



T. C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**CEVİZ İÇ KABUĞUNUN FARKLI POLARİTELERDEKİ ÇÖZÜCÜ  
EKSTRAKTLARININ, PLAZMA KOLESTROL DÜZEYİ İLE İLİŞKİLİ  
ENZİM YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

Neslihan ŞİRİN  
DOKTORA TEZİ

DOĞAL, BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğretim Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

DÜZCE, 2021

## **KABUL VE ONAY**

Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan  
**“CEVİZ İÇ KABUĞUNUN FARKLI POLARİTELERDEKİ ÇÖZÜCÜ  
EKSTRAKTLARININ, PLAZMA KOLESTROL DÜZEYİ İLE İLİŞKİLİ  
ENZİM YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK  
ARAŞTIRILMASI”**

adlı çalışma, aőađıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 12/07/2021



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

12/07/2021

Neslihan ŞİRİN



## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalıőmamı, ‘‘Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamı 2019.04.03.1032 numaralı proje’’ ile destekleyen Düzce Üniversitesine teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca engin bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve tanıdıklarına teşekkür ederim.

Hayat boyu sevgi ve merhametini üzerimden hiç eksik etmeyen anneme ve rahmetli babama ve aileme sonsuz teşekkür ederim.



# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KAPAĞI .....	i
TEZ ONAY SAYFASI .....	ii
BEYAN .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
KISALTMA LİSTESİ .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
RESİM LİSTESİ .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Ceviz Bitkisi, <i>Juglans regia</i> L. ....	5
2.1.1. Ceviz bitkisinin taksonomisi ve morfolojisi .....	5
2.1.2. Ceviz bitkisinin habitatı .....	5
2.1.3. Ceviz bitkisinin yapısındaki bileşikler .....	7
2.1.4. Ceviz bitkisinin kullanım alanları .....	8
2.1.5. Ceviz bitkisinin kolesterol ile ilişkisi .....	9
2.2. Kolesterol .....	11
2.2.1. Kolesterol biyosentezi .....	12
2.2.2. Kolesterolün önemi .....	13
2.2.3. Kolesterol taşınması ve lipoproteinler .....	13
2.2.4. Kolesterol metabolizması .....	15
2.2.5. Kolesterol tedavisinde kullanılan ilaçlar .....	17
2.3. İn Vitro Enzim Aktivitesi Analizi .....	19
2.3.1. HMG-KoA redüktaz .....	20
2.3.2. Kolesterol esteraz .....	20

<b>2.4. Kromatografik ve Spektroskopik Analiz .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1. GC-MS (gaz kromatografisi- kütle spektrometresi) .....</b>	<b>21</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Bitki Materyali .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1. Ekstraksiyon .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. GC-MS Analizi .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. İn vitro Enzim Aktivite Analizi .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1. HMG-KoA redüktaz enzim aktivite analizi .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2. Kolesterol esteraz enzim aktivite analizi .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. İstatistiksel Analiz .....</b>	<b>27</b>
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Ekstraksiyon Sonuçları .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. GC-MS Analizi Sonuçları .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. HMG-KoA Redüktaz Aktivite Analizi Sonuçları .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4. Kolesterol Esteraz Aktivite Analizi Sonuçları .....</b>	<b>45</b>
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>48</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>

## KISALTMA LİSTESİ

<b>ACAT</b>	Açıl CoA Kolesterol Açıl Transferaz
<b>CoA</b>	KoenzimA
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
<b>HDL</b>	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<b>HMG-KoA</b>	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
<b>IDL</b>	Orta Yoğunluklu Lipoprotein
<b>KE</b>	Kolesterol Esteraz
<b>LCAT</b>	Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
<b>LDL</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>LDL-C</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
<b>LDL-R</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör
<b>MTP</b>	Mikrozomal Triglicerid Transfer Protein
<b>NADH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<b>PCSK9</b>	Proprotein Konvertaz Subtilisin/ Keksin Tip 9 Enzim
<b>PPAR</b>	Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilmiş Reseptör
<b>PUFA</b>	Çoklu Doymamış Yas Asiti
<b>SRE</b>	Sterol Düzenleyici Eleman
<b>SREBP</b>	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Proteinler
<b>TC</b>	Total Kolesterol
<b>TG</b>	Trigliserit
<b>VLDL</b>	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 4.1.** Ceviz iç kabuğu ekstralarının HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin % İnhibisyon/ Konsatrasyon grafiği ..... 44
- Şekil 4.2.** Ceviz iç kabuğu ekstralarının kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisinin % İnhibisyon/ Konsatrasyon grafiği ..... 47



## RESİM LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Resim 2.1.</b> Ceviz ağacının geniş taç görünümü .....	6
<b>Resim 2.2.</b> Ceviz bitkisinin yaprak morfolojisi .....	7
<b>Resim 2.3.</b> Ceviz meyvesinin kuruyan parçaları ve kabuklu tohumu .....	7
<b>Resim 2.4.</b> Cevizin; tohum sert kabuğu (a), tohumu (b) ve tohum ara iç kabuğu (c) ....	8
<b>Resim 2.5.</b> Kolesterol molekülünün yapısı .....	12
<b>Resim 3.1.</b> Ceviz iç ara kabuklu tohumu (a) ve iç ara kabuğu (b) .....	23
<b>Resim 3.2.</b> Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (GC-MS) Cihazı .....	25

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 2.1.</b> Lipoproteinlerin niteliksel ve niceliksel özellikleri .....	14
<b>Tablo 2.2.</b> Serum TC, LDL-C, HDL-C ve TG seviyelerinin (mg/dl) derecelendirilmesi .....	17
<b>Tablo 3.1.</b> Kolesterol esteraz enzim analizi içeriği .....	27
<b>Tablo 4.1.</b> Ceviz iç kabuğu çözeltilerinin mililitresindeki madde ve miktarları .....	28
<b>Tablo 4.2.</b> Distile suda kaynatılan ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	31
<b>Tablo 4.3.</b> Distile suda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	32
<b>Tablo 4.4.</b> Etanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	34
<b>Tablo 4.5.</b> Metanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	36
<b>Tablo 4.6.</b> Asetonda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	38
<b>Tablo 4.7.</b> Hekzanda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	40
<b>Tablo 4.8.</b> Sikloheksanda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı .....	41
<b>Tablo 4.9.</b> Ekstrelerin HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelik inhibisyon sonuçları .....	42
<b>Tablo 4.10.</b> Ekstrelerin kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelik inhibisyon sonuçları .....	45



## ÖZET

### CEVİZ İÇ KABUĞUNUN FARKLI POLARİTELERDEKİ ÇÖZÜCÜ EKSTRAKTLARININ, PLAZMA KOLESTROL DÜZEYİ İLE İLİŞKİLİ ENZİM YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

Neslihan ŞİRİN

Doktora Tezi, Doğal ve Bitkisel Ürünler, Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı Dr. Öğretim Üyesi Nuri Cenk COŞKUN  
Temmuz 2021, 57 sayfa

Kolesterol, canlıların yapı taşı olan hücrelerdeki işlevselliği bakımından kritik öneme sahip bir moleküldür. Fazlalığı ve azlığı hücre membran yapısında bozunmalara ve hasara sebep olmaktadır. Bunları engellemek için diyetle alınan kolesterol miktarı dengeli tutulmakta, gerekirse tıbbi tedavilere başvurulmaktadır. Ek olarak, halk, doğal ve bitkisel ürünlere de başvurmaktadır. Ceviz iç kabuğunun kolesterol üzerinde etkili olduğu varsayımından yola çıkılarak dizayn edilen bu çalışmada, farklı polaritedeki çözücülerde hazırlanan ceviz iç kabuk ekstraktlarının gaz kromatografisi-kütle spektrometresinde (GC-MS) içerik analizi yapılmış ve 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz ve kolesterol esteraz üzerine etkisi in vitro olarak araştırılmıştır. 50 ml'lik distile su, metanol, etanol, aseton, hekzan ve siklohekzan çözücülerinde 5 gr ceviz iç kabuk numuneleri yirmidört saat ayrı ayrı bekletilerek ekstrakte edildi. Ayrıca distile suda bir saat kaynatma ile ayrı bir solüsyon hazırlandı. Numuneler helyum mobil fazında ve kademeli sıcaklık artışında GC-MS'te analiz edildi, entegre kütüphane veri tabanı ile tanımlama yapıldı. Her bir ekstraktın 10 mg/mL stok çözeltilerinden seyreltik konsantrasyonlar hazırlandı, HMG-KoA redüktaz ve kolesterol esteraz üzerine etkisi kolorimetrik olarak çoklu plaka okuyucuda tayin edildi. GC-MS taramasında distile su, etanol metanol ekstraktlarında çoklu doymamış yağ asiti, terpen ve fenolik bileşik türevleri, hekzan, siklohekzan ve aseton ekstraktlarında doymuş hidrokarbon (alkan) bileşikler görüldü. HMG-KoA redüktaz üzerinde %3,2'lik inhibisyon etki asetonlu ekstraktın 2 µg/mL konsantrasyonunda görülürken, kolesterol esteraz üzerindeki %13,6 inhibisyon etki distile suda bir gün bekletilen ekstraktın 67 µg/mL konsantrasyonunda görüldü. Bu tez çalışması ile ceviz iç kabuğu ekstraktlarının plazma kolesterol düzeyi ile ilişkili enzim yolaklarında görevli HMG-KoA redüktaz ve kolesterol esteraz üzerine etkisinin olmadığı in vitro olarak saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ceviz iç kabuk, GC-MS, HMG-KoA Redüktaz, Kolesterol Esteraz

## ABSTRACT

### IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT POLARITY SOLVENT EXTRACTS OF WALNUT INNER SHELLS ON THE ENZYME PATHWAY ASSOCIATED WITH PLASMA CHOLESTEROL LEVEL

Neslihan SIRIN

Doctoral Thesis, Natural and Herbal Products, Cosmetics Products Department

Thesis Advisor Assist. Prof. Dr. Nuri Cenk COSKUN

July 2021, 57 pages

Cholesterol is a critically important molecule for the functionality of cells, which are the building stones of organisms. Its excess and scarcity cause disruptions and damage to the cell membrane structure. In order to prevent these, the amount of cholesterol taken in the diet has kept balanced, and medical treatments are applied if necessary. In addition, the public also applies to natural and herbal products. In this study, which was designed based on the assumption that walnut inner shells have an effect on cholesterol, content analysis of walnut inner shell extracts prepared in solvents of different polarity was carried out in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and the effect of extracts on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and cholesterol esterase was investigated in vitro. 5 g walnut inner shell was extracted separately in 50 ml distilled water, methanol, ethanol, acetone, hexane and cyclohexane solvents for twenty-four hours. Furthermore, a separate solution was prepared by boiling in distilled water for one hour. Samples were analyzed in GC-MS in helium mobile phase and gradual temperature increase, identification was made with the integrated library database. Dilute concentrations of each extract were prepared from 10 mg/mL stock solutions, the effect on HMG-CoA reductase and cholesterol esterase was determined colorimetrically in a multi-plate reader. In the GC-MS scanning, polyunsaturated fatty acid, terpene and phenolic compound derivatives were seen in distilled water, ethanol, methanol extracts, and saturated hydrocarbon (alkane) compounds in hexane, cyclohexane and acetone extracts. While % 3.2 inhibition effect on HMG-CoA reductase was seen at 2 µg/mL concentration of acetone extract, % 13.6 inhibition effect on cholesterol esterase was seen at 67 µg/mL concentration of the extract kept in distilled water for one day. In this thesis, it was determined in vitro that walnut inner shells had no effect on HMG-CoA reductase and cholesterol esterase, which are enzyme pathways related to plasma cholesterol levels.

**Key words:** Cholesterol Esterase, GC-MS, HMG-CoA Reductase, Walnut inner shell

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Juglans regia* L. olarak isimlendirilen ceviz bitkisi, günümüzde besinsel ve ticari değeri yüksek olan bitkiler arasında yer almaktadır. Kapalı tohumlu bitkilerin iki çenekli sınıfına dahil olan ceviz bitkisi, Türkiye'nin iklim şartlarında doğal olarak yetişebilmektedir. Geçmiş yüzyıllarda yaşayan Anadolu insanının ceviz ile bağlantısı araştırıldığında, 3000 yıl öncesine kadar dayanan bir bağı olduğu keşfedilmiştir. Eski çağlarda, vücuttaki organlara benzetme yoluyla o organlardaki hastalıkları tedavi etmede kullanılan besinler içerisinde, beyne benzetilen ve beyinle ilgili hastalıklarda iyileştirici etkisi olduğuna inanılan ceviz ön sıralarda bulunmaktaydı. Gelişen bilimsel teknolojik altyapılar sayesinde cevizin farklı aksamalarının, bileşik kompozisyonu bakımından, sadece beyne değil tüm vücutta etkili olabilecek potansiyele sahip olduğu keşfedilmiştir. Cevizin yaprakları, yeşil meyvesi, tohumu, tohum yağı gibi aksamaları kan durdurmada, öksürük kesmede, ağrı durdurmada, yara iyileştirmede, mikrobiyal enfeksiyonda vb. rahatsızlıklarda kullanıldığı bildirilmektedir. Ceviz bitkisinin aksamalarının içerik analizleri sonucunda lipit metabolizması ile bağlantılı kardiyovasküler hastalıklarda terapötik etkinlik gösteren doymamış yağ asitlerinin, bitkisel sterollerin ve polifenollerin farklı miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Kolesterol kötü ün salmasına rağmen aslında vücuttaki yapı taşı olan moleküllerin başında gelmektedir. Hücre membranının yapısına katılması, safra tuzlarının, steroid hormonların ve D vitaminin öncülü olması kolesterolü önemli bir konuma taşımaktadır. Önemli fonksiyonları bulunmasına rağmen, kolesterol, vücut içerisinde dar sınırlarda tutulması gerekmektedir. Sınırlar aşıldığında kolesterol tedavisine başvurulmakta ve denge sağlanmaya çalışılmaktadır. Günümüzde en çok tercih edilen ilaçlar arasında, kolesterol metabolizmasındaki mevalonat yolunda görevli HMG-KoA (3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A) redüktaz enzimini hedef alarak aktivitesini durduran statin grubu ilaçlar yer almaktadır. Hiperkolesterolemide ve hiperlipidemi durumlarında kullanılan statinlerin yüksek dozlarda miyopati, bilişsel bozukluk, artan diyabet riski gibi yan etkilerinin bildirilmesi daha güvenli aynı zamanda da etkili yeni kolesterol metabolizmasını düzenleyici maddelerin araştırılmasına yönlendirmektedir<sup>1-7</sup>.

Ceviz iç kabuğunun kolesterol metabolizmasını düzenlediğine dair halk tıbbında söylenen bilgilerden yola çıkılarak farklı polaritedeki ceviz iç kabuğu ekstraktlarının gaz kromatografisi-kütle spektrometrisinde (GC-MS) içeriklerinin belirlenmesi ve

sonrasında kolesterol metabolizmasında kritik rolü olan enzimlerden HMG-KoA redüktaz ve kolesterol esteraz (KE) üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ceviz Bitkisi, *Juglans regia* L.

#### 2.1.1. Ceviz bitkisinin taksonomisi ve morfolojisi

Ceviz (*Juglans regia* L.) bitkisi Tracheophyta şubesinin Magnoliopsida sınıfına dahil Juglandaceae familyasındaki *Juglans* cinsinin türlerinden biridir <sup>8,9</sup>.

Kingdom: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fagales

Family: Juglandaceae

Genus: *Juglans* L.

Species: *Juglans regia* L.

Uzun ömürlü ve sert kabuklu meyvelerden olan ceviz, yüksek kalitede kerestesi için özel değere sahip yaprak dökken bitki türüdür <sup>1,3,10,11</sup>. Asıl yetiştirilme nedeni diyetteki besinsel değerinden ötürüdür, buna ek olarak geleneksel tıpta kullanımı da bulunmaktadır <sup>11</sup>. 12 m'den 20 m'ye kadar boylanabilen yayvan taç (Resim 2.1) görünümündeki ceviz ağacı nadiren 60 m'ye kadar ulaşabilmektedir. Gövde kabuğu kahverengi ya da gri renklindedir ve genç evrede pürüzsüz iken yaşlandıkça çatlakları oluşmaktadır. Yaprakları alternat, pinnat, stipülsüz, kenar tırtıklı, ovat-lanseolattır (Resim 2.2). Önceki sezonun uykuda olan tomurcuğundan çiçekler gelişmektedir. Meyvesi 3.5- 5 cm boyutlarında ve küreseldir (Resim 2.3). Tohumlar oval, yarılmayan oldukça çıkıntılı yapılıdır (Resim 2.4) <sup>12</sup>.

#### 2.1.2. Ceviz bitkisinin habitatu

Arkeolojik araştırmalarda, Anadolu insanının en az 3000 yıldır cevizi tanıdığı ve ürünlerinden yararlandığı görülmüştür <sup>1</sup>. *Juglans regia* türünün kökenine dair bilgi; doğal habitatının İran bölgesi olduğu, deniz tüccarlarının cevizin ticaretini yaparak Avrupa'ya götürdüğü, oradan İspanyol'lar aracılığı ile Amerika'ya taşındığı yönündedir

<sup>12,13</sup>. Yaşam alanını Türkiye- Çin- Hindistan- Kazakistan arasında kalan bölge oluşturmaktadır. Ticari olarak Amerika'da ve Avrupa'da da yetiştirilmektedir <sup>3</sup>. Meyve kalitesi açısından ön plana çıkan türler Anadolu cevizi, İran cevizi ve İngiliz cevizidir <sup>11</sup>. İklim koşullarını uygunluğu nedeniyle Türkiye'nin tüm tarım bölgelerinde ceviz yetiştirilmektedir <sup>11</sup>. Türkiye'nin ceviz üretiminde ön plandaki bölgeleri; Ege, Akdeniz, Batı Karadeniz ve Ortadoğu Anadolu bölgeleridir <sup>11</sup>.



**Resim 2.1.** Ceviz ağacının geniş taç görünümü

### 2.1.3. Ceviz bitkisinin yapısındaki bileşikler

Besinsel ve ticari değeri bulunan ceviz bitkisinin yapısında farklı fitokimyasal bileşikler bulunmaktadır. Bunlardan en öne çıkan allelopatik ve aromatik bir bileşik olan juglon fitokimyasalıdır ve bu türün bütün aksamalarında bulunduğu bildirilmektedir. Bu bileşik hidrojuglon maddesinin hava veya toprakla teması sonucu oksitlenmesi ile oluşmakta ve su aracılığı ile toprak altı bitki köklerine ulaşmaktadır. Böylece ceviz ağacı etrafındaki otsu veya odunsu bitkilerin zehirlenerek ölmesine sebebiyet vermektedir. Ceviz diğer kuruyemişlere göre daha yüksek oranda polifenol ve flavonoid içermektedir.

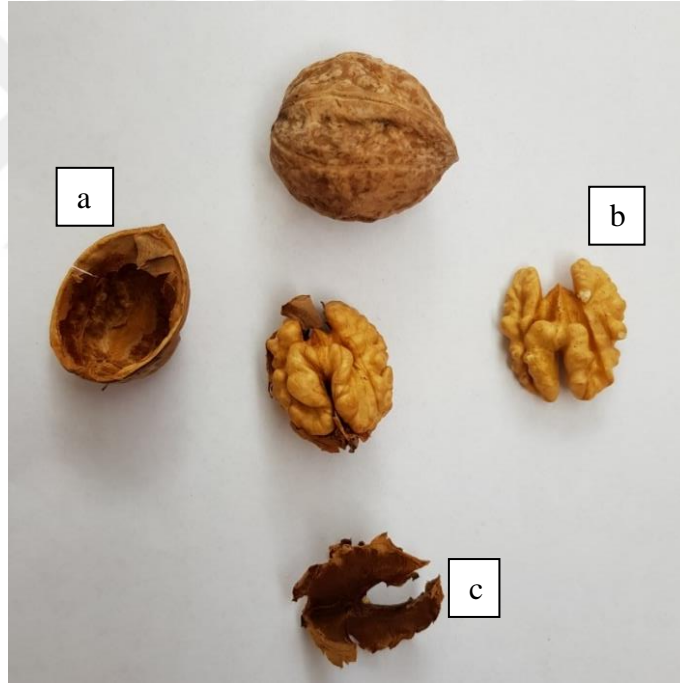


**Resim 2.2.** Ceviz bitkisinin yaprak morfolojisi



**Resim 2.3.** Ceviz meyvesinin kuruyan parçaları ve kabuklu tohumu

Yapraklarda juglon, askorbik asit, karoten, kuersetin, siyanadin, kamferol, kafeik asit, p-kumarik asit, hiperin, kuersitrin bileşikleri bulunmaktadır. Olgunlaşmamış meyve askorbid asitçe (C vitamini) en zengin aksamdır. Yeşil meyvenin içerisinde ursolik asit, oleanolik asit, juglon, rejiolon, kamferol, pinosebrin, kuersetin, sitostenon vb. bulunmaktadır. Tohumda; protein (%13.7-18.2), yağ (%63.6-67.2), karbonhidrat (%12.6-15.8), lif (%1.6-2.1), kül (%1.7-2.0), Ca, P, Fe, Na, K, beta karoten, tiamin, riboflavin, niasin, askorbid asit, Mg, Cu, S, Cl, I, Ar, Zn, Co, Mn bulunurken, tohum yağında; palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit bulunmaktadır. Kabukta protein, sabit yağ, karbonhidrat, lif ve kül miktarı sırasıyla (%1.7), (%0.7), (%31.9), (%56.6), (%1.4) oranlarda bulunmaktadır. Kabukta esansiyel yağlardan juglanosid A, juglanosid E, juglon, sikloheksanon, asetovanilon, p-hidroksiasetofenon, metilvanilat, fenilasetat, öjenol, izoöjenol bulunurken, steroidlerden; betasitositenon, betastesterol, kampesterol bulunmaktadır <sup>2,3,12,14-20</sup>.



**Resim 2.4.** Cevizin; tohum sert kabuğu (a), tohumu (b) ve tohum ara iç kabuğu (c)

#### **2.1.4. Ceviz bitkisinin kullanım alanları**

Geleneksel halk tıbbında ceviz bitkisinin; gözdeki arpacık, konjunktivit, kan çıbanı, genital siğil (kondilom), nasır, tümör, siğil, dolama, dizanteri, öksürük, egzema, romatizmal rahatsızlıklarda ağrı kesici, antihelmintik, astrenjan, bakterisit, kolagog (safra söktürücü), depüratif, hazmettirici, diüretik, laksatif, uyarıcı olarak kullanıldığı bildirilmektedir <sup>12</sup>.

Aksamlarının ayrı ayrı etkinlikleri incelendiğinde aynı ya da farklı biyolojik etkileri olduğu bildirilmektedir. Meyvenin farklı preslenme yöntemleri ile elde edilen yağları boya ve sabun yapımında ayrıca yemek tatlandırıcı yağ olarak kullanılmaktadır <sup>12</sup>. Ceviz yağı adet düzensizliklerinde, kepeklenmede, yara tedavilerinde, saç kuruluşunda ve kolit ağrılarında kullanılmaktadır <sup>11,21</sup>.

Yapraklarından dekoksasyonla çay elde edilmekte <sup>12</sup>, damar kuvvetlendirici, kan durdurucu, antidiyareik, antifungal, hipotansif, sedatif, hipoglisemik vb. alanlarda kullanılmaktadır. Ceviz astımda, sedasyonda, diüretik olarak, kronik öksürük, hiperlipidemi ve kardiyovasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Bu etkilerini de içerdikleri yağ asitleri, fenolik bileşikler, vitaminler, mineraller aracılığıyla gerçekleştirdiği öne sürülmektedir <sup>11,21-23</sup>.

Günümüzde, cevizin tıbbi alanda ve günlük diyetinde sıkça tercih edilme sebeplerinden birisi içerisindeki çoklu doymamış yağ asitleri (Çoklu doymamış yağ asiti, Polyunsaturated fatty acids-PUFA)' dir. PUFA' lardan olan ve kolesterolün düzenlenmesindeki yardımcı moleküller olan omega 3 ( $\alpha$ -linolenik asit) ve omega 6 (linoleik asit)' nin anti-aterojenik etkinliğe sahip olması, cevizin kan kolesterol ve trigliserit (TG) seviyelerini düşürmekte faydalı olabileceğini düşündürmektedir <sup>24</sup>.

Tercih edilmesinin diğer sebepleri arasında ise yapısındaki antioksidan etkideki fenolik bileşikler, fitosteroller ve diğer sekonder metabolitlerin varlığıdır. Bu bileşikler kolesterol metabolizması ve ateroskleroz ile bağlantılı olduğu, lipit oksidasyonunda etkili rol aldığı bildirilmektedir <sup>7,25,26</sup>.

### **2.1.5. Ceviz bitkisinin kolesterol ile ilişkisi**

Ceviz bitkisi ile kolesterol molekülünün ilişkisinin temeli kardiyovasküler hastalık mekanizmalarında kritik rol almalarına dayanmaktadır.

Kolesterol molekülü karaciğerde sentezlendikten sonra lipoproteinler aracılığı ile dolaşımında hareket ederek diğer dokulardaki hücrelere giriş çıkış yapmaktadır. Karaciğerden dokulara taşınımından sorumlu LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) molekülüdür. LDL'nin yapısına kolesterolün katılmasıyla oluşan LDL-C (düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol) kompleksinin serbest radikallerle oksidasyona uğratılması (yükseltgenmesi) sonucu, dolaşımdaki LDL-C molekülünün partikül boyutu küçülmektedir. LDL kompleksindeki yağ asitlerinin neredeyse yarısı doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır ve kompleks içerisindeki doymamış yağ asitlerinin hedef

alınmasıyla oksidasyon gerçekleşmektedir. LDL-C'nin hücelere girişinde rol alan LDL reseptörleri bu yeni molekölü tanıyamamakta ve dolaşımdaki oksitlenmiş LDL-C kompleksinin miktarı artmaktadır. Bu yabancı moleköl, makrofajlar ve düz kas hücelerdeki çöpçü reseptörler tarafından yakalanmakta ve bu hücelerce fagosite edilmektedir. Fagosite edilen okside kompleks bulunduğu intima hücelesinde tekrardan okside olmaktadır. Aterom (plak) oluşumunun ilk basamağı olan bu oksitlenmeler sitotoksik etki göstermekte ve monositlerin o bölgeye akın etmesine sebep olmaktadır. Yabancı molekölle savaş esnasında damar endotelinin o bölgesindeki hücelerin hareketi kısıtlanmakta kısır bir döngüye girmiş bu yapı farklı evrelerden geçerek nihayetinde aterosklerotik plaklara dönüşmektedir. Kardiyovasküler hastalıkları tetikleyen LDL-C oksidasyonu ile başlayan süreçte, ceviz bitkisi gibi yapısında fenolikler vb. antioksidan bileşikleri içeren doğal ürünler, başlangıç aşamasında kolesterol esterlerinin ve lipoprotein yapıdaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyerek ve bariyer oluşturarak süreci stabilize etmektedir<sup>7,27-29</sup>.

Serbest radikallerin oluşumu hücelerdeki düzenli fizyolojik süreçlerin bir parçasıdır. Karaciğerin detoksifikasyonu gibi kritik fonksiyonları kolaylaştırmak için uygun sayıda serbest radikal üretimi gerekmektedir. Bununla birlikte, çevresel veya fiziksel stres, gerekenden fazla serbest radikal oluşumuna yol açabilmektedir. Reaktif oksijen türleri aşırı üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemleri yetersiz olduğunda, hücelesel protein, DNA ve/veya RNA'da oksidatif hasara yol açan serbest radikallerin birikmesi meydana gelmektedir. Ayrıca serbest radikaller, transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini değiştirebilmekte ve tüm kanser türleri, artrit, inflamatuvar hastalıklar, kalp hastalıkları, iskemik hastalıklar ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunan faktör olarak sonuçlanabilmektedir<sup>20,30</sup>.

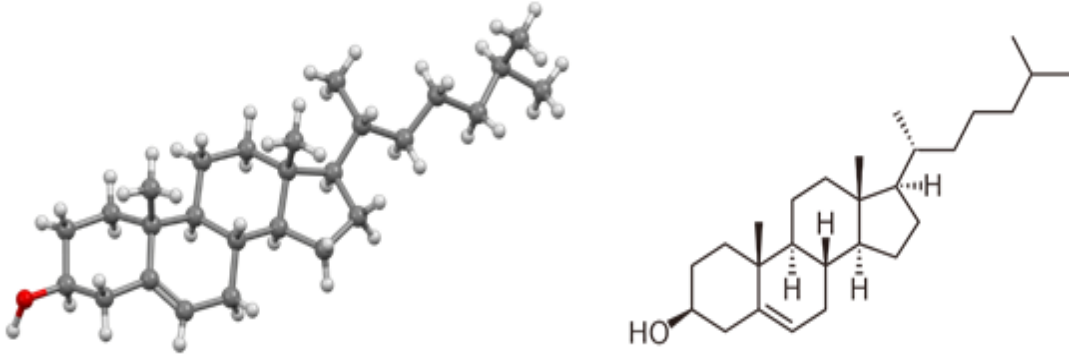
Dışarıdan alınan ya da vücutta bulunan antioksidan maddeler vücutta oluşmuş olan oksidasyonu ya geciktirmekte ya da engellemektedir. Antioksidan maddelerin başlıca etki mekanizmaları arasında; peroksidasyonu başlatan türlerin temizlenmesi, metal iyonlarının şelatlanması, zincir reaksiyonlarının kırılması, oksijen konsantrasyonlarının önlenmesi bulunmaktadır<sup>20,30</sup>. Ceviz bitkisi aksamaları içerisindeki polifenol, flavanoid, alkaloid, fitosterol, tokoferol, mineral, vitamin, protein ve lipid yapıdaki antioksidan maddelerin varlığı aynı metabolik yollar üzerinden etki ederek kolesterol oksidasyonu ve kardiyovasküler hastalık mekanizmaları üzerinde düzenleyici etkisi olduğu bildirilmektedir<sup>18</sup>.

Bununla birlikte hayvanlar alemi, ceviz bitkisi gibi yapısında bolca çoklu doymamış yağ asitlerini barındıran maddeleri fazlaca vücutlarına aldıklarında karaciğerdeki lipojenik (lipit olmayan öncüllerden yağ asiti sentezleme) enzimleri kodlayan genlerin ifadenmesi baskılanmaktadır. Bu gen düzenlemesine çekirdek reseptör proteinleri ailesi aracılık etmektedir. Ligandları yağ asitleri ve yağ asiti türevleri olan peroksizom proliferatörle aktive edilmiş reseptörler (PPAR) yağ ve karbonhidrat metabolizmasında yer alan genlerin ifadesini değiştirerek diyetdeki lipit değişikliklerine yanıt vermektedir. Üç PPAR izoformu (PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ ), karaciğer, kas ve yağ dokusunda gen ekspresyonu üzerindeki koordineli etkileriyle lipid ve glikoz homeostazını düzenlemektedir. PPAR $\alpha$  ve PPAR $\delta$  lipid kullanımını düzenlerken; PPAR $\gamma$ , lipit depolamasını ve çeşitli dokuların insülin duyarlılığını düzenlemektedir. Hepatositlerde PPAR $\alpha$ , açlık sırasında yağ asitlerinin alınması ve  $\beta$  oksidasyonu ve keton cisimlerinin oluşumu için gerekli genleri açmaktadır. PPAR $\delta$ , karaciğer ve kasta etki ederek,  $\beta$  oksidasyonu için proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu ve mitokondrinin ayrılması yoluyla enerji yayılımını uyarmaktadır. Birçok dokuda ifade edilen PPAR $\gamma$ , fibroblastların adipositlere farklılaşmasında rol alan genleri ve adipositlerde lipid sentezinde ve depolanmasında görev alan proteinleri kodlayan genleri açmak için gerekmektedir<sup>29</sup>.

Kolesterol metabolizması üzerinde enzimatik ya da genetik birimler üzerinde aktivasyon ya da inhibisyon yapabilecek etkide düzenleyici molekülleri barındırdığına dair bilimsel verilerin bulunması<sup>20</sup>, ceviz bitki aksamaları ile kolesterolün birbirleri ile ilişkide olmasına sebebiyet vermektedir.

## 2.2. Kolesterol

Kolesterol; dört halkalı steroid çekirdeği ve bir hidroksil grubu bulunan, vücudun yapı taşlarından biri olan yirmi yedi karbonlu steroldür (Resim 2.5). Sentezinin çoğu vücut tarafından (en çok karaciğerde) *de novo* gerçekleştirilse de diyetle az bir miktarda da kolesterol alımı olmaktadır<sup>4,29,31</sup>.



**Resim 2.5.** Kolesterol molekülünün yapısı <sup>32</sup>

### 2.2.1. Kolesterol biyosentezi

Kolesterol molekülünün yirmi yedi karbonunun hepsi iki karbonlu asetil koenzimA (CoA) bileşiminden sağlanarak, vücut içerisinde *de novo* olarak yapılabilmektedir. Öncelikle asetil CoA ve asetoasetil CoA birleşerek 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA oluşmaktadır (HMG-KoA). Karaciğer hücrelerindeki mitokondrilerde oluşan bu HMG-KoA, aşırı açlık durumlarında keton cisimciklerine dönüştürülürken, tokluk durumlarında ise sitozolde kolesterolün sentezi için kullanılmaktadır. HMG-KoA redüktaz enzimi aracılığıyla HMG-KoA mevalonata indirgenmektedir. Bu basamak kolesterol biyosentezindeki kilit bir kontrol nokta olup sentezin kısıtlanmasında belirleyici basamaktır. Mevalonat üç ardışık tepkimeye girmekte her tepkimede ATP kullanılmakta ve son tepkimesinde CO<sub>2</sub>'in salınmasıyla 3-izopentenil pirofosfata dönüştürülmektedir. 3-izopentenil pirofosfat izomeri olan dimetilalil pirofosfata dönüştürülmektedir. Bu iki bileşik tepkimeye girerek on karbonlu (C10) geranil pirofosfat oluşturulmaktadır. Geranil pirofosfat ile başka bir izopentil pirofosfat birleşerek on beş karbonlu (C15) farnesil pirofosfatı yapmaktadırlar. Daha sonra iki farnesil pirofosfat molekülü birleşerek otuz karbonlu (C30) skualen bileşimini oluşturmaktadırlar. Skualen O<sub>2</sub> ve NADH 'ın kullanıldığı tepkimeyle skualen epoksite dönüştürülmektedir. Halkasallaşan skualen epoksit lanosterole dönüşmektedir. Lanosterolden üç metil grubunun koparılması, bir çift bağın NADPH ile indirgenmesi ve diğer çift bağın başka konuma taşınması ile kolesterol oluşturulmaktadır. Skualen epoksite kadar tüm canlılar aynı sentez yolunu kullanmakta iken bu noktadan sonra hayvanlar dışındaki canlılar kolesterol yerine diğer steroller (stigmasterol, kampesterol, beta sitosterol, ergosterol) sentezlemektedir <sup>4,29,31,33,34</sup>.

### 2.2.2. Kolesterolün önemi

Kolesterolün en önemli rolü hücre membranının yapımında, sıcaklık artışıyla akışkanlığın bozulmasına bağlı viskozitenin stabilitesinde ve yağların sindirilmesini sağlayan safra sentezlenmesinde rol almasıdır<sup>29,31,35</sup>.

Safra tuzları (safra asitleri) kolesterolün karaciğerden önemli atılım formlarından birisidir. Safra asitleri polar yapıdadırlar. Safra çok az miktarda kolesterol (safra kolesterolü) içermektedir. Karaciğerde kolesterolün kolil CoA'ya dönüşmesi ve devamında kolil CoA'nın glisinle birleşerek glikolat veya taurinle birleşerek taurokolata dönüştürülmesi ile safra asitleri oluşturulmaktadır. Deterjan benzeri özelliği olan safra tuzları, ince barsakta salınmasıyla, besinlerle alınan yağların sindirim ve emiliminde yardımcı olmaktadır<sup>29,31</sup>.

Kolesterolü önemli kılan diğer sebeplerden biri D vitaminin öncülü olmasıdır. 7-dehidrokolesterolün (provitamin D<sub>3</sub>) morötesi (UV) dalga boylarına maruziyeti ile C9-C10 bağının fotolizle kırılarak çift bağların yeniden düzenlenmesi sonucu kolekalsiferol (previtamin D<sub>3</sub>) oluşmaktadır. Bu molekülün izomerizasyonu ile de D<sub>3</sub> vitamini oluşmaktadır. D vitamini eksikliği raşitizm ve osteomalasi rahatsızlıklarına sebebiyet vermektedir<sup>29,31</sup>.

Kolesterolün yirminci karbonundaki yan zincirden altı karbonlu birimlerin koparılması ile steroid hormonların öncülü olan pregnenolon oluşturulmaktadır. Yapısında *hem*-grubu bulunan sitokrom P450 enzimlerinin rol aldığı bir seri tepkimeyle pregnenolon değişik hormonlara (progesteron, testesteron, östrojen, kortizol, aldosteron) modifiye edilmektedir<sup>29,31</sup>.

### 2.2.3. Kolesterol taşınması ve lipoproteinler

Kolesterol sentezlendikten sonra az bir kısmı karaciğer hepatositlerine dahil olurken, büyük bir kısmı safra asitleri, safra kolesterolü, kolesterol esterleri formunda karaciğerden ihraç edilmektedir. Diyetle alınan kolesterol esterleri, bağırsaklardaki safra asitleriyle uyarılan kolesterol esteraz enzimi aracılığıyla hidrofobik yapıdaki kolesterol esterlerinin bağırsak mukoza hücrelerine girebilecek formları olan yağ asitleri ve serbest kolesterole dönüştürülmektedir. Enzimin aktivitesi ile ayrılan kolesterolün, sonrasında safra asitleri ile kompleks oluşturup dolaşıma dahil olmasıyla, vücuttaki miktarının düzenlenmesi sağlanmaktadır<sup>29,31</sup>.

Karaciğerde, 25-hidroksikolesterol gibi küçük miktarlarda oksisteroller de oluşturulmakta ve bunlar kolesterol sentezinin düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır. Diğer dokularda, kolesterol, steroid hormonlara ya da vitamin D hormonuna dönüştürülmektedir<sup>29,31</sup>.

Kolesterol, açıl-CoA kolesteril açıl transferaz (ACAT) enziminin etkisi ile karaciğerde kolesteril esterlerine dönüştürülmektedir. Bu form daha hidrofobik yapıdadır ve bu sayede membrandan geçişi engellenmektedir. Kolesteril esterleri, salgılanan lipoprotein partikülleri içinde kolesterol kullanan diğer dokulara taşınmaktadır veya karaciğerde lipit damlacıklarında depolanmaktadır<sup>29,31</sup>.

Lipoproteinler, amfipatik bir protein, fosfolipid ve kolesterol tabakası ile çevrelenmiş bir triaçilgliserol ve kolesterol esterlerinin hidrofobik bir çekirdeğinden oluşan küresel, misel benzeri parçacıklardır. Fonksiyonel ve fiziksel özelliklerine göre sınıflandırılan beş farklı tipte lipoprotein bulunmaktadır (Tablo 2.1) şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL'ler), orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL'ler), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL'ler) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL'ler)<sup>29,31</sup>.

**Tablo 2.1.** Lipoproteinlerin niteliksel ve niceliksel özellikleri<sup>31</sup>

Lipoprotein	Moleküler kütle (kDa)	Yoğunluk (g/ml)	% Protein	Ana lipitler	Apoproteinler
Şilomikron	> 400 000	< 0.95	1.5–2.5	TG	A, B-48, C, E
VLDL	10 000–80 000	<1.006	5–10	TG, PL, CE	B-100, C, E
IDL	5000–10 000	1.006–1.019	15–20	CE, TG, PL	B-100, C, E
LDL	2300	1.019–1.063	20–25	CE, PL	B-100
HDL	175–360	1.063–1.210	40–55	PL, CE	A, C, D, E

C, kolesterol; CE, kolesterol esteri; TG, trigliserit; PL, fosfolipid

İnce bağırsakta sentezlenen şilomikronlar en büyük olan ama en düşük yoğunlukla lipoproteinlerdir. Diyetteki triaçilgliserollerini hem iskelet kasına hem yağ dokusuna taşırken diyet kolesterolünü karaciğere taşımaktadır. Triaçilgliseroller, hedef dokulardaki hücrelerin yüzeyinde, lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilmekte ve

salınan yağ asitleri, enerji üretmek veya depolanma için metabolize edilmektedir. Bunun sonucu ortaya çıkan kolesterolce zengin şilomikron kalıntıları, kanda karaciğere taşınmakta ve reseptör aracılı endositoz tarafından hücelere alınmaktadır<sup>29,31</sup>.

Triaçilgliserolleri, kolesterolü ve fosfolipitleri diğer dokulara taşıyan VLDL'ler, karaciğerde sentezlenmektedir. Lipoprotein lipaz, VLDL'ye bağlı triaçilgliserolleri hidrolize edip yağ asitlerini hücelerin alımı için serbest bırakmaktadır. VLDL kalıntıları, apoproteinB-100 dışındaki tüm apoproteinleri çıkarıldığı ve kolesterolleri esterlendiği için önce IDL'lere ve sonra LDL'lere dönüştürülmektedir<sup>29,31</sup>.

LDL'lere dönüşümünde kolesterolün çoğu, lesitin-kolesterol-açıl-transferaz (LCAT) enzimi ile C-3 üzerindeki hidroksil grubu üzerine fosfatidilkolinden (lesitin) bir yağ asidi zincirinin eklenmesiyle esterlenmektedir. Ek olarak, apoB-100 dışındaki tüm apoproteinler çıkarılmaktadır. Kanda dolaşan LDL'ler, apoB-100 aracılığıyla hedef hücelerin yüzeyindeki LDL reseptör proteinine bağlanmakta ve reseptör aracılı endositoz ile veziküllerle hücelere tarafından alınmaktadır. Lizozomal lipaz kolesterol esterlerini kolesterole hidroliz etmektedir. Oluşan kolesterol hücre zarına katılmaktadır. Fazlası açıl-CoA kolesterol açıltransferaz (ACAT) ile depolanmak üzere yeniden esterlenmektedir<sup>29,31</sup>. Ayrıca LDL'nin yapısındaki yağ asitlerinin yarısı çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır ve bu asitlerin çift bağlarına saldıran serbest radikallerin oksidasyonu antioksidan maddeler aracılığı ile engellenmekte böylece zararlı etkileri olan okside-LDL oluşumu durdurulmaktadır<sup>27</sup>.

HDL'ler, diğer lipoproteinlerin degradasyonundan türetilen bileşenlerden sentezlenmektedir. Yapısında, lesitin ve kolesterolden kolesterol esterlerinin oluşumunu katalizleyen, LCAT enzimini ve apoproteinleri taşımaktadır. HDL kendi kolesterolünü, LCAT yardımıyla, lesitinden, şilomikrondan ve VLDL kalıntılarında kalan kolesterolleri kolesterol esterlerine çevirerek elde etmektedir. HDL'ler daha sonra ya doğrudan karaciğer tarafından alınmakta ya da kolesterol esterlerini VLDL'lere aktarmaktadır<sup>29,31</sup>.

#### **2.2.4. Kolesterol metabolizması**

Kolesterolün sentez oranı hücredeki seviyesine bağlı olarak belirlenmektedir. Yüksek hücre içi kolesterol seviyeleri, LDL reseptörünün sentezini ve kolesterol alım oranını azaltmaktadır ve HMG-KoA redüktazı inhibe ederek kolesterolün hücresel sentezini önlemektedir. HMG-KoA redüktaz aktivitesi hormonlarla da düzenlenmektedir.

Enzimin aktif olmasına sebep olan hormon insülin iken, inaktif formda kalmasına sebep glukagon hormonudur. İnsülin varlığında kolesterol miktarı artmakta, glukagon varlığında kolesterol miktarı azaltılmaktadır. Hepatositlerin yüzeyinde oluşan LDL reseptörlerinin (LDL-R) sayısı, plazma LDL kolesterol (LDL-C) seviyeleri için birincil belirleyicidir<sup>4,29,31,36,37</sup>.

Plazma LDL kolesterol seviyesi hiperkolesterolemi, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar ile pozitif anlamda bağlantısı bulunmaktadır. LDL-R'nin yokluğu ya da mutasyonu plazma LDL kolesterol seviyesinin artmasına ve hiperkolesterolemi ile aterosklerozise neden olduğu bildirilmektedir. LDL reseptörünün ekspresyonu transkripsiyonel ve postranskripsiyonel olarak düzenlenmektedir<sup>4,37,38</sup>.

İntraselüler; transkripsiyonel olarak DNA'daki LDL reseptör protein geninin promotörüne sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler (SREBP) bağlanmakta, bu sterol düzenleyici eleman (SRE) ile etkileşmekte ve LDL-R çoğaltılmaktadır. SREBP çekirdekte SRE ile etkileşerek DNA geninde promotör bölgeye bağlanıp LDL-R sentezlenmesine sağlayan transkripsiyonel faktör proteindir<sup>4,37,38</sup>.

Ekstraselüler; postranskripsiyonel olarak proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 enzimi (PCSK9) ile LDL-R'i, membrana geri katılıp kullanılması yerine geri dönüşümsüz olarak lizozomal bozunmaya uğratılmaktadır. PCSK9 plazma LDL-C'nin düzenlenmesine hizmet eden bir anahtar modülatör enzimdir-proteindir<sup>4,37,38</sup>.

LDL-C yapısındaki esterlenmiş kolesterol ve diğer çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyona uğraması, modifiye olduğu için, LDL-C'nin LDL reseptörlerince tanınamayıp ilgili dokulara girememesine ve dolaşımında birikmesine neden olmaktadır. Bu durum uyarı etkisi yapıp LDL-C'ün karaciğerde üretiminin devamlılığına ve fazlalığının oluşmasına, sonucunda da zararlı etkilerinin ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir<sup>27</sup>.

Önemli rolleri bulunmasına rağmen, hücrelerdeki kolesterol içeriğinin dar sınırlar içerisinde tutulması gerekmektedir (Tablo 2.2). Fazlalığı ve azlığı; hücre membranının stabilitesinde<sup>39</sup>, apoptoz ve nekroz mekanizmalarında bozulmalara neden olmaktadır. Genelde fazlalığı (hiperkolesterolemi) oluşarak membranda aşırı artış gösteren kolesterolün membran akışkanlığının azalmasına sebebiyet vermesine, porların kapanmasının engellenmesine, seçici geçirgenliğin bozulmasına, matriks metabolizmasının etkilenmesine dolayısıyla nekrotik hücre yığınları oluşmasına ve doku

hasarı oluşumuna yol açmaktadır <sup>35</sup>. Yüksek kolesterol; genetik sebeplerle ya da hipotiroidizm, böbrek yetmezliği, diabetes mellitus gibi kronik hastalıklar sebebiyle oluşabilmektedir <sup>39</sup>. Bozulan lipit profili, günümüzde giderek artan sorunlardan olan kalp damar hastalıklarının ana sebeplerinden birisini oluşturmaktadır <sup>40</sup>. Bu sorunların giderilmesinde öncelik olarak lipit düşürücü tedavilere başvurulmaktadır <sup>1,5,11,41,42</sup>.

**Tablo 2.2.** Serum TC, LDL-C, HDL-C ve TG seviyelerinin (mg/dl) derecelendirilmesi<sup>43</sup>

	Seviyeler	Dereceler
TC	200>	İstenilen
	200-239	Sınırdaki yüksek
	240≤	Yüksek
LDL-C	100>	Optimal
	100-129	Optimale yakın
	130-159	Sınırdaki yüksek
	160-189	Yüksek
	190≤	Çok yüksek
HDL-C	Erkek: 40> Kadın: 50>	Düşük
	Erkek: 60< Kadın: 60<	Yüksek
	150>	Normal
	150-199	Sınırdaki yüksek
TG	200-499	Yüksek
	500<	Çok yüksek

### 2.2.5. Kolesterol tedavisinde kullanılan ilaçlar

Günümüzde kolesterol seviyelerini düşürmek için; HMG-KoA redüktaz inhibitörleri, kolesterol emilim inhibitörü, safra asiti bağlayan reçineler, PCSK9 inhibitörleri, fibratik asit (fibrat) türevleri, nikotinik asit ve yeni keşfedilen ilaçlar olmak üzere yedi farklı ilaç sınıfı bulunmaktadır <sup>5,44</sup>.

HMG-KoA redüktaz inhibitörü olan statinler (Simvastatin, Atorvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Rosuvastatin ve Pitavastatin) lipid bozukluklarını tedavi etmek için ilk basamak ilaçlardır ve LDL-C seviyelerini %60'a kadar düşürebilmektedirler <sup>5</sup>.

Statinler hücre içindeki kolesterol sentez yolağında hız sınırlayıcı enzim olarak rol alan HMG-KoA redüktazın yarışmalı inhibitörleridir. Kolesterol sentezinin inhibisyonu hepatik LDL-R gen transkripsiyonunun aktivasyonuna neden olup hücre yüzeyinde LDL-R'nin artışına sebebiyet vermektedir. Bu sayede dolaşımdaki LDL partiküllerinin hepatik LDL-R aracılığı ile hepatositlere ulaştırılması ve LDL degradasyonu için endozomal sisteme iletilmesi sağlanmış olmaktadır <sup>36</sup>. Statinler ayrıca hipertrigliseridemili durumlarda trigliserid düzeylerini düşürmede de etkili ilaçlardır <sup>5</sup>. Yüksek dozlarda miyopati, bilişsel bozukluk, artan diyabet riski gibi yan etkileri bulunmaktadır <sup>6</sup>.

Bağırsak hücrelerindeki Niemann - Pick C1-benzeri 1 (NPC1L1) proteinini inhibe ederek kolesterol emilimini inhibe eden "Ezetimib" LDL-C düzeylerini yaklaşık %20 oranında düşürmektedir. Bunun sonucunda kolesterolün karaciğere girişi azalmakta, hepatik kolesterol içeriği azalmakta ve hepatik LDL-R sayısının artmasına yol açmaktadır. Ezetimib, statin tedavisi yeterli olmadığında veya statin intoleransı olmayan durumlarda ilave tedavi olarak faydalı olmaktadır <sup>5,45</sup>.

Safra asidi tutucuları (Kolestiramin, Kolestipol ve Kolesevelam) bağırsakta safra asitlerinin emilimini azaltarak LDL- C' yi %10-30 oranında düşürmektedir. Emilimin azalması safra asiti havuzunu azaltmaktadır. Bunun sonucunda kolesterolden safra asitlerinin sentezi uyarılmaya, hepatik kolesterol içeriği azalmaya ve hepatik LDL-R sayısı artmaya başlamaktadır. Birden fazla ilacın emilimini azalttığı, trigliserit seviyelerini artırabildiği ve kabızlığa ve diğer mide-bağırsak yan etkilerine neden olabileceği için safra asidi ayırıcıların kullanılması zor olabilmektedir <sup>5</sup>.

PCSK9 enzimini inhibe eden monoklonal antikolar (Alirocumab ve Evolocumab), PCSK9'a bağlanarak PCSK9'un LDL reseptörleri ile etkileşime girmesini engellemekte ve böylece PCSK9'un LDL reseptör bozunmasını indüklemesini önlemektedir. Azalmış LDL reseptörü degradasyonu, plazma membranındaki hepatik LDL reseptörlerinde artışa neden olmakta bu da plazma LDL-C seviyesinde azalmaya yol açmaktadır <sup>5</sup>.

Fibratlar (Gemfibrozil, Fenofibrat) PPAR- $\alpha$  agonistidir, lipit ve lipoprotein metabolizmasındaki genlerde modülasyon yaparak açlık ve tokluk trigliserit seviyesini düşürmektedir. Ayrıca HDL-C seviyesinde artışa sebep olmaktadır <sup>44</sup>.

Nikotinik asit (Niasin), karaciğere yağ asiti girişini engellemekte ve VLDL partikül salgılanmasını azaltmaktadır. HDL-C artarken, LDL-C, trigliserit ve lipoprotein (a)

seviyesi düşmektedir. Kullanımının kısıtlanmasına neden olan hiperglisemi, hiperürisemi, ateş basması vb. yan etkileri bulunmaktadır<sup>44</sup>.

Yeni ilaçlar “Bempeidoik asit, Lomitapid ve Mipomersen” den oluşmaktadır. “Bempeidoik asit”, hepatik ATP sitrat liyaz aktivitesini inhibe ederek LDL-C’ yi %15-25 oranında düşürmektedir. Böylece karaciğerdeki kolesterol sentezinde azalmaya, hepatik kolesterol içeriğinde azalmaya ve LDL reseptörlerinin sayısında artışa sebep olmaktadır. Maksimum tolere edilen statin tedavisi sonucu LDL-C hedefine ulaşılamayan durumlarda veya statinlerin tolere edilmediği durumlarda kullanılmaktadır. “Lomitapid”, homozigot ailevi hiperkolesterolemili durumlarda kullanılan selektif mikrozomal trigliserid transfer protein (MTP) inhibitörüdür. MTP apoB’ye trigliserit aktarımını kolaylaştırmakta, VLDL ve şilomikron oluşumunu sağlamaktadır. MTP inhibisyonu ile VLDL oluşumu azaltılmakta dolayısıyla LDL oluşumu azaltılmaktadır. Ciddi yan etkileri bulunması nedeniyle kullanımı sınırlandırılmıştır. “Mipomersen” karaciğerde apoB-100 proteininin mRNA’sını hedefleyen oligonükleotittir. Homozigot ailevi hiperkolesterolemi durumlarında kullanılan mipomersen, apoB mRNA’sı ile eşleşerek, traslasyonuna engel olmaktadır. Bu sayede, apoB sentezi ve buna bağlı olarak hepatik VLDL üretimi azalmaktadır. Güvenlik nedeniyle satışı 2018 yılında durdurulmuştur<sup>5</sup>.

### **2.3. İn Vitro Enzim Aktivitesi Analizi**

Orgaznimalardaki kimyasal tepkimelerin hepsine birden metabolizma denmektedir. Bir hücrenin metabolizması, içerisinde kesişen metabolik yolları bulunan binlerce kimyasal reaksiyona ait ayrıntılı bir yol haritasına benzetilebilmektedir. Bir metabolik yol, belirli bir molekülle başlamakta ve daha sonra belirli bir ürünle sonuçlanan bir dizi tanımlanmış adımda değiştirilmektedir. Metabolik yoldaki her adım özgül bir enzim tarafından katalizlenmektedir. Bu enzimleri düzenleyen ve reaksiyonu kontrol edip metabolik arz ve talebi dengeleyen mekanizmalar bulunmaktadır<sup>46</sup>. Enzim tahlillerinde analizin temeli; enzimin optimal olarak aktif olduğu sıcaklıklar, kofaktörler ve pH koşulları altında “substratın” “ürüne” dönüşümünün ölçülmesine dayanmaktadır. Ürünün ortaya çıkma hızı ya da substratın kaybolma hızı, genellikle bir spektrofotometre kullanılarak absorbanstaki değişim izlenerek ölçülmektedir. Işık görünür bölgede ise reaksiyonun renginde bir değişiklik oluşmaktadır, bunlara kolorimetrik ölçüm denmektedir.

Mesela mor ötesi yani ultraviyole ışınım olan dalga boylarından 340 nm'de, ışığı emen indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH) ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) koenzimleri, genellikle bir enzim reaksiyonunun ilerlemesini izlemek için kullanılmaktadır. Bu koenzimlerin kimyasal tepkimelerde elektron alış-verişi yaptığı bölge nikotinamid halkasını içeren bölgedir. Bu koenzimlerin indirgenmiş (NADH, NADHP) pozisyonlarında UV soğurulurken yükseltgenmiş (okside) (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) formlarında soğurulmamaktadır <sup>31</sup>.

### **2.3.1. HMG-KoA redüktaz**

HMG-KoA redüktaz, mevalonat yolundaki, hız kısıtlayıcı basamağı olarak tabir edilen, HMG-KoA'dan mevalonat oluşumunu katalizleyen bir transmembran proteindir. Kolesterol metabolizmasındaki bu önemli rolünden dolayı yeni kolesterol ilaçlarının araştırılmasında öncelikle HMG-KoA redüktaz inhibitör aktivitelerine yoğunlaşmaktadır <sup>47</sup>. HMG-KoA redüktazın inhibisyonu sonucu karaciğerde azalan kolesterol miktarı ile kolesterolün plazma konsantrasyonunu düşüren LDL reseptörlerinin ekspresyonu indüklenmektedir. 888 amino asitlik uzunluğa sahip enzim, nikotinamid adenin dinükleotit fosfata (NADPH) bağımlı olarak tepkimelere girmektedir. Mevalonat ve koenzim A oluşturmada, enzim, substrat olarak HMG-KoA'yı kullanmaktadır <sup>48</sup>.

Enzimin aktivite/inhibisyon analizinde, başlangıçta enzimle birlikte ortama eklenen NADPH koenzimi aracılığıyla HMG-KoA redüktazın tepkimeyi katalizlemeye başlaması sonucunda ortamda NADPH azalmaya başlamaktadır. Böylece spektrofotometrede, 340 nm dalga boyunda, indirgenmiş NADPH'tan alınan ışığın soğurulmasının azalması ile enzimin aktif şekilde çalıştığı test edilmektedir. <sup>31</sup>.

### **2.3.2. Kolesterol esteraz**

Safra asitleri tarafından aktive edilen kolesterol esteraz (KE) enzimi  $\alpha/\beta$  hidrolaz enzim ailesine ait bir glikoproteindir <sup>49</sup>. Kolesterol esteraz enzimi için; sterol esteraz <sup>50</sup>, triterpenol esteraz <sup>50</sup>, pankreatik lizofosfolipaz <sup>49</sup>, pankreatik kolesterol esteraz <sup>49</sup>, safra asitine bağımlı lipaz <sup>49,51,52</sup>, karboksil ester lipaz <sup>49,51</sup> isimleri de kullanılmaktadır. Yağlı bir beslenmeden sonra bağırsak lümenine salınmaktadır. Pankreas, ince bağırsak, karaciğer, beyin, plasenta dokusunda ve ayrıca sütte bulunduğu bildirilmektedir. Enzim, ince bağırsak lümenindeki kolesterol esterlerini kolesterol ve yağ asitlerine katalize etmektedir <sup>49,51</sup>. Bununla birlikte trigliseritlerin, fosfolipidlerin ve yağda çözünen

vitaminlerin esterleri de dahil olmak üzere geniş bir substrat spektrumunun hidrolizini katalize etmektedir<sup>52</sup>.

Kolesterol esterazın inhibisyonu ile diyet kolesterolünün dolaşıma geçmesinin önlenebileceği, bu sayede total kolesterol miktarının düşürülebileceği, bunun için kolesterol esteraz enziminin inhibisyonunu sağlayan maddelerin üzerinde yoğunlaşılması gerektiği bildirilmektedir<sup>53,54</sup>.

Enzimin aktivite/inhibisyon analizinde, enzimi aktive eden molekülle (safra asidi) enzimin substratı olan bir molekülün (yağ asidi esteri) test numunelerini de içeren enzimli ortama konulduğunda tepkime sonucundaki renk veren molekülün ışımasının uygun dalga boyundaki spektrofotometrik ölçümü yapılmaktadır<sup>31</sup>.

#### **2.4. Kromatografik ve Spektroskopik Analiz**

Kromatografik analizlerin temeli; mobil faz (sıvı ya da gazdan oluşur) ile birlikte hareket eden bir karışımın, durağan fazdan (katı ya da sıvıdan oluşur) geçişi sırasında, karışımdaki bileşenlerin çözünürlüklerinin (dağılma) ya da adsorpsiyon (tutulma) etkileşimlerinin farklı olması sonucu, farklı zamanlarda ayrılarak belirlenebilmesi prensibine dayanmaktadır<sup>55,56</sup>.

Spektroskopik analizler, karışımlardaki atomların, moleküllerin veya iyonların bir enerji seviyesinden başka bir enerji seviyelerine geçişleri esnasında absorplanan (soğurma) veya yayılan (emisyon) elektromanyetik ışımının (radyasyonun) ölçülerek yorumlanmasına dayanmaktadır<sup>55,56</sup>.

Bu iki sistemin birleştirilmesi ile daha kesin sonuçlar veren analizler geliştirilmektedir. Bunlardan günümüzde en yaygın kullanılanlardan bir tanesi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile yapılan analizlerdir<sup>55,56</sup>.

##### **2.4.1. GC-MS (gaz kromatografisi- kütle spektrometresi)**

GC-MS cihazı ile gaz fazında bulunan ya da gaz fazına geçirilen kimyasal maddelerin ilk önce gaz kromatografi kolonunda kaynama noktasına ya da uçuculuğuna göre bileşenlerine ayrılmakta daha sonra iyonlaştırılmakta ve kütle/yük oranlarına göre dedektörler aracılığı ile tayin edilmektedir. Cihazın gaz kromatografi kısmı ayırma, kütle spektrometri kısmı teşhis işleminde rol almaktadır.

Kütle spektrometresinde, belli koşullarda elde edilen ve parçalanma ürünlerini içeren kütle spektrumu aynı koşullarda elde edilmiş spektrumlarla karşılaştırılarak moleküllerin nitel analizi yapılmaktadır.

Ayrıca gözlenen piklerin yüksekliği örnekte bulunan maddenin derişimi ile doğru orantılı olduğundan bu yöntem, nicel analiz amacıyla da kullanılmaktadır. GC-MS sistemi ile uçucu ya da yarı uçucu maddeler, yağ numuneleri, hidrokarbon yakıtlar, ilaçlar, uyuşturucular, kozmetikler vb. maddelerin analizi kalitatif ve kantitatif özellikleri bakımından analiz edilmektedir<sup>55,56</sup>.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyali

Ceviz örnekleri yerel satıcıdan temin edildi. Analiz için iç ara kabuk kısmı ayrılıp (Resim 3.1), uygulamaya kadar steril kaplarda, karanlık ve serin şartlarda bekletildi.



**Resim 3.1.** Ceviz iç ara kabuklu tohumu (a) ve iç ara kabuğu (b)

#### 3.1.1. Ekstraksiyon

Toz haline getirilen 5'er gramlık kabuk örnekleri 50'şer milimlik çözücülerde (çözücüler; distile su, etanol, metanol, aseton, hekzan, ve sikloheksan) çözelti oluşturuldu ve 24 saat oda ısısında ağzı kapalı bekletilerek ekstraktlar elde edildi. Bunlara ek olarak 5 gram kabuk örneğinin 50 ml distile suda ikinci bir çözeltisi

hazırlandı ve bu çözelti 1 saat kaynatılarak ekstrakt elde edildi. Yirmidört saatlik ekstraksiyon işleminin ardından kaba filtre kağıtlarından süzülen numulardan 1'er mililitre ve 1 saat kaynatılıp süzülen sulu numuneden 1 ml alındı ve çözücülerin uçması beklenerek analitik hassas terazi (WSA-224T Analitik Terazi) yardımıyla madde miktarı hesaplandı. Süzülüp miktarları tayin edilen numuneler analizlere kadar -20°C 'de bekletildi.

### 3.2. GC-MS Analizi

Analiz için Düzce Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezindeki GC-MS kullanıldı (Resim 3.2). Cihaz; gaz kromatografisi "Agilent 7890A GC Sistem (Agilent 7890A GC System)" cihazı ile kütle dedektörü "Agilent 5975C Üçlü Eksen Dedektörlü İnert Kütle Seçici Dedektör (Agilent 5975C inert Mass Selective Dedector (MSD) with Triple Axis Detector (TAD))" cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Gaz kromatografisi kolonu Agilent HP5-MS olup 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm ölçülerindedir. GC-MS cihazında kullanılan kütüphane Wiley ((Wiley Kütle Spektral Veri Kaydı, 7. Baskı) (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7th Edition)) ve NIST ((National Institute of Standards and Technology 98 Library) (Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü 98 Kütüphanesi)) kütüphanelerinden oluşmaktadır.

Çalışma için hazırlanan çözeltilerden; etanol, metanol, aseton, hekzan, ve siklohekzan çözücülerinde hazırlanan örneklerin direk analizi yapılırken, distile sulu çözeltilerin önce suyu uzaklaştırıldı ve sonrasında GC-MS analizi için her iki numune metanolde çözdürülerek analiz yapıldı (distile sulu çözeltilerin son konsantrasyonu 5mg/ml olan numuneler ile çalışıldı). GC-MS cihazına uygulanan enjeksiyon hacmi 1.0 µL idi.

Enjektör sıcaklığı 200 °C'de sabitlendi ve helyum taşıyıcı gaz ile splitless mod (numunenin seyreltilmeden sisteme verilmesi) kullanıldı. Kütle spektrometrisi iyon kaynağı elektron iyonizasyonu (EI) idi ve kaynak sıcaklığı 230 °C'ye ayarlandı.

Gradyan yürütme uygulanan yöntemde fırın sıcaklığı ilk olarak 5 dakika 40 °C'de tutuldu. Sonra dakikada 5 °C (5 °C/dk) artışla 100 °C'ye ulaştı. 5 dakika 100 °C'de tutuldu. Daha sonra 20 °C (20 °C/dk) artışla 225 °C'ye ulaştı ve 8 dakika 225 °C'de tutuldu. Toplam çalışma süresi 33,25 dakika sürdü. Analiz edilen numuneler içerisinde yer alan bileşenlerin kütle spektrumları yazılım içerisine entegre kütüphane veri tabanlarıyla karşılaştırılarak tanımlama yapıldı.



**Resim 3.2.** Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (GC-MS) Cihazı

### **3.3. İn vitro Enzim Aktivite Analizi**

#### **3.3.1. HMG-KoA redüktaz enzim aktivite analizi**

HMG-KoA redüktaz in vitro analiz kiti (BioVision K588-100) HMG-KoA redüktaz enziminin aktivitesini saptamak, özellikle bu enzimin terapötiklerde çok önemli bir rol oynayabilecek farklı inhibitörlerini taramak için kullanılmaktadır. HMG-KoA redüktaz in vitro analizinde ekstraktların enziminin aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek için kit üreticisinin yönergesine göre analiz yapıldı. Analiz, 340 nm'de absorbansın spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Analiz kit içeriği; HMG-KoA redüktaz assay buffer, HMG-KoA redüktaz, HMG-KoA, NADPH, inhibitör (Atorvastatin) oluşturmaktadır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen analizde HMG-KoA, HMG-KoA redüktaz ve NADPH'm buz üstünde tutularak işlemleri yapıldı. Pozitif kontrol için HMG-KoA redüktaz enzimi, inhibitör kontrol için atorvastatin kullanıldı.

Analizde 10 mg'lık liyofilize toz ekstraktların su banyosu üzerinde distile su ile 1 mL stok solüsyonları hazırlandı. Bunların 1:5, 1:10, 1:50 oranında distile sulu dilüsyonları

hazırlandı ve her dislüsyondan kuyucuklar için 2 µl hacimleri kullanıldı. Öncelikle kit içerisindeki liyofilize HMG-KoA redüktaz 550 µL distile su ile, HMG-KoA 1300 µL distile su ile, NADPH 440 µL distile su ile çözdürüldü. 96 kuyucuklu plakada yapılan deney için reaksiyon karışımı (bir kuyu için; HMG-KoA 12 µL, NADPH 4 µL ve HMG-KoA redüktaz assay buffer 174 µL) hazırlandı. İnhibitör kontrol kuyucuğuna atorvastatin (10 mM) ve test kuyucuklarına ekstreler 2 µL, üzerlerine HMG-KoA redüktaz assay buffer 3 µL, HMG-KoA redüktaz 5 µL ve reaksiyon karışımı 190 µL aktarıldı. Enzim kuyucuğuna; HMG-KoA redüktaz 5 µL, HMG-KoA redüktaz assay buffer 5 µL ve reaksiyon karışımı 190 µL aktarıldı. Tüm aktarımlar yapıldıktan sonra 37 °C' de 10 dakika tutulduktan sonra çoklu plaka okuyucuda spektrofotometrik olarak 340 nm absorbansları okutuldu. Denklemle göre yüzdelik inhibisyon değerleri belirlendi.

$$\%İnhibisyon = [(A_{(Enzim)} - A_{(Enzim+Ekstre)}) / A_{(Enzim)}] \times 100$$

### 3.3.2. Kolesterol esteraz enzim aktivite analizi

Kolesterol esterazın in vitro analizi, bağırsaklardan kolesterol ve diğer lipidlerin emiliminde rolü olan bu enzimin aktivitesini saptamak ve aktivitesini durdurabilecek farklı inhibitörlerini taramak için kullanılmaktadır. Analiz, 408 nm' de absorbansın spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır.

Analizde 10 mg'lık liyofilize toz ekstraktların su banyosu üzerinde distile su ile 1 mL stok solüsyonları hazırlandı. Bunların 1:5 oranında distile su ile dilüsyonları yapıldı. Hazırlanan solüsyonların 50 µL, 30 µL, 20 µL ve 10 µL hacimlerinin inhibisyon analizi yapıldı.

Ekstraktların kullanılmayıp enzimin aktivitesinin ölçüldüğü reaksiyon "kontrol" olarak baz alındı.

Referans metoda <sup>52</sup> göre gerçekleştiren in vitro analizde, deney tamponu; 100 mM sodyum fosfat ve 100 mM NaCl (pH=7) idi. 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH=7) ile pankreatik kolesterol esteraz (Sigma 26745) stok solüsyonu (0.018 U/mL) hazırlandı, aynı tamponla seyreltildi ve 0 °C' de tutuldu. Aktivatör madde olan sodyum taurokolat (12 mM) (Sigma) deney tamponunda çözdürülüp 0°C' de tutuldu. Asetonitrilde 4 mM olarak hazırlanan substrat para-nitrofenil bütirat (Sigma) daha sonra deney tamponu ile 1:4 oranında seyreltildi.

96 kuyucuklu plakalarda yapılan analiz için kuyucuklara aktarılan madde ve miktarları tabloda gösterildi (Tablo 3.1). Substrat dışındaki diğer maddelerin koyulmasından sonra

10 dakika 30°C'de tutulan karışımlara süre sonunda substrat ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 408 nm'de absorbansları çoklu plaka okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçülerek, denkleme göre yüzdelik inhibisyon değerleri belirlendi.

$$\%İnhibisyon = [(A_{(Enzim)} - A_{(Enzim+Ekstre)}) / A_{(Enzim)}] \times 100$$

**Tablo 3.1.** Kolesterol esteraz enzim analizi içeriği

Grup	Deney tamponu	Distile su	Sodyum taurokolat	para-Nitrofenil bütirat	Kolesterol esteraz	Ekstrakt
Enzim (kontrol)	80 µL	100 µL	100 µL	20 µL	10 µL	0
100 µg'lık örnek	80 µL	50 µL	100 µL	20 µL	10 µL	50 µL
60 µg'lık örnek	80 µL	70 µL	100 µL	20 µL	10 µL	30 µL
40 µg'lık örnek	80 µL	80 µL	100 µL	20 µL	10 µL	20 µL
20 µg'lık örnek	80 µL	90 µL	100 µL	20 µL	10 µL	10 µL

### 3.4. İstatistiksel Analiz

IBM® SPSS® Statistics v.25 programı kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. Non-parametrik verili bağımsız değişkenlerin analizinde Bonferroni düzeltilmeli Kruskal Wallis Varyans analiz testi uygulandı.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ekstraksiyon Sonuçları

Yirmidört saatlik ekstraksiyon işleminin ardından süzülen numulardan 1'er mililitre ve 1 saat kaynatılıp süzülen sulu numuneden 1 ml alındı ve çözücülerin uçması beklenerek madde miktarı hesaplandı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Ceviz iç kabuğu çözeltilerinin mililitresindeki madde miktarları

Çözelti adı	Madde miktarı (mg/ml)
Distile su kaynatma	12,2
Distile su bekletme	7,1
Etanol	1,8
Metanol	3,7
Aseton	4,6
Hekzan	0,6
Sikloheksan	2,2

Yapılan ekstraksiyonların ardından elde edilen ekstrelerin son konsantrasyon verilerine göre distile suda kaynatılan ekstrenin mililitre başına düşen madde miktarı (12,2 mg/ml) diğer ekstreler göre daha fazla ölçülmüştür. Distile suda bekletilen ekstrenin madde miktarı (7,1 mg/ml) kaynatılarak elde edilenin yarısından biraz fazla olarak ölçülmüştür. Distile sulu ekstrelerden sonra ölçülen diğer yüksek miktar aseton (4,6 mg/ml)ekstresine aittir. Bunu metanol (3,7 mg/ml), sikloheksan (2,2 mg/ml), etanol (1,8 mg/ml) takip etmektedir. En düşük madde miktarı hekzan (0,6 mg/ml) ekstresinde ölçülmüştür

### 4.2. GC-MS Analizi Sonuçları

İç kabuk içerisindeki uçucu bileşenlerin tayini için gaz kromatografisinde uçurulup kütle dedektöründe molekül tayini yapılan çözeltilerin her birinde bulunan maddelerin GC-MS'te tutulma zamanı, maddelerin adı ve maddelerin yüzde (%) konsantrasyonu tablolar halinde gösterildi (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8).

Genel olarak apolar çözücüler içerisinde yoğunluklu olarak apolar bileşikler olan alkan molekülleri görülürken polar bileşiklerde fenolik bileşiklerle birlikte doymamış yağ asiti molekül kompozisyonu görülmüştür.

Distile suda hem bekletilerek hem de kaynatılarak hazırlanan ekstraktların çözücüsünün uzaklaştırılıp metanol ile tekrar çözdürülmeleri sonucunda suya geçen bileşiklerin metanole geçen kısımlarına ait uçucu bileşen verileri tablolarda görülmektedir (Tablo 4.2, Tablo 4.3). Suda kaynatılan ekstrede görülen bileşenler içerisinde çoklu doymamış yağ asit moleküllerinden; palmitelaidik asit, linoleik asit metil ester, elaido-linolenik asit metil ester, dokosaheksaenoik asit, eikosa-pentaenoik asit metil ester görülürken, suda bekletilen ekstrede; linolenik asit etil ester ve gama-linolenik asit metil ester görülmüştür. Fenolik gruplardan mekuinol, fenol, 4-vinilfenol her iki sulu çözeltide de görülürken, gayakol, vinilgayakol ve prodox146 bileşikleri bekletme ile hazırlanan, hidrokinon kaynatma ile hazırlanan ekstrede görülmüştür.

Distile sulu her iki ekstrede de betakaryofilen, gama terpinen ve patchoulane terpen bileşikleri görülürken, farklı olarak, kaynatılan ekstrede sitronellol, bekletilen ekstrede geranil linalool izomeri B ve izogeraniol terpen bileşikleri görülmüştür. Distile sulu ekstrelerde terpenler, fenolikler ve doymamış yağ asitleri dışında bazı alkan, aldehit ve ester molekülleri de görülmüştür.

Etanollü ekstrede terpenoid sınıflarından monoterpenlere ait bileşiler diğer terpen gruplarına ait bileşiklere göre daha fazla görülmüştür. Mirsen, 3-Karen, limonen, izogeraniol, gama terpinen, alfa terpinolen, linalol, izopulegol, neral, geranial, 1-p-mentene ve geranil asetat monoterpen sınıfına dahil iken, betakaryofilen ve patchoulane seskiterpen sınıfına dahildir. Etanollü ekstrede fenol gruplarına ve alkan gruplarına rastlanılmamıştır (Tablo 4.4).

Etanollü ekstrede linoleik asit, linoleik asit etil esteri, linoleik asit metil esteri, alfa-linolenik asit metil esteri, dokosaheksaenoik asit ve oktadekanedioik asit çoklu doymamış yağ asit bileşenleri görülürken, metanollü ekstrede gama-linolenik asit metil esteri ve de asetonlu ekstrede linoleik asit görülmüştür.

Metanollü ekstradaki terpenler gama-terpineol, limonen, izopulegol, skualan, patchoulane, farnesan ve sitronellol moleküllerinden oluşurken asetonlu ekstrada limonen, skualan, fitan ve farnesan moleküllerinden oluşmaktadır.

Distile suda kaynatılan ekstrede görülen prodox146 fenolik bileşiği asetonlu, metanollü ve hekzanlı ekstrede de görülmüştür, ethanox 701 fenolik bileşiği siklohekzanlı ekstrede görülmüştür.

Hekzanlı (Tablo 4.7), siklohekzanlı (Tablo 4.8), asetonlu (Tablo 4.6), metanollü (Tablo 4.5) ekstrelerde görülen alkan bileşikleri içerisinde tridekan, dodekan, undekan, oktadekan, dokosan, hegzadekan, tetrakosan, tetradekan, dekan, pentadekan, heneikosan, nonadekan, heptadekan, pristan, trikosan ve eikosan görülmüştür.

Hekzanlı ve siklohekzanlı ekstrelerde çoklu doymamış yağ asit bileşikleri görülmezken terpenlerden fitan her iki ekstrede de limonen ve farnesan hekzanlı ekstrede, skualan siklohekzanlı ekstrede görülmüştür.



**Tablo 4.2.** Distile suda kaynatılan ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	12.493	Fenol ;; (Monofenol)	21.789
2	14.869	Karyofilen ;; (Betakaryofilen)	0.688
3	15.009	Sitronellol ;; (Dihidrogeraniol)	0.707
4	15.834	Mekuinol ;; (4-Metoksifenol)	10.017
5	16.213	Palmitelaidik asit ;; (9-Heksadekenoik asit)	2.111
6	16.311	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	22.067
7	16.815	Linoleik asit metil ester ;; (9,12-Oktadekadienoik asit (Z, Z)-, metil ester)	0.379
8	17.235	Elaido-linolenik asit metil ester ;; (9,12,15- Oktadekatrienoik asit (E, E, E)-, metil ester)	0.511
9	17.712	Dokosaheksaenoik asit ;; (4,7,10,13,16,19- Dokosaheksaenoik asit (Z, Z, Z, Z, Z, Z)-)	0.481
10	17.884	Etinamat ;; (Valamin)	0.464
11	19.585	Dodekan ;; (Diheksil)	6.570
12	20.198	Patchoulane ;; (1H-3a, 7-Metanoazulen, oktahidro- 1,4,9,9-tetrametil-)	0.517
13	20.307	4-Vinilfenol	0.901
14	20.862	Eikosapentaenoik asit metil ester ;; (5,8,11,14,17- Eikosapentaenoik asit (Z, Z, Z, Z, Z)-, metil ester)	0.406
15	22.714	Undekan ;; (Hendekan)	3.023
16	23.633	Gama terpinen ;; (p-menta-1,4-dien)	15.483
17	24.214	Hidrokinon ;; (1,4-benzendiol)	13.885

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika. Sulu hazırlanan çözeltinin suyu buharlaştırıldıktan sonra 5mg/ml olarak metanolde tekrar çözdürüldü)

**Tablo 4.3.** Distile suda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	6.572	Geranil linalool izomeri B	0.367
2	8.082	Araşidonik asit trimetilsilil ester ;; (5,8,11,14-Eikosatetraenoik asit (Z, Z, Z, Z)-, trimetilsilil ester)	0.342
3	12.456	Fenol ;; (Monofenol)	45.599
4	13.966	Linolenik asit etil ester ;; (9,12,15-Oktadekatrienoik asit (Z, Z, Z)-, etil ester)	0.324
5	15.092	Mekuinol ;; (4-Metoksifenol)	0.337
6	15.808	Gayakol ;; (2-Metoksifenol)	10.734
7	16.285	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	7.404
8	18.314	Karyofilen ;; (Betakaryofilen)	0.361
9	19.590	Dodekan ;; (Diheksil)	6.101
10	19.969	Patchoulane ;; (1H-3a, 7-Metanoazulen, oktahidro-1,4,9,9-tetrametil-)	0.356
11	20.192	4-Vinilfenol	6.631
12	20.976	Dokosan	1.281
13	21.246	Gama-linolenik asit metil ester ;; (6,9,12-Oktadekatrienoik asit (E, E, E)-, metil ester)	0.442
14	21.770	Vinil-gayakol ;; (2-Metoksi-4-vinilfenol)	0.977
15	22.242	Etinamat ;; (Valamin)	0.633
16	22.309	Öjenol ;; (Fenol, 2-metoksi-4- (2-propenil)-)	0.964
17	22.724	Tetradekan	2.728
18	22.833	Dinoseb-asetat ;; (Fenol, 2- (1-metilpropil) -4,6-dinitro-, asetat)	0.366

**Tablo 4.3.** Distile suda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı (devamı)

19	23.217	İzogeraniol ;; (3,7-Dimetil-3Z, 6-oktadien-1-ol)	1.103
20	23.363	Siklopentolat ;; (Mydrilate)	1.086
21	23.638	Gama terpinen ;; (p-menta-1,4-dien)	9.094
22	23.757	Prodox 146 ;; (2,4-Di-tert-butilfenol)	1.012

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika. Sulu hazırlanan çözeltinin suyu buharlaştırıldıktan sonra 5mg/ml olarak metanolde tekrar çözdürüldü)



**Tablo 4.4.** Etanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	12.695	Mirsen ;; (1,6-Oktadien, 7-metil-3-metilen-)	0.059
2	13.053	Alfa-linolenik asit metil ester ;; (9,12,15-Oktadekatrienoik asit (Z, Z, Z)- metil ester)	0.004
3	13.245	3-Karen ;; (Bisiklo [4.1.0] hept-3-en, 3,7,7-trimetil-)	0.109
4	13.489	Linoleik asit metil ester ;; (9,12-Oktadekadienoik asit (Z, Z)-, metil ester)	0.004
5	13.857	Limonen ;; (1-Metil-4- (1-metiletetil) sikloheksen)	7.683
6	14.744	İzogeraniol ;; (3,7-Dimetil-3Z, 6-oktadien-1-ol)	0.005
7	14.838	Gama terpinen ;; (p-menta-1,4-dien)	0.064
8	15.772	Alfa terpinolen ;; (1-Metil-4- (1-metiletetiliden) sikloheksen)	0.118
9	16.187	Linalol ;; (3,7-Dimetilokta-1,6-dien-3-ol)	0.037
10	16.306	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	0.049
11	16.675	Karyofilen ;; (Betakaryofilen)	0.005
12	17.297	Etinamat ;; (Valamin)	0.004
13	17.603	Dokosaheksaenoik asit ;; (4,7,10,13,16,19-Dokosaheksaenoik asit (Z, Z, Z, Z, Z, Z)-)	0.008
14	18.107	1-Heksadeken ;; (Seten)	0.005
15	20.166	İzopulegol ;; ((-)-izopulegol)	0.007
16	20.203	Skualen ;; (2,6,10,15,19,23-Hekzametil-tetrakosa-2,6,10,14,18,22-heksaen)	0.009
17	20.244	Patchoulane ;; (1H-3a, 7-Metanoazulen, oktahidro-1,4,9,9-tetrametil-)	0.004

**Tablo 4.4.** Etanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı (devamı)

18	20.571	Neral ;; (Z-sitral)	0.064
19	21.106	Geranial ;; (E-sitral)	0.106
20	21.220	1-p-mentene ;; (Sikloheksen, 1-metil-4- (1-metiletil) - )	0.060
21	21.962	Karan ;; (Bisiklo [4.1.0] heptan, 3,7,7-trimetil-)	0.041
22	22.569	Geranil asetat ;; (2,6-Oktadien-1-ol, 3,7-dimetil-, asetat, (E)-)	0.082
23	25.583	Linoleik asit ;; (9,12-Oktadekadienoik asit (Z, Z)-)	55.128
24	25.755	Linoleik asit etil ester ;; (9,12-Oktadekadienoik asit (E, E)-, etil ester)	22.345
25	26.621	Oktadekanedioik asit ;; (1,16-Hekzadekandikarboksilik asit)	10.932

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika)

**Tablo 4.5.** Metanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	7.278	Gama-terpineol ;; (p-menth-4(8)-en-1-ol)	0.884
2	10.132	Gama-linolenik asit metil ester ;; (6,9,12- Oktadekatrienoik asit (Z, Z, Z)-, metil ester)	0.917
3	12.607	Hemimellitene ;; (1,2,3-Trimetilbenzen)	3.666
4	12.887	Dekan	7.359
5	13.784	Limonen ;; (1-Metil-4- (1-metiletetil) sikloheksen)	2.109
6	13.862	İzopulegol ;; ((-)-izopulegol)	0.410
7	14.978	Skualan ;; (2,6,10,15,19,23-Hekzametiltetrakosan)	0.436
8	15.185	Tetrakosan	1.071
9	15.969	Niobe yağı ;; (Benzoik asit metil ester)	1.078
10	16.156	Undekan ;; (Hendekan)	3.744
11	16.306	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	1.743
12	19.596	Tridekan	1.036
13	20.281	Patchoulane ;; (1H-3a, 7-Metanoazulen, oktahidro- 1,4,9,9-tetrametil-)	1.085
14	21.251	Farnesan ;; (2,6,10-trimetildodekan)	0.683
15	21.464	Trikosan	0.368
16	21.547	Dodekan ;; (Diheksil)	0.840
17	21.899	Heneikosan	0.652
18	22.413	Dokosan	0.330
19	22.647	Tetradeken ;; (1-Tetradeken)	4.144
20	22.724	Tetradekan	3.555

**Tablo 4.5.** Metanolde bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı (devamı)

21	23.513	Sitronellol ;; (Dihidrogeraniol)	2.523
22	23.591	Oktadekan	2.098
23	23.757	Prodox 146 ;; (2,4-Di-tert-butilfenol)	5.460
24	24.297	1-Heksadeken ;; (Seten)	4.542
25	25.236	Akrilik asit ;; (2-Propenoik asit)	23.194
26	26.668	Eikosan	21.137

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika)

**Tablo 4.6.** Asetonda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

<b>No</b>	<b>TZ (dk)</b>	<b>Bileşik İsmi</b>	<b>Yüzde Dağılım (%)</b>
1	13.681	Limonen ;; (1-Metil-4- (1-metiletenil) sikloheksen)	0.336
2	14.729	Tridekan	0.294
3	16.202	Skualan ;; (2,6,10,15,19,23-Hekzametil-tetrakosan)	0.122
4	16.265	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	0.157
5	19.580	Dodekan ;; (Diheksil)	0.336
6	20.722	Undekan	0.176
7	21.246	Fitan ;; (2,6,10,14-Tetrametilhekzadekan)	0.419
8	21.381	Oktadekan	0.215
9	21.458	Dokosan	0.143
10	21.541	Hekzadekan ;; (Setan)	0.122
11	22.008	Tetrakosan	0.147
12	22.102	Farnesan ;; (2,6,10-trimetildodekan)	0.092
13	22.641	1-Heksadekan ;; (Seten)	1.745
14	22.719	Tetradekan	1.412
15	22.828	Dekan	0.293
16	23.186	Pentadekan	0.215
17	23.264	Heneikosan	0.264
18	23.295	Nonadekan	0.453
19	23.352	Heptadekan	0.274
20	23.539	Trikosan	0.475
21	23.591	Eikosan	1.543
22	23.757	Prodox 146 ;; (2,4-Di-tert-butilfenol)	5.503

**Tablo 4.6.** Asetonda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı (devamı)

23	25.744	Linoleik asit ;; (9,12-Oktadekadienoik asit (Z, Z)-)	84.769
----	--------	--	--------

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika)



**Tablo 4.7.** Hekzanda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	13.779	Limonen ;; (1-Metil-4- (1-metiletenil) sikloheksen)	0.352
2	14.973	Farnesan ;; (2,6,10-trimetildodekan)	0.197
3	16.239	Tridekan	0.205
4	16.306	Pelargonaldehit ;; (Non-anal)	1.157
5	19.590	Dodekan ;; (Diheksil)	0.687
6	19.964	Dekan	0.348
7	20.727	Pentadekan	0.359
8	21.458	Fitan ;; (2,6,10,14-Tetrametilhekzadekan)	0.317
9	22.340	Pristan ;; (2,6,10,14-Tetrametilpentadekan)	0.316
10	22.724	Tetradekan	2.701
11	23.269	Undekan ;; (Hendekan)	0.374
12	23.300	Oktadekan	0.923
13	23.357	Heptadekan	0.455
14	23.592	Dokosan	3.566
15	23.752	Prodox 146 ;; (2,4-Di-tert-butilfenol)	68.028
16	24.343	Hekzadekan ;; (Setan)	2.306
17	25.075	Tetrakosan	1.631
18	27.975	Heneikosan	1.873
19	29.215	Eikosan	3.306
20	30.829	Nonadekan	4.780

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika)

**Tablo 4.8.** Sikloheksanda bekletilen ekstrenin GC-MS içeriği; tutulma zamanı, bileşik adı ve yüzde dağılımı

No	TZ (dk)	Bileşik İsmi	Yüzde Dağılım (%)
1	4.149	Eikosan	3.017
2	11.865	Dodekan ;; (Diheksil)	1.656
3	20.742	Dekan	1.943
4	21.791	Tetradekan	2.174
5	22.019	Skualan ;; (2,6,10,15,19,23-Hekzametiltrakosan)	0.390
6	22.673	Tridekan	2.251
7	22.730	Hekzadekan ;; (Setan)	2.323
8	23.767	Ethanox 701 ;; (2,6-Di-Tert-butilfenol)	42.945
9	24.011	Fitan ;; (2,6,10,14-Tetrametilheksadekan)	1.377
10	24.743	Nonadekan	2.483
11	25.874	Oktadekan	1.352
12	26.398	Heptadekan	2.146
13	26.471	Pentadekan	6.459
14	26.543	Butillenmiş hidroksitoluen ;; (2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol)	5.996
15	26.740	Pristan ;; (2,6,10,14-Tetrametilpentadekan)	1.968
16	27.991	Heneikosan	2.975
17	29.143	Dokosan	1.943
18	30.850	Trikosan	8.127
19	33.014	Tetrakosan	6.439

(Not: TZ; tutulma zamanı, dk; dakika)

### 4.3. HMG-KoA Redüktaz Aktivite Analizi Sonuçları

Ceviz iç kabuğunun farklı polaritedeki ekstralarının plaka kuyucuklarındaki 20 µg/mL, 5 µg/mL ve 2 µg/mL konsantrasyonlarının HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri in vitro olarak araştırıldığında inhibisyon etkilerinin %0,2 ile %3,2 arasında olduğu saptandı (Tablo 4.9). %0,2'lik inhibisyon 20 µg/mL metanollü ekstrede iken, %3,2'lik inhibisyon 2 µg/mL asetonlu ekstrede görüldü (Şekil 4.1). Referans inhibitör olan atorvastatinin inhibisyon etkisi %88,7 idi. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi.

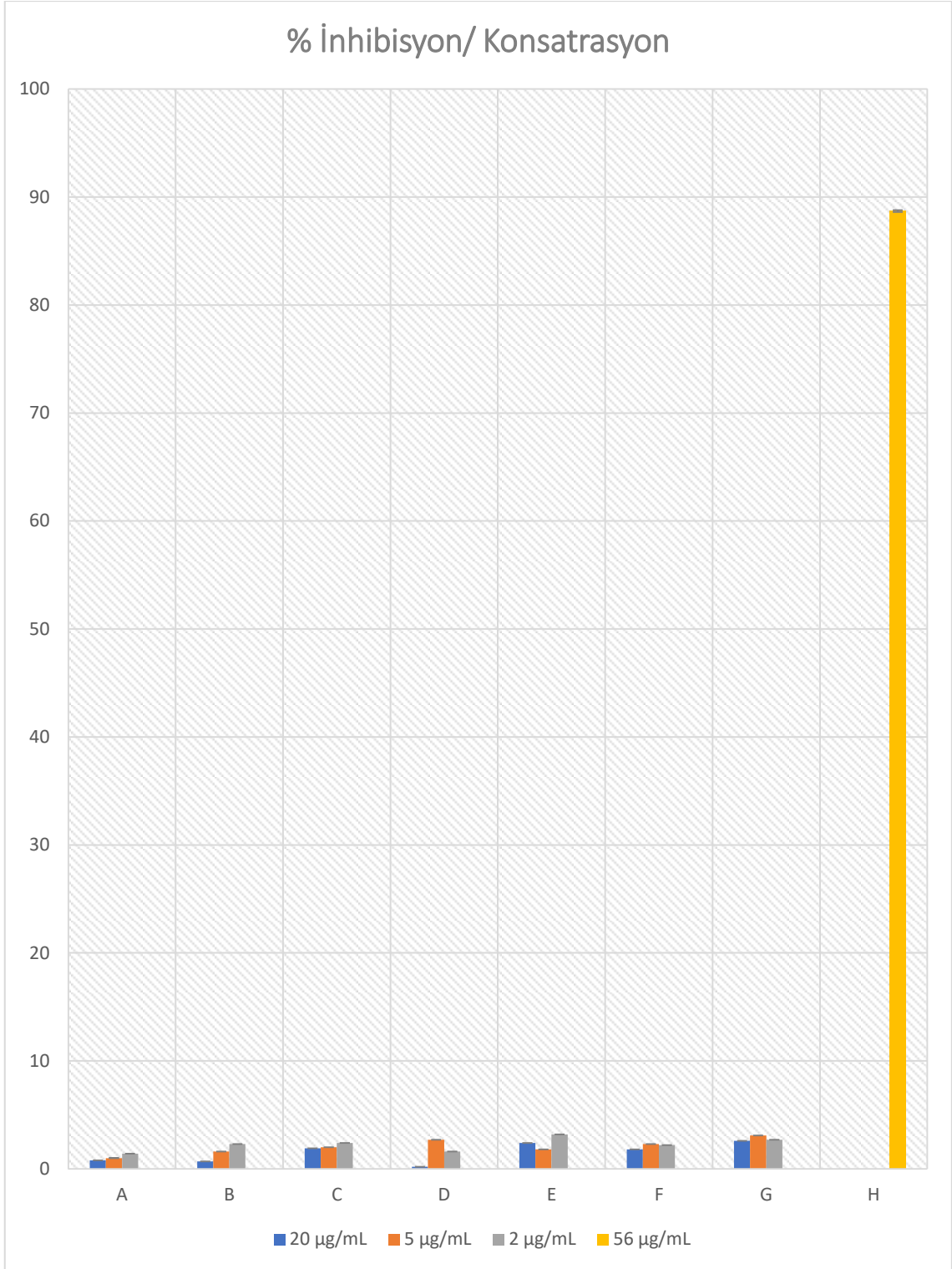
**Tablo 4.9.** Ekstrelerin HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelerle inhibisyon sonuçları

Ekstreler	Kuyucuk içi konsantrasyon	% İnhibisyon
Atorvastatin	56 µg/mL	88,7
Distile suda bekletilen ekstrakt	20 µg/mL	0,8
Distile suda bekletilen ekstrakt	5 µg/mL	1,0
Distile suda bekletilen ekstrakt	2 µg/mL	1,4
Distile suda kaynatılan ekstrakt	20 µg/mL	0,7
Distile suda kaynatılan ekstrakt	5 µg/mL	1,6
Distile suda kaynatılan ekstrakt	2 µg/mL	2,3
Asetonlu ekstrakt	20 µg/mL	2,4
Asetonlu ekstrakt	5 µg/mL	1,8
Asetonlu ekstrakt	2 µg/mL	3,2
Etanollü ekstrakt	20 µg/mL	1,9
Etanollü ekstrakt	5 µg/mL	2,0
Etanollü ekstrakt	2 µg/mL	2,4
Metanollü ekstrakt	20 µg/mL	0,2
Metanollü ekstrakt	5 µg/mL	2,7
Metanollü ekstrakt	2 µg/mL	1,6

**Tablo 4.9.** Ekstrelerin HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelik inhibisyon sonuçları (devamı)

Hekzanlı ekstrakt	20 µg/mL	1,8
Hekzanlı ekstrakt	5 µg/mL	2,3
Hekzanlı ekstrakt	2 µg/mL	2,2
Siklohekzanlı ekstrakt	20 µg/mL	2,6
Siklohekzanlı ekstrakt	5 µg/mL	3,1
Siklohekzanlı ekstrakt	2 µg/mL	2,7

(Not: Ekstraktların kuyucuk içindeki konsatrasyonu; 1:5 dilüsyonda 20 µg/mL, 1:10 dilüsyonda 5 µg/mL, 1:50 dilüsyonda 2 µg/mL'ye takabül etmektedir)



**Şekil 4.1.** Ceviz iç kabuğu ekstralarının HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin % İnhibisyon/ Konsatrasyon grafiği

(Not: A: Distile suda bekletilen ekstre, B: Distile suda kaynatılan ekstre, C: Etanollü ekstre, D: Metanollü ekstre, E: Asetonlu ekstre, F: Hekzanlı ekstre, G: Sikloheksanlı ekstre, H: Atorvastatin. 2-5-20 µg/mL ekstralarının, 56 µg/mL atorvastatinin kuyu içi konsatrasyonlarıdır.)

#### 4.4. Kolesterol Esteraz Aktivite Analizi Sonuçları

Ceviz iç kabuğunun farklı polaritedeki ekstralarının plaka kuyucuklarındaki 333 µg/mL, 200 µg/mL, 133 µg/mL ve 67 µg/mL konsantrasyonlarının kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisi in vitro olarak araştırıldığında, distile sulu ekstralarda %13,6 ile %2,7 arasında inhibisyon etki gözlemlendi. %1,8 oranı ile aseton dışındaki ekstralarda inhibisyon görülmedi (Tablo 4.10)(Şekil 4.2).

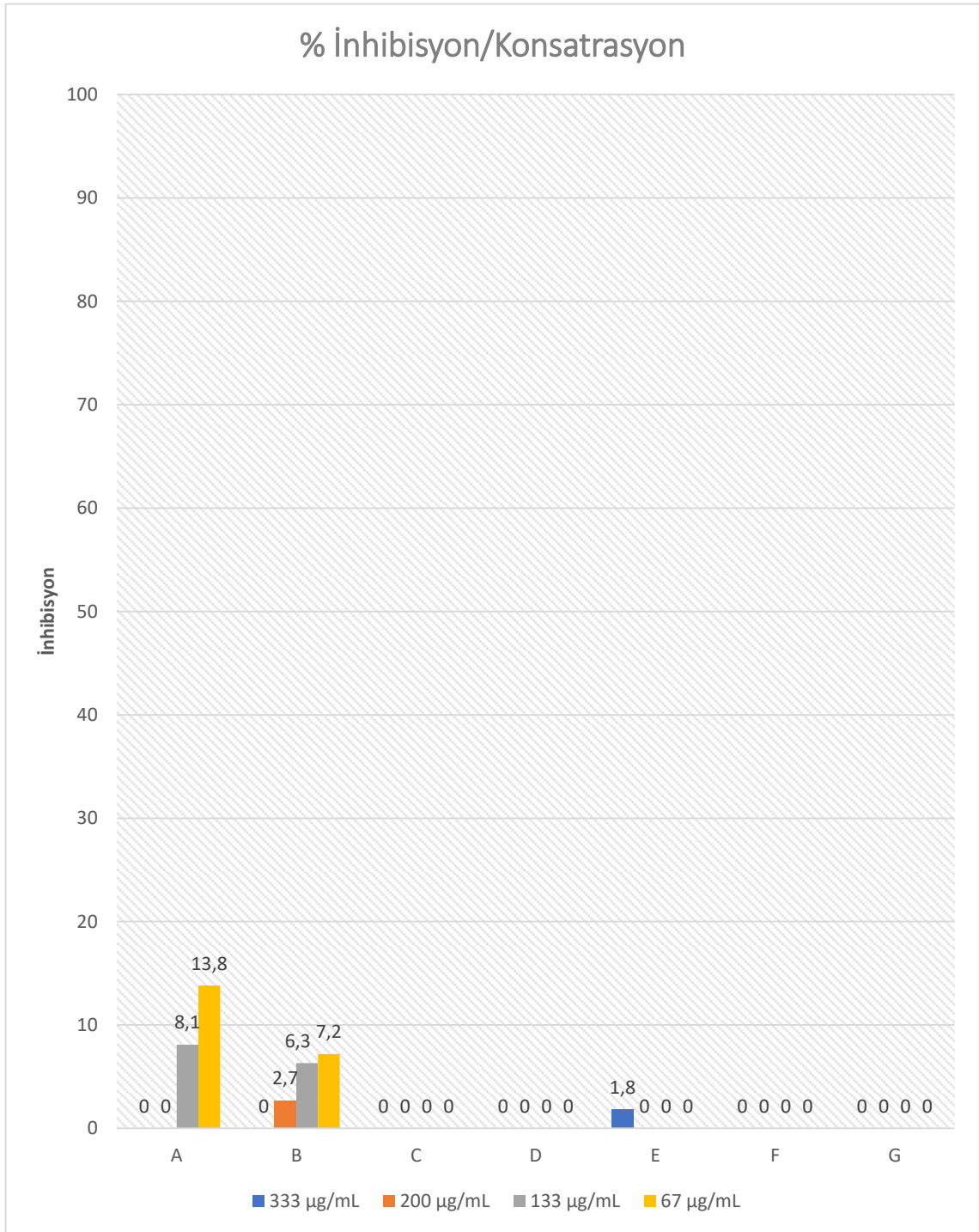
**Tablo 4.10.** Ekstrelerin kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelik inhibisyon sonuçları

Ekstreler	Kuyucuk içi konsantrasyon	% İnhibisyon
Distile suda bekletilen ekstrakt	333 µg/mL	- <sup>a</sup>
Distile suda bekletilen ekstrakt	200 µg/mL	-
Distile suda bekletilen ekstrakt	133 µg/mL	8,1
Distile suda bekletilen ekstrakt	67 µg/mL	13,6
Distile suda kaynatılan ekstrakt	333 µg/mL	-
Distile suda kaynatılan ekstrakt	200 µg/mL	2,7
Distile suda kaynatılan ekstrakt	133 µg/mL	6,3
Distile suda kaynatılan ekstrakt	67 µg/mL	7,2
Asetonlu ekstrakt	333 µg/mL	1,8
Asetonlu ekstrakt	200 µg/mL	-
Asetonlu ekstrakt	133 µg/mL	-
Asetonlu ekstrakt	67 µg/mL	-
Etanollü ekstrakt	333 µg/mL	-
Etanollü ekstrakt	200 µg/mL	-
Etanollü ekstrakt	133 µg/mL	-
Etanollü ekstrakt	67 µg/mL	-
Metanollü ekstrakt	333 µg/mL	-
Metanollü ekstrakt	200 µg/mL	-

**Tablo 4.10.** Ekstrelerin kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisinin yüzdelik inhibisyon sonuçları (devamı)

Metanollü ekstrakt	133 µg/mL	-
Metanollü ekstrakt	67 µg/mL	-
Hekzanlı ekstrakt	333 µg/mL	-
Hekzanlı ekstrakt	200 µg/mL	-
Hekzanlı ekstrakt	133 µg/mL	-
Hekzanlı ekstrakt	67 µg/mL	-
Sikloheksanlı ekstrakt	333 µg/mL	-
Sikloheksanlı ekstrakt	200 µg/mL	-
Sikloheksanlı ekstrakt	133 µg/mL	-
Sikloheksanlı ekstrakt	67 µg/mL	-

a: - ile belirtilen verilerde inhibisyon görülmedi



**Şekil 4.2.** Ceviz iç kabuğu ekstralarının kolesterol esteraz enzimi üzerindeki etkisinin % İnhibisyon/ Konsatrasyon grafiği

(Not: A: Distile suda bekletilen ekstre, B: Distile suda kaynatılan ekstre, C: Etanollü ekstre, D: Metanollü ekstre, E: Asetonlu ekstre, F: Hekzanlı ekstre, G: Sikloheksanlı ekstre. 333-200-133-67 µg/mL ekstralarının kuyucuk içi konsantrasyonlarıdır. “0” değerleri inhibisyon olmadığını ifade etmektedir.)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ceviz bitkisinin lipit metabolizması ve kardiyovasküler sistemle bağlantılı hastalıklarda terapötik etkinliğinin olduğu bu sebeple cevizin kullanımının tavsiye edildiği bilimsel çalışmalarla bildirilmiştir <sup>7,42</sup>. Bu tavsiyelerin ana sebebi ceviz türü içerisindeki çoklu doymamış yağ asit bileşenlerinden kaynaklanmaktadır <sup>7,42,57</sup>. Ayrıca oksidatif streste antioksidan olarak rol alan fenolik bileşikler gibi sekonder metabolit varlığı da ceviz türünü daha da çok göz önüne getirmektedir <sup>25,42,58</sup>.

Cevizin farklı aksamalarının tüketimi ile ilgili tavsiyeler arasında demleme (infüzyon), bekleme (maserasyon) ve kaynatma (dekoksasyon) metotları bulunmaktadır <sup>59</sup>. Bu yöntemlerin su ile yapılması diğer kimyasallara göre günlük tüketime daha uygun düşmektedir. Nitekim halk tarafından çoğunlukla bir gece suda bekletilen ya da suda kaynatılan metotları tercih edilmektedir. Çalışmamızdaki suda kaynatılan çözeltilerde kaynama esnasında numunenin kompleks molekülleri parçalandığından ve enzimatik bozunma tepkimeleri gerçekleştiğinden suya geçen madde miktarı 12,2 mg/ml ile hem suda bekletilene hem de diğer çözeltilere göre daha fazla çıkmıştır.

Veriler bazında doymamış yağ asitlerinin sulu ekstraktlardaki yüzdeleri etanol ve asetonda ölçülen yüksek yüzdelerle kıyasla daha düşük seviyelerde olduğu, etanol ve asetonun suya göre yağ molekülleri için daha etkili bir çözücü olduğu görülmüştür.

Distile suda kaynatılan ekstrede görülen %21.789 oranlık fenol bileşiği distile suda bekletilende %45.599 oranlarında ölçülmüştür. Kısa süreli kaynatmadan ziyade uzun süreli oda ısısı muamelesi daha fazla fenol bileşiğinin suya geçişine sebebiyet vermiştir.

Kolesterolün sentez oranı hücredeki seviyesine bağlı olarak belirlenmektedir. Kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan HMG-KoA redüktazı inhibe ederek kolesterolün hücre sentezi önlenmektedir <sup>36</sup>. HMG-KoA redüktazın inhibisyonu sonucu karaciğerde azalan kolesterol miktarı ile kolesterolün plazma konsantrasyonunu düşüren LDL reseptörlerinin ekspresyonu indüklenmekte ve bu sayede kolesterol miktarı düzenlenebilmektedir <sup>48</sup>. Ceviz iç kabuğunun HMG-KoA redüktazı inhibe etme özelliğini in vitro olarak araştırdığımız çalışmamızda, farklı polaritedeki çözücülerde hazırlanmış ceviz iç kabuğu ekstraktlarının HMG-KoA redüktazı inhibe etme yeteneğinde olan atorvastatin maddesi kadar etkili olmadığı görülmüştür. 20 µg/mL ve 5 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek inhibisyon sikloheksanli ekstrede, 2 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek inhibisyon asetonlu ekstrede görülmüştür. En düşük

inhibisyon distile suda bekletilerek hazırlanan ekstrede görülmüştür. Literatürde ceviz iç kabuğunun in vitro olarak HMG-KoA redüktaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışma bulunmamakla birlikte Afrika ceviz bitkisinin yağı ile yapılan bir çalışmada karaciğer hücrelerindeki HMG-KoA redüktaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış, normal diyetle beslenen hayvanlarla, Afrika ceviz yağı ilave edilmiş diyetle beslenenlerin karaciğer hücre lizatlarındaki HMG-KoA redüktaz aktivitesi üzerindeki kıyaslamasında, ekstrenin HMG-KoA redüktaz aktivitesini inhibe edebilecek etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek kolesterol diyeti ile beslenenlerin atorvastatin ilave edilenlerle mukayesesinde HMG-KoA redüktaz üzerinde atorvastatin kadar etkili olmadığı görülmüştür <sup>60</sup>. *Salvia* türleri ile yapılan bir çalışmada *S. absconditiflora*, *S. hypargeia*, *S. kurdica*, *S. multicaulis*, *S. palaestina*, *S. pinnata*, *S. rosifolia*, *S. syriaca* türlerinin atorvastatin kadar olmasa da HMG-KoA redüktaz üzerinde inhibisyon etkisi olduğu <sup>61</sup>, başka bir çalışmada *Quercus infectoria*, *Rosa damascena*, *Myrtus communis* türlerinin potansiyel bir HMG-KoA redüktaz inhibitörü olduğu <sup>62</sup> *Basella alba*, *Amaranthus viridis*, *Piper sarmentosum* türlerinin %50 üzerinde anti-HMG-KoA redüktaz aktivitesi gösterdiği <sup>63</sup>, *Citrus aurantium* çiçeklerinin iyi bir HMG-KoA redüktaz inhibitörü olabileceği <sup>64</sup>, *Gnetum gnemon* tohum ekstraktının güçlü anti-HMG-KoA aktivitesi olduğu <sup>65</sup> bildirilmiştir. *Terminalia chebula*, *Terminalia bellirica* ve *Phyllanthus emblica* türlerini içeren ekstrakt karışımının da HMG-KoA redüktaz üzerinde inhibisyon etkisi olduğu ve hiperkolesterolemi için alternatif tedavi olarak potansiyel bir ürün olabileceği raporlanmıştır <sup>66</sup>.

Plazma kolestrol düzeyi ile ilişkili enzim yolaklarından birisi olan pankreatik kolesterol esteraz aktivitesi, bağırsak lümenindeki kolesterol esterlerini katalize edip mukoza hücrelerine girişine aracılık etmektedir. Lenf yolu ile dolaşıma geçen bu katalize ürünler plazma kolesterol miktarında artışa sebebiyet vermekte kardiyovasküler hastalıklardan aterosklerozun gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlamaktadır <sup>29</sup>. Bu katkının engellenebilmesi için farklı bitki türleri ve kimyasal ajanların üzerinde çalışılarak kolesterol esterazı inhibe etme potansiyelleri araştırılmaktadır. Çalışmamızdaki ceviz iç kabuğu ekstrelere kıyaslandığında distile sulu örneklerde inhibisyon tespit edilmiştir. Fakat oransal olarak değerlendirildiğinde bu inhibisyonun enzim üzerinde etki oluşturabilecek seviyede olmadığı da görülmektedir. Literatürde ceviz iç kabuğunun kolesterol esteraz

enzimi üzerine etkisi ile ilgili çalışma bulunmamakla birlikte diğer bitki türlerinin enzime olan etkilerine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bunlardan karanfil bitkisinin (*Syzygium aromaticum*) pankreatik kolesterol esteraz üzerindeki inhibitör etkisi araştırılıp kontrol olarak kullanılan simvastatinle kıyaslandığında, simvastatin kadar inhibitör etkisi olduğu görülmüş. Kolesterol esteraz aktivitesini inhibe ederek yağların ve kolesterolün sindirimini ve emilimini engelleyerek hiperlipidemini önlenmesine katkı sağlayabileceği, bu etkinin de fenolik içeriğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir <sup>67</sup>. Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisinin ve sinameki (*Cassia angustifolia*) bitkisinin, pankreatik kolesterol esteraz üzerinde simvastatin kadar olmasa da iyi bir inhibitör etkisinin olduğu raporlanmıştır <sup>68</sup>. Üzüm çekirdeği <sup>69</sup>, çay <sup>70,71</sup>, alıç <sup>71</sup>, kurt üzümü <sup>71</sup>, *Dendrobium nobile* <sup>71</sup>, *Ecballium elaterium* yaprak <sup>49</sup>, *Pinus brutia* kabuk <sup>49</sup> ve *Hedera helix* yaprak <sup>49</sup>, *Clausena cambodiana* yaprak <sup>72</sup>, *Camellia nitidissima* çiçek <sup>73</sup>, *Citrus grandis* <sup>74</sup> özütlerinin pankreas kolesterol esterazına karşı inhibitör etkisi olduğu, *Mangifera indica* yapraklarından elde edilen biyoaktif ana bileşenin inhibitör etkisi olmadığı literatüre geçmiştir <sup>75</sup>.

Ceviz iç kabuğu tüketiminin kolesterolü düzenlediğine dair iddiaların açıklığa kavuşturulabilmesi için bu çalışmada ceviz iç kabuğu ekstraktlarının plazma kolesterol düzeyi ile ilişkili enzim yollarında görevli enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Ceviz iç kabuğunun hem kolesterolün bağırsaklardan emiliminden sorumlu enzimi kolesterol esteraz üzerinde hem de hücre içi kolesterol yapımında görevli enzimi HMG-KoA redüktaz üzerinde, in vitro olarak, istatistiki açıdan anlamlı bir inhibisyon etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Düşük orandaki inhibisyonların sebebi ceviz kabuğunun içeriğindeki ekstraksiyon şekline göre ortaya çıkmış çeşitli maddelerin etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak; ceviz iç kabuğunun farklı polaritelerdeki çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının plazma kolesterol seviyesini düzenleyen iki farklı enzim yolağında terapötik seviyede inhibitör etkisinin olmadığı yönünde güçlü veriler elde edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Şimşek M, Gülsoy E. Ceviz ve içerdiği yağ asitlerinin insan sağlığı açısından önemi üzerine yapılan bazı çalışmalar. *Iğdır üniversitesi fen bilimleri enstitüsü dergisi*. 2016;6(4):9-15.
2. Li L, Tsao R, Yang R, Kramer JK, Hernandez M. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *Cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of agricultural food chemistry*. 2007;55(4):1164-1169.
3. Thakur A. Juglone: A therapeutic phytochemical from *Juglans regia* L. *Journal of medicinal plants research*. 2011;5(22):5324-5330.
4. Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN, Murphy DJ, Michell RH. *Lipids: Biochemistry, biotechnology and health*. 6<sup>th</sup> ed: John Wiley & Sons; 2016.
5. Feingold KR. Cholesterol lowering drugs. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK395573/?report=classic>: MDTText.com, Inc., South Dartmouth (MA), Erişim tarihi: 29 Mart 2020.
6. Yıldırım AB, Kılınç AY. Yaşlı hastalarda dislipidemi. *Türk kardiyoloji dern ars*. 2017;45(5):25-28.
7. Kris-Etherton PM. Walnuts decrease risk of cardiovascular disease: A summary of efficacy and biologic mechanisms. *The Journal of nutrition*. 2014;144(4 Suppl):547S-554S.
8. Rivers MCA, D.J. *Juglans regia*. The IUCN red list of threatened species 2017 e.T63495a61526700 <http://dx.Doi.Org/10.2305/IUCN.Uk.2017-3.Rlts.T63495a61526700.En> , Erişim tarihi: 20 Mart 2020.
9. Simpson MG. *Plant systematics*. 2<sup>nd</sup> ed: Academic Press; 2010.
10. Şahin İ. Sağlıklı beslenmede ceviz. *Bahçe*. 2005;34(1):157-162.
11. Bayazit S, Tefek H, Çalışkan O. Türkiye’de ceviz (*Juglans regia* L.) araştırmaları. *Süleyman demirel üniversitesi ziraat fakültesi dergisi*. 2016;1(1):169-179.
12. Duke JA. *Handbook of nuts: Herbal reference library*. 1<sup>st</sup> ed: CRC press; 2000.
13. Sze-Tao KWC, Sathe SK. Walnuts (*Juglans regia* L): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the science of food and agriculture*. 2000;80(9):1393-1401.
14. Zhou W, Shiyang Z, Guo R. Phytochemical compositions and bioactivities of *Juglans regia* shell and green husks. *Medicine research*. 2018;2(2).

15. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food chemical toxicology*. 2008;46(6):2103-2111.
16. Tapia MI, Sánchez-Morgado JR, García-Parra J, Ramírez R, Hernández T, González-Gómez D. Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Journal of food composition analysis*. 2013;31(2):232-237.
17. Li X, Guo M, Chi J, Ma J. Bioactive peptides from walnut residue protein. *Molecules*. 2020;25(6):1285.
18. Rabadán A, Pardo JE, Gómez R, Álvarez-Ortí M. Evaluation of physical parameters of walnut and walnut products obtained by cold pressing. *LWT-food science and technology*. 2018;91:308-314.
19. Kaymak HÇ. Juglon (5-hydroxy-1, 4-naphthalenedione) ve ceviz yaprağı ekstraktının turp (*Raphanus sativus* L.)'ta bazı gelişme özellikleri ve verim üzerine etkisi. *Atatürk üniversitesi ziraat fakültesi dergisi*. 2018;49(1):1-5.
20. Tomer V, Kumar A, Gupta K, Shukla S, Rafiq S. Walnut. In: Nayik GA, Gull A. *Antioxidants in vegetables and nuts - properties and health benefits*. Singapore: Springer Singapore; 2020:385-422.
21. Erdem E. *Juglans regia* L.'nin fitoterapideki önemi. 2010, Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, 96 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Turhan Baykal).
22. Haghi E, Rezaie S, Aghaee EM, Sadighara P, Ahmadi F. The effect of ethanolic extract of walnut thin shell on the growth of aspergillus spp. *Journal of food safety hygiene*. 2016;2(3/4):84-89.
23. Dehghani F, Mashhoody T, Panjehshahin M. Effect of aqueous extract of walnut septum on blood glucose and pancreatic structure in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Iranian journal of pharmacology therapeutics*. 2012;11(1):10-10.
24. Esen ÖB. *Health related properties of different parts of walnut (Juglans regia L.) and walnut drink*. 2013, İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, 59 sayfa, İstanbul, (Yrd. Doç. Dr. Esra Çapanoğlu Güven).
25. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of nutrition*. 2001;131(11):2837-2842.

26. Yiğit A, Ertürk Ü, Korukluoğlu M. Fonksiyonel bir gıda: Ceviz. *Bahçe*. 2005;34(1):163-169.
27. Can Ü. Okside-LDL ve reseptörü lektin benzeri okside-LDL reseptör-1. *Genel tıp dergisi*. 2016;26(4).
28. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(34):20963-20966.
29. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 7<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman; 2017.
30. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*. 2008;4(2):89-96.
31. Hames D, Hooper N. *Biochemistry (bios instant notes)*. 3<sup>th</sup> ed: Taylor & Francis; 2005.
32. Wikipedia. Cholesterol. <https://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>. Erişim tarihi: 20 Mart 2020.
33. Haines TH. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Progress in lipid research*. 2001;40(4):299-324.
34. Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and hmg-coa reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *Journal of lipid research*. 1984;25(13):1450-1461.
35. Low H, Hoang A, Sviridov D. Cholesterol efflux assay. *JoVE (journal of visualized experiments)*. 2012(61):e3810.
36. Dong B, Wu M, Li H, Kraemer FB, Adeli K, Seidah NG, Park SW, Liu J. Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1 $\alpha$  and SREBP2: Mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *Journal of lipid research*. 2010;51(6):1486-1495.
37. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. *Harper's illustrated biochemistry*. 31<sup>st</sup> ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018.
38. Chang H-Y, Wu J-R, Gao W-Y, Lin H-R, Chen P-Y, Chen C-I, Wu M-J, Yen J-H. The cholesterol-modulating effect of methanol extract of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) leaves on regulating LDLR and PCSK9 expression in HepG2 cells. *Molecules*. 2019;24(3):493.
39. Azhar R, Siddiqui A, Ali S. Effect of aqueous extract of walnut leaves on lipid profile and atherogenic ratio in hypercholesterolemic rats. *The journal of islamic international medical college quarterly*. 2015;92:224.

40. Şahin EM, Kılınçarslan MG. Güncel kılavuzlar ışığında dislipidemi yönetiminin ilk basamağı: Yaşam tarzı değişