla 0.5 mL 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL BSA çözeltisi ve örnek tüpüne de DDS ile seyreltilen 0.5 mL sitozol eklenmiştir. Sonra tüplerin her birine 2.5 mL Lowry reaktifi karıştırılarak eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda tüplerin her birine 0.25 mL FCR karıştırılarak eklenmiş ve 45 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda bütün tüpler köre karşı 660 nm’de spektrofotometrik olarak okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak protein miktarı mg/mL olarak hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3 Protein miktar tayinin çalışma şeması

Kör	Standartlar				Örnek
0.5 mL DDS	0.5 mL 0.1 mg/mL BSA	0.5 mL 0.15 mg/mL BSA	0.5 mL 0.2 mg/mL BSA	0.5 mL 0.5 mg/mL BSA	0.5 mL Sitozol
2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi	2.5 mL Lowry Reaktifi
10 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek					
0.25 mL FCR	0.25 mL FCR	0.25 mL FCR	0.25 mL FCR	0.25 mL FCR	0.25 mL FCR
45 dakika oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletmek ve köre karşı 660 nm’de spektrofotometrik olarak okutma					

3.2.7 Aldoz redüktaz enzim aktivite tayini

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enzim aktivitesi daha önce yayınlanmış olan (Hayman ve Kinoshita 1965) spektrofotometrik metodun bazı değişikliklerle geliştirilmesi sonucu oluşturulan analiz metodu ile tayin edilmiştir (İşgör 1997). Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan DL-GA, AR enzimi tarafından gliserole indirgenmektedir. Aynı zamanda AR enziminin kofaktörü olan NADPH da nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NADP^+) okside edilmektedir. NADPH'nin oksidasyonu SpectraMax M2 mikroparka okuyucusu kullanılarak 340 nm'de takip edilmiştir.

Reaksiyon ortamı; sitozol (4.54 mg/mL, 0.496 mg/min/mL), lityum sülfat (320-400 mM), NADPH (9×10^{-5} M) ve potasyum fosfat tamponunun (50 mM, pH 6.2) eklenmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 5 dakika +37 °C'de inkübe edildikten sonra 340 nm'de kör olarak okunmuş, daha sonra üzerine DL-GA (6×10^{-4} M) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımındaki absorbans azalması 6 dakika süresince takip edilmiştir. Absorbans değişimlerinden ve NADPH'nin ekstinksiyon katsayısından yararlanarak AR enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi her bir dakikada oksitlenen NADPH miktarına göre ifade edilmiştir.

D. tenuifolia, *R. lutea* ve *E. ritro* bitki örneklerinden metanol ekstraksiyonu ile elde edilen konsantre özütlerin AR enzimine olan etkileri incelenmek üzere aynı metot kullanılmıştır. Bu özütlerin en yüksek dozu 23.81 µg/mL ve en düşük doz 0.186 µg/mL olmak üzere stok solüsyonları 1/2 oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Deney daha önce optimizasyonu yapılmış protokolün (Nadig vd. 2012) mikroparkaya adaptasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Analiz 4.54 mg/mL (0.496 mg/min/mL) sitozol, 320-400 mM lityum sülfat, 9×10^{-5} M NADPH ve 6×10^{-4} M DL-GA içeren 50 mM (pH 6.2) potasyum fosfat tamponuna son konsantrasyonları optimizasyonla belirlenmiş 3 µL DMSO veya bitki özütlerinin eklenmesiyle 0.250 mL hacimdeki reaksiyon, NADPH tüketiminin 340 nm'de dakikadaki absorbans değişiminin (OD/dk) gözlenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Kör okumaları AR enzim aktivite tayininde kullanılan standart karışımındaki potasyum fosfat tamponunun 3 µL'sinin yerine 3 µL DMSO'nın eklenmesiyle yapılmıştır.

Numune okumaları ise, 3 µL 1/2 oranında DMSO ile seri olarak seyreltilen bitki özütlerinin eklenmesiyle yapılmıştır.

Kör okumaları negatif kontrol olarak kabul edilmiştir. OD/dk verilerinden yararlanarak ve aşağıdaki formülü kullanarak % inhibisyon hesaplanmıştır (Guzman ve Guerrero 2005).

$$\text{Aldoz Redüktaz \% İnhibisyonu} = \frac{\text{OD}_{\text{kontrol}} - \text{OD}_{\text{deney}}}{\text{OD}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Elde edilen sonuçlar ise, Graphpad Prism 4.0 programı yardımıyla analiz edilmiş ve özütlerin IC50 değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda polifenol miktar tayini için Folin-Ciocalteu metodu kullanılmıştır (Slinkard ve Singleton 1977). Bu metotta fenolik madde standardı olarak GA kullanılmıştır. Stok GA çözeltisinden 50, 100, 200 ve 400 µg/mL'lik çözeltiler DMSO ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Organik boya olarak da 1/10 oranında DDS ile seyreltilen FCR kullanılmıştır. Standartların 750 nm'de spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak bitki özütlerinin polifenol miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1'de bitki özütlerinin polifenol miktarları gösterilmiştir. *E. ritro* bitki yaprağı özütünün yüksek miktarda polifenol madde içerdiği; 204.855 µg/mL olarak bulunmuştur. Diğer bitki veya kısımların polifenol madde içeriği ise; *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *R. lutea* bitki yaprağı, *E. ritro* bitki çiçeği ve *R. lutea* bitki çiçeği özütlerinin sırası şeklinde azaldığı bulunmuştur.

Bitki özütlerinin toplam flavonoid miktarı ise, alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlenmiştir (Chang vd. 2002). Bu metotta flavonoid madde standardı olarak kuersetin kullanılmıştır. Stok kuersetin çözeltisinden 25, 50 ve 100 µg/mL'lik çözeltiler % 80'lik etanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Renk oluşumu için % 10'luk alüminyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Standartların 415 nm'de spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak bitki özütlerinin flavonoid miktarı µg/mL olarak hesaplanmıştır.

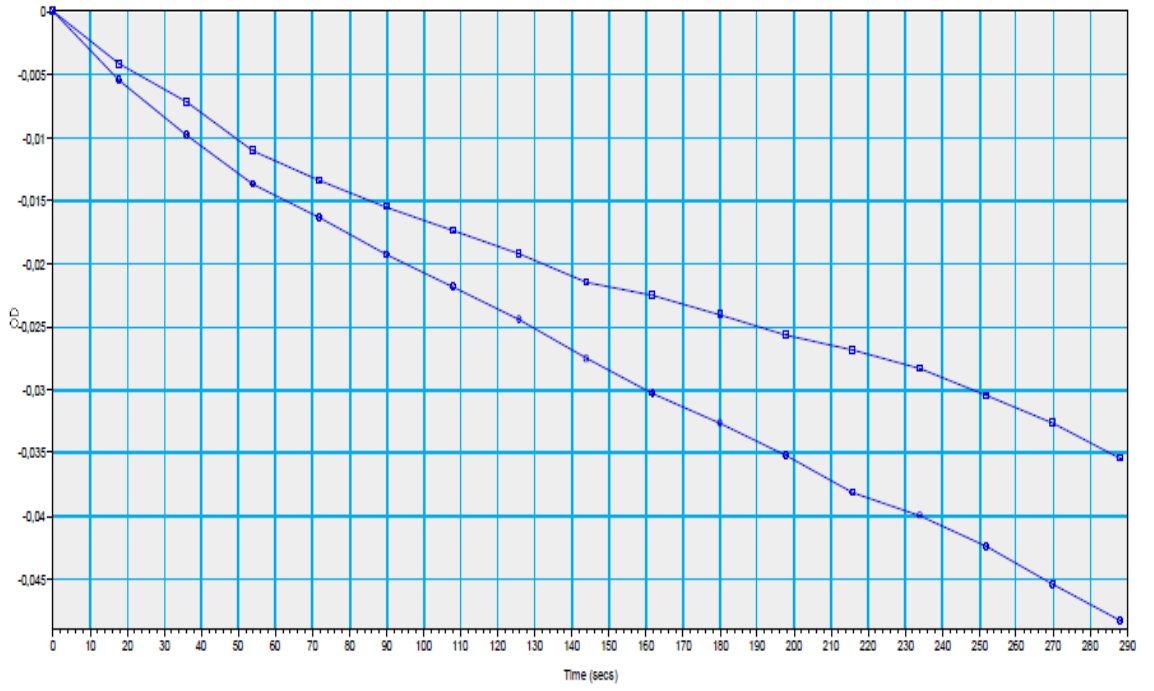
Çizelge 4.1'de bitki özütlerinin flavonoid miktarları gösterilmiştir. *D. tenuifolia* bitki yaprağı özütünün yüksek miktarda polifenol madde içerdiği 250.485 µg/mL olarak bulunmuştur. Diğer bitki veya kısımların flavonoid madde içeriği ise; *E. ritro* bitki yaprağı, *R. lutea* bitki yaprağı, *E. ritro* bitki çiçeği ve *R. lutea* bitki çiçeği özütlerinin sırası şeklinde azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Bitki özütlerinin toplam polifenol ve toplam flavonoid miktarları

Bitki	Kısım	Toplam Polifenol Miktarı (µg/mL)	Toplam Flavonoid Miktarı (µg/mL)
<i>D. tenuifolia</i>	Yaprak	144.495	250.485
<i>R. lutea</i>	Çiçek	109.012	78.724
	Yaprak	133.521	196.809
<i>E. ritro</i>	Çiçek	113.036	107.351
	Yaprak	204.855	233.106

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enziminin protein miktarını ölçmek için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry vd. 1951). Bu metoda göre stok BSA çözeltisinden hazırlanan 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.5 mg/mL olan standartların 660 nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışmanın ardından DDS ile seyreltilen 0.5 mL sitozol 2.5 mL Lowry reaktifi ve 0.25 mL FCR eklenerek 660 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak okunmuş ve standartların spektrofotometrik ölçümlerinden yararlanarak AR enziminin protein miktarı 56.7482 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

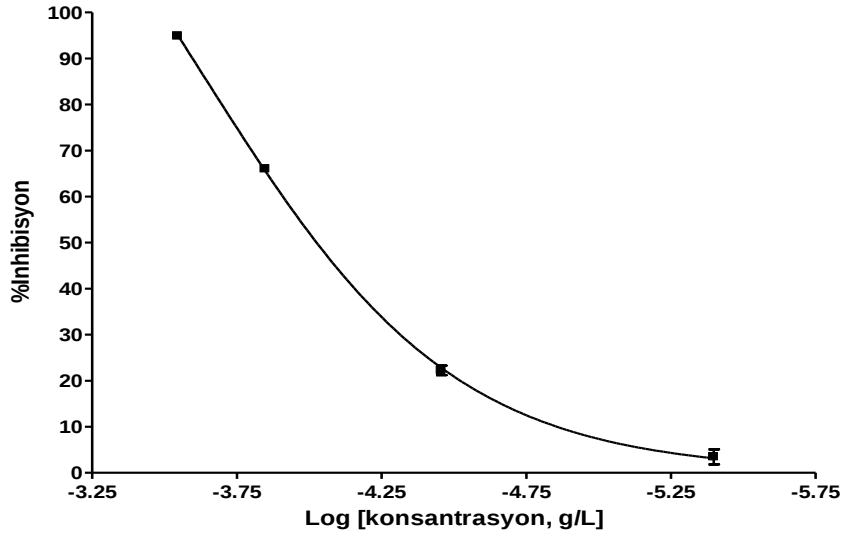
Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enzim aktivitesi 340 nm’de NADPH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür. Bitki özütleri olmadan, yani sadece AR enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4.54 mg/mL enzim için ölçülen 0.496 mg/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değere kıyaslanarak belirlenmiştir. AR enzim aktivite eğrisi şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 AR enzim aktivite eğrisi (Spektrometreden alınan aktivite eğrisi)

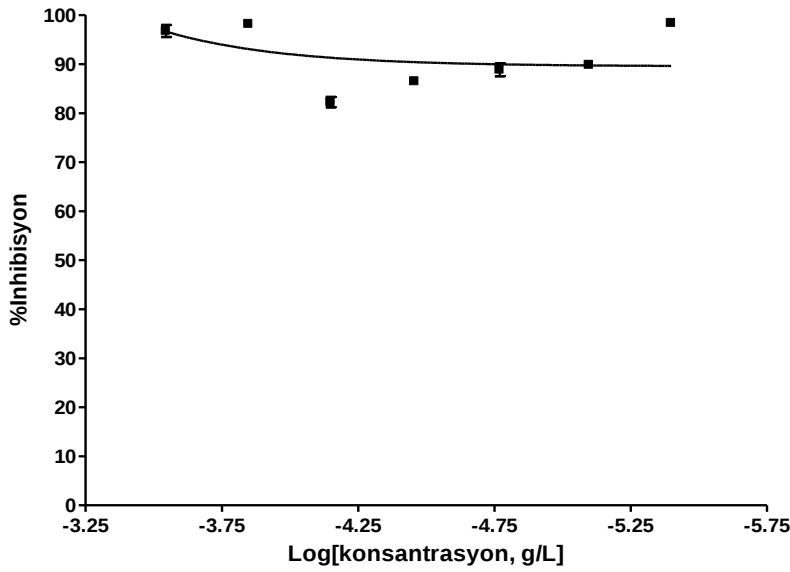
AR enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra; *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *R. lutea* bitki çiçeği ve yaprağı ve *E. ritro* bitki çiçeği ve yaprağı özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. % 100 enzim aktivitesine oranlanarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşı çizildiği doz-cevap grafikleri olarak şekil 4.2-4.6'da gösterilmiştir.

Şekil 4.2'de değişen doz aralıklarındaki inhibitör etkileri incelendiğinde en yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen AR enzimi inhibisyonu sırayla % 95 ve % 5'tir, dolayısıyla % 90 inhibisyon farkı vardır ve bu da *D. tenuifolia* bitki yaprağı özütünün inhibitör etkinliğini göstermektedir. IC50 değeri ise, 231.5 ng/mL olarak bulunmuştur.



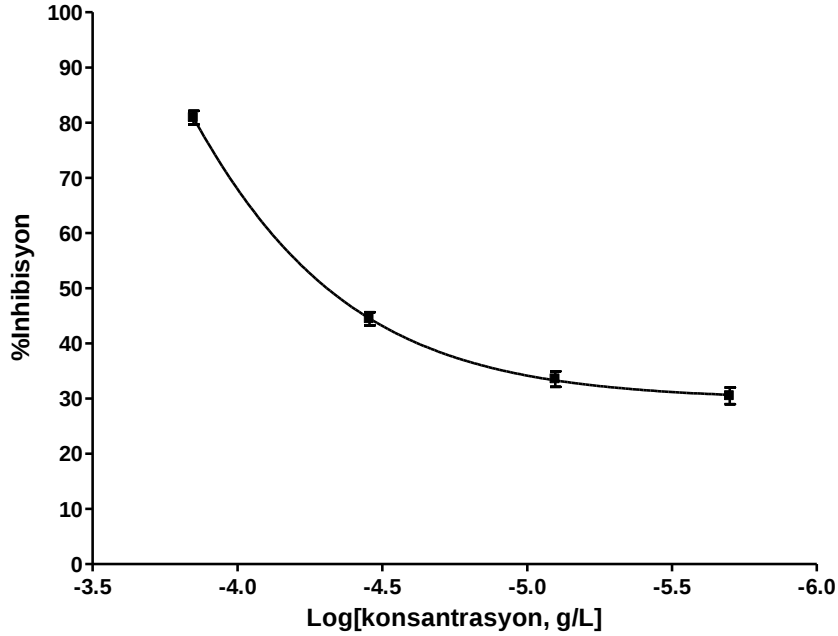
Şekil 4.2 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, IC₅₀ değeri 231.5 ng/mL olarak bulunmuştur

R. lutea bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.3) izlendiğinde ise, bütün dozlarda yüksek AR enzimi inhibisyonu yapıyor görünmektedir. Ancak inhibisyon % 80-% 100 arasında doza bağımsız olarak sabit kalmıştır, bu da deneyde kullanılan substrat, kofaktör veya enzim ile olumsuz reaksiyona girip inhibisyon yapmadığını belirtmektedir.



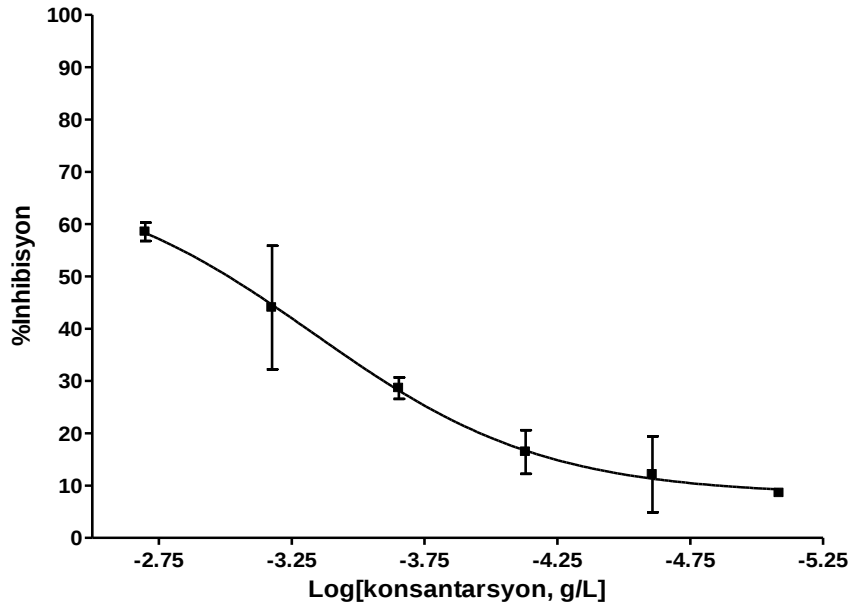
Şekil 4.3 *Reseda lutea* L. bitki çiçeği özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

R. lutea bitki yaprağı özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.4) gözlenerek ve en yüksek ve düşük dozlarda sırayla % 80 ve % 35 AR enzimi inhibisyonu yapması, bu da *R. lutea* bitki yaprağı özütünün % 45 AR enzimi inhibisyonu yapmasını belirtmektedir. IC50 değeri ise, 601.7 ng/mL olarak bulunmuştur.



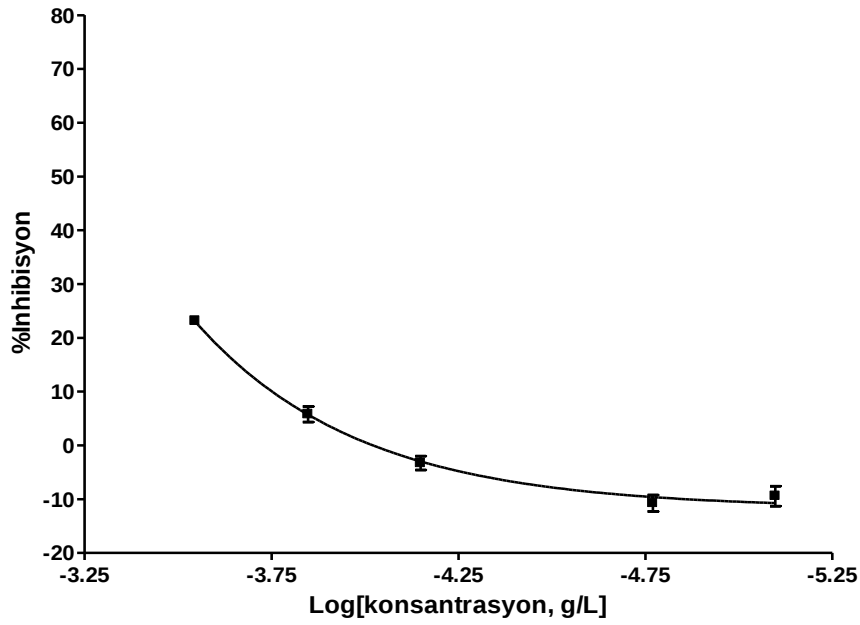
Şekil 4.4 *Reseda lutea* L. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, IC50 değeri 601.7 ng/mL olarak bulunmuştur

Yine doz-cevap eğrisi ve IC50 değerinin (Şekil 4.5) gözlenmesi *E. ritro* bitki çiçeği özütünün iyi AR inhibitörü olmasını göz önüne sermektedir. En yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen sırayla % 60 ve % 10 AR enzimi inhibisyonun görülmesi *E. ritro* bitki çiçeği özütünün % 50 inhibisyon yaptığını göstermektedir. IC50 değeri ise, 464.8 ng/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5 *Echinops ritro* L. bitki çiçeği özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, IC₅₀ değeri 464.8 ng/mL olarak bulunmuştur

Şekil 4.6'da *E. ritro* bitki yaprağından elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile en fazla % 23 inhibisyon yaptığı görülmektedir. IC₅₀ değeri ise, 29.13 µg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6 *Echinops ritro* L. bitki yaprağı özütünün aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, IC₅₀ değeri 29.13 µg/mL olarak bulunmuştur

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Polyol yolağının ilk aşamasında AR enziminin katalizlediği glukozun indirgenmesinden üretilen sorbitolün dokularda birikmesi ve nefropati, nöropati ve retinopati gibi uzun süreli diyabetik komplikasyonlara neden olmasından dolayı, ayrıca lipid aldehytlerin bu enzim yoluyla indirgenmesinden ortaya çıkan değişik kanserler nedeniyle AR enziminin inhibisyonuna ilgi oldukça artmıştır. Yüksek bitkilerde doğal olarak bulunan flavonoidler bitki fizyolojisi ve biyokimyasında büyük önem taşımakta ve antioksidan, enzim inhibitörü ve toksik bileşiklerin öncüleri olarak davranmaktadırlar. Flavonoidler memeli enzim sistemindeki birçok enzimi inhibe ederek önemli metabolizma yollarını etkilemektedir. Ayrıca bitkilerden saflaştırılan polifenoller ve özellikle flavonoidlerin bir kısmının AR enzimi inhibisyonunda etkili olduğu bulunmuştur (Lopez-Lazaro 2002, Fernandez vd. 2005, Goodarzi vd. 2005, Yadav vd. 2010, Patel ve Mishra 2012).

Günümüze dek diyabetik komplikasyonlar ve kanserlerin oluşumunu engellemek ya da geciktirmek amacı ile devam eden çalışmalara bir katkı olarak planladığımız tez çalışmasında polifenol ve özellikle flavonoid bileşikleri içeren (Çizelge 4.1) *D. tenuifolia*, *R. lutea* ve *E. ritro* bitki özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan etkileri *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Türkiye’de yapılan bir araştırmada Lamiaceae ailesine ait olan *O. basilicum*, *L. stoechas* ve *M. officinalis*, Fabaceae ailesine ait olan *G. glabra* ve Tiliaceae ailesine ait olan *T. tomentosa* bitki özütlerinin sıgır lens AR enzimine olan inhibitör etkilerinin IC50 değerleri sırayla 45.89, 39.28, 54.15, 25.53 ve 31.76 µg/mL olarak bulunmuştur (Onay 2008).

Diğer bir çalışmada Acanthaceae ailesine ait olan *A. vasica*, Caesalpiniaceae ailesine ait olan *C. bonduc* ve *C. fistula* ve Oxalidaceae ailesine ait olan *B. sensitivum* bitki özütlerinin sıçan lens AR enzimine olan inhibitör etkileri incelenmiştir. İsimleri geçen bitkilerin arasında en yüksek inhibitör etkinlik gösteren *C. fistula*’nın IC50 değeri 154 µg/mL olarak bulunmuştur (Gacche ve Dhole 2011).

Sıçan lens ve rekombinant insan AR enzimi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise, Gentianaceae ailesine ait olan *G. lutea* bitki özütünün ekstraksiyonunda farklı çözümler kullanılmış ve farklı IC50 değerleri elde edilmiştir. *G. lutea*'nın ekstraksiyonunda eter, metanol, etanol ve distile suyun kullanılması ile sıçan lens AR enzimi üzerine olan inhibitör etkilerinin IC50 değerleri sırayla 79, 112, 114 ve 260 µg/mL olarak bulunmuştur. Rekombinant insan AR enzimi üzerine olan inhibitör etkilerinin IC50 değerleri ise, sırayla 36, 23, 82 ve 70 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu da polifenol ve flavonoidlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak farklı çözümlerde ekstre edilen bitki özütlerinin farklı sonuçlar verdiğini göstermektedir (Ghasemzadeh vd. 2011, Akileshwari vd. 2012).

Bitki özütlerinin AR enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin incelenmesini amaçlayan bir çalışmada Burseraceae, Lythraceae, Lamiaceae ve Myrtaceae ailelerinin bitki özütleri, sıçan lens ve böbreğinden saflaştırılan AR enzime ve rekombinant insan AR enzime olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada ekstrelerin ılımlı inhibisyon gösterdikleri ve IC50 değerlerinin 5-60 µg/mL arasında değiştiği gösterilmiştir (Rao vd. 2012).

Bizim çalışmamızda ise, *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *R. lutea* bitki çiçeği ve yaprağı ve *E. ritro* bitki çiçeği ve yaprağı metanol özütlerinin AR enzime olan etkileri çalışılmıştır.

Doz-cevap eğrisi ve IC50 değerlerine bakıldığında en yüksek inhibisyonun *D. tenuifolia* bitki yaprağı özütünden elde edildiği görülmektedir. Değişen doz aralıklarındaki inhibitör etkileri incelendiğinde (Şekil 4.2) en yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen AR enzimi inhibisyonu sırayla % 95 ve % 5'tir, dolayısıyla AR enzimi % 90 oranında inhibe ettiği görülmektedir. IC50 değeri ise, 231.5 ng/mL olarak bulunmuştur, bu da *D. tenuifolia* bitki yaprağı özütünün inhibitör etkinliğini göstermektedir.

Yine doz-cevap eğrisi ve IC50 değerlerinin sonuçlarına göre, *E. ritro* bitki çiçeği özütünün AR enzimi üzerine inhibitör etkisinin diğerlerine kıyaslandığında ikinci sırada olduğu görülmektedir. En yüksek ve en düşük dozlarda gözlenen (Şekil 4.5) sırayla % 60 ve % 10 AR enzimi inhibisyonunun olması *E. ritro* bitki çiçeği özütünün % 50 AR

enzimi inhibisyonu yaptığına işaret etmektedir. IC50 değeri ise, 464.8 ng/mL olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda diğer bir yüksek AR enzimi inhibisyonu gösteren *R. lutea* bitki yaprağı özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.4) gözlenerek ve en yüksek ve düşük dozlarda sırayla % 80 ve % 35 AR enzimi inhibisyonu yapması, *R. lutea* bitki yaprağı özütünün % 45 AR enzimi inhibisyonu gerçekleştirdiğini göstermektedir. IC50 değeri ise, 601.7 ng/mL olarak bulunmuştur.

Diğer taraftan *E. ritro* bitki çiçeğinden elde edilen özütün yüksek inhibitör etkinlik göstermesine rağmen, bu bitkinin yaprak kısmından elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında bile en fazla % 23 AR enzimi inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6). IC50 değeri ise, 29.13 µg/mL olarak bulunmuştur.

R. lutea bitki çiçeği özütünün doz-cevap eğrisi (Şekil 4.3) izlendiğinde ise, bütün dozlarda yüksek AR enzimi inhibisyonu yaptığı görülmektedir. Ancak inhibisyon % 80- % 100 arasında doza bağımsız olarak sabit kalmıştır, bu da deneyde kullanılan substrat, kofaktör veya enzim ile olumsuz reaksiyona girip inhibisyon yapmadığını düşündürmektedir.

Özütler arasında AR enzimine karşı inhibisyon yüzdelerindeki görülen farklılıklar özütlerin içerdiği flavonoid türlerinin farklı olmasına dayanabilir. Flavonoidler arasında bir flavon türü olan kuersetinden 0.1 mM kullanıldığında AR enziminin % 100 inhibe edilmesi tarafından belirlenmiştir. Flavon, flavanon ve flavonol gibi farklı flavonoid türlerindeki AR enzimine karşı inhibitör etkinlik 7-hidroksi ve/veya katekol halkasının var olmasına bağlıdır (Varma ve Kinoshita 1976, Matsuda vd. 2002).

AR enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiş olduğumuz *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *R. lutea* bitki çiçeği ve yaprağı ve *E. ritro* bitki çiçeği ve yaprağı metanol özütlerinin içerisinde hangi flavonoidin bulunduğu bilinmemektedir, dolayısıyla öncelikle hangi özütün etkili olduğunu ispatlamak ve daha sonra özütün kimyasal içeriğinin belirlenmesi amaçlı analiz yapılabilir.

Bundan sonraki yapılacak çalışmalarda; 231.5 ng/mL, 464.8 ng/mL ve 601.7 ng/mL IC50 değerleri ile inhibitör etkinliği görülmüş olan sırayla *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *E. ritro* bitki çiçeği ve *R. lutea* bitki yaprağı özütlerinin kimyasal içeriğini belirlemek amaçlı fraksiyon çalışması ve fitokimyasal analizlerinin faydalı olduğu görülmektedir. *D. tenuifolia* bitki yaprağı, *E. ritro* bitki çiçeği ve *R. lutea* bitki yaprağı özütlerinin ng/mL düzeyinde AR enzimine karşı inhibitör etkinlik göstermesi, bu bitki kısımlarından elde edilen özütlerin AR enzimi inhibisyonunda çok etkili olduğunu göstermektedir. Buna göre de, düşük dozlarda yüksek etkisi olan inhibitörlerden kaynaklanan yan etkilerin de daha düşük olmasının mümkün olduğu görülmektedir.

D. tenuifolia bitki yaprağı, *E. ritro* bitki çiçeği ve *R. lutea* bitki yaprağı özütlerinin yüksek inhibitör etkinliği göstermesinden dolayı, gelecekte diyabetik komplikasyonlar ve kanserleri önlemek amaçla AR enzim aktivitesini inhibe etmekte *in vivo* olarak da incelenebilirler. Ayrıca ilaç geliştirme ve hastaya ulaşacak şekilde üretilmesi süreci 15 yıla yayılabildiğinden bitki özütlerinden ilaç etken maddesinin ayrıştırılması yerine bitki özütlerinden gıda takviyelerinin hazırlanması mümkün olabilir, dolayısıyla bu bitki özütlerinin özellikle diyabetik hastaların tedavisinde uzun vadede gıda takviyesi olarak kullanılması da mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2013, TÜBİTES, <http://turkherb.ibu.edu.tr/> Erişim Tarihi: 27.07.2013.
- Ahmed, N. K., Felsted, R. L. and Bachur, N. R. 1981. Daunorubicin reduction mediated by aldehyde and ketone reductases. *Xenobiotica*, 11 (2); 131-136.
- Akileshwari, C., Muthenna, P., Nastasijevic, B., Joksic, G., Petrash, J.M. and Reddy, G.B. 2012. Inhibition of aldose reductase by *Gentiana lutea* extracts. *Experimental Diabetes Research*, 2012; ID 147965.
- Aladağ, N.B. 2008. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda mikroalbuminüri ve serum ürik asit seviyeleri arasındaki ilişki. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 5. İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, J. and Demopoulos, V.J. 2009. Aldose reductase enzyme and its implications to major health problems of the 21th century. *Current Medicinal Chemistry*, 16 (6); 734-752.
- Balendiran, G.K., Martin, H., El-Hawari, Y. and Maser, E. 2009. Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 178; 134-137.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M. and Bhatnagar, A. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40 (4); 553-624.
- Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., Mellon, F.A. and Kroon, P.A. 2006. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis erucoides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (turkish rocket). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11); 4005-4015.
- Bohm, B.A. and Stuessy, T.F. 2001. *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)*. Springer-Verlag Wien, New York.
- Cao, D., Fan, S.T. and Chung, S.S. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 273; 11429-11435.
- Çelik, E. 2005. Diyabetik retinopatili hastalarda klinik anlamlı maküla ödemi üzerine etkili risk faktörleri. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1. Göz Kliniği, İstanbul.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P. and Joshi, Y.C. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, 5 (9); DOI 10.4103/0973-7847.79093.

- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3); 178-182.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4); 564-582.
- Crabbe, M.J.C. 1991. Aldose reductase inhibitors and cataract. *International Ophthalmology*, 15 (1); 25-36.
- David Hyndman, D., Bauman, D.R., Heredia, V.V. and Penning, T.M. 2003. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144; 621-631.
- Davis, P.H. 1979. *Flora of Turkey and the Aegean Islands*. Vol. 1, Edinburgh University Press, Edinburg.
- Doğan, Y. 2001. A study on the autecology of *Reseda lutea* L. (Resedaceae) distributed in Western Anatolia. *Turkish Journal Botany*, 25; 137-148.
- Fernandez, M., Caballero, J., Helguera, A.M., Castro, E.A. ve Gonzalez, M.P. 2005. Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13; 3269-3277.
- Fokialakis, N., Cantrell, C.L., Duke, S.O., Skaltsounis, A.L. and Wedge, D.E. 2006. Antifungal activity of thiophenes from *Echinops ritro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5); 1651-1655.
- Fukumoto, S., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H., and Aburatani, H. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 11; 1776-1785.
- Gacche, R.N. and Dhole, N.A. 2011. Aldose reductase inhibitory, anti-cataract and antioxidant potential of selected medicinal plants from the Marathwada region, India. *Natural Product Research*, 25(7); 760-763.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. and Rahmat, A. 2011. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (7); 1147-1154.
- Goodarzi, M.T., Zal, F., Malakooti, M., Safari, M.R. and Sadeghian, S. 2005. Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Medica Iranica*, 44 (1); 42-45.

- Guzman, A. and Guerrero, R.O. 2005. Inhibition of aldose reductase by herbs extracts and natural substances and their role in prevention of cataracts. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2005 (10); 3-4.
- Hayman, S. and Kinoshita, J.H. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 240 (2); 877-882.
- Heringlake, S., Hofdmann, M., Fiebeler, A., Manns, M.P., Schmiegel, W. and Tannapfel, A. 2010. Identification and expression analysis of the aldoketoreductase 1-B10 gene in primary malignant liver tumours. *Journal of Hepatology*, 52; 220-227.
- Hers, H.G. 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 22 (1); 202-203.
- Heyningen R.V. 1959. Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature*, 184; 194-195.
- İşgör, S.B. 1997. Characterization and inhibition study of bovine lens aldose reductase. Middle East Technical University, Ankara.
- Jin, J., Koroleva, O.A., Gibson, T., Swanston, J., Magan, J., Zhang, Y., Rowland, I.R. and Wagstaff, C. 2009. Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (12); 5227-5234.
- Karayağcın, F.C. 2007. Unilateral diyabetik ayak ülseri gelişiminde polinöropatinin etkisi. *Nöroloji Anabilimdalı, Tıp Fakültesi, Çukurova Üniversitesi, Türkiye*.
- Kinoshita, J.H., Kador, P., and Catiles, M. 1981. Aldose reductase in diabetic cataracts. *The Journal of the American Medical Association*, 246 (3); 257-261.
- Kızıllı, S. and Kayabaşı, N. 2005. Muhabbet çiçeğinin (*Reseda lutea* L.) boyama özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma. *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18 (2): 195-200.
- Kumar, P.A. and Reddy, G.B. 2007. Focus on molecules: Aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 85 (6); 739-740.
- Lim, S.S., Jung, S.H., Ji, J., Shin, K.H. and Keum, S.R. 2001. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53; 653-668.
- Lopez-Lazaro, M. 2002. Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2 (6); 691-714.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193; 265.

- Martinez-Sanchez, A., Llorach, R., Gil, M.I. and Ferreres, F. 2007. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (4); 1356-1363.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I. and Yoshikawa, M. 2002. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50 (6); 788-795.
- Matsunaga, T., Wada, Y., Endo, S., Soda, M., El-Kabbani, O. and Hara, A. 2012. Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. *Experimental Pharmacology and Drug Discovery*, 3 (5); DOI 10.3389/fphar.2012.00005.
- Negoro, T., Murata, M., Ueda, S., Fujitani, B., Ono, Y., Kuromiya, A., Komiya, M., Suzuki, K. and Matsumoto, J. 1998. Novel, highly potent aldose reductase inhibitors: (R)-(-)-2-(4-Bromo-2-fluorobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2- α]pyrazine-4-spiro-3'-pyrrolidine-1,2',3,5'-tetrone (AS-3201) and its congeners. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (21); 4118-4129.
- Nishinaka, T., Miura, T., Okumura, M., Nakao, F., Nakamura, H. and Terada, T. 2011. Regulation of aldose reductase AKR1B10 gene expression: Involvement of transcription factor Nrf2. *Chemico-Biological Interactions*, 191; 185-191.
- Oates, P.J. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Current Drug Targets*, 9 (1); 14-36.
- Onay, M. 2008. Investigation for natural extract inhibitors of bovine lens aldose reductase responsible for the formation of diabetes dependent cataract. Middle East Technical University, Ankara.
- Patel, M.B. and Mishra, S. 2012. Isoquinoline alkaloids from *Tinospora cordifolia* inhibit rat lens aldose reductase. *Phytotherapy Research*, 2012; DOI 10.1002/ptr.3721.
- Patra, J.C. and Chua, B.H. 2010. Artificial neural network-based drug design for diabetes mellitus using flavonoids. *Journal of Computational Chemistry*, 32 (4); 555-567.
- Pau, A., Asproni, B., Boatto, G., Grella G.E., De Caprariis P., Costantino L. and Pinna, G.A. 2004. Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel thienocinnolinone derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21; 545-552.
- Penning, T.M. 2004. Introduction and overview of the aldose reductase superfamily. *American Chemical Society*, 2004; 3-20.
- Penning, T.M. 2005. AKR1B10: A new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clinical Cancer Research*, 11; 1687-1690.

- Petrash, J.M., Harter, T.M., Devine, C.S., Olins, P.O., Bhatnagar, A., Liu, S. and Srivastava, S.K. 1992. Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (34); 24833-24840.
- Rao, A.R., Veeresham, C. and Asres, K. 2012. *In Vitro* and *In Vivo* inhibitory activities of four Indian medicinal plant extracts and their major components on rat aldose reductase and generation of advanced glycation endproducts. *Phytotherapy Research*, 2012; DOI 10.1002/ptr.4786.
- Rittner, H.L., Hafner, V., Klimiuk, P.A., Szweda, L.I., Goronzy, J.J. and Weyand, C.M. 1999. Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 103 (7); 1007-1013.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P.U., Suneetha, A., Rao, T.S., Srinivasulu, M. and Reddy, G.B. 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Clinical Research*, 12 (12); 525-529.
- Sayre, L.M., Zelasko, D.A., Harris, P.L.R., Perry, G., Salomon, R.G. and Smith, M.A. 1997. 4-hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68 (5); 2092-2097.
- Shinmura, K., Bolli, R., Liu, S., Tang, X., Kodani, E., Xuan, Y., Srivastava, S. and Bhatnagar, A. 2002. Aldose reductase is an obligatory mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circulation Research*, 91; 240-246.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28 (1); 49-55.
- Srivastava, S., Watowich, S.J., Petrash, J.M., Srivastava, S.K. and Bhatnagar, A. 1999. Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry*, 38 (1); 42-54.
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V. and Bhatnagar, A. 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26 (3); 380-392.
- Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K. and Ansari, N.H. 1995. Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217 (3); 741-746.
- Surabhi, P. 2007. Synthesis ve evaluation of phosphoramidate mustard prodrugs for site-specific activation. The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey.

- Tammali, R., Ramana, K.V. and Srivastava, S.K. 2007. Aldose reductase regulates TNF- α -induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 252 (2); 299-306.
- Tammali, R., Ramana, K.V., Singhal, S.S., Awasthi, S. and Srivastava, S.K. 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 66 (19); 9705-9713.
- Tuğrul, A. 2002. Diyabetik nefropati. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 19 (2); 113-121.
- Vander Jagt, D.L., Kolb, N.S., Vander Jagt, T.J., Chino, J., Martinez, F.J., Hunsaker, L.A. and Royer, R.E. 1995. Substrate specificity of human aldose reductase: Identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1249 (2); 117-126.
- Varma, S.D. and Kinoshita, J.H. 1976. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids—Their possible role in the prevention of diabetic cataracts. *Biochemical Pharmacology*, 25 (22); 2505-2513.
- Yadav, U.C.S., Srivastava, S.K. and Ramana, K.V. 2010. Understanding the role of aldose reductase in ocular inflammation. *Current Molecular Medicine*, 10 (6); 540-549.
- Zhang, J., Tian, Q. and Zhou, S. 2006. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Current Drug Therapy*, 1 (1); 55-84.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Khalid S. ABDALRAHMAN

Doğum Yeri : Irak (Ninavah)

Doğum Tarihi : 27.07.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Arapça

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Telafer Erkek Lisesi (2000-2005).

Lisans : Musul Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2005-2009).

Yüksek Dil Okulu : Gazi Üniversitesi, Türkçe Öğrenim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (TÖMER) (2009-2010).

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2010-2013).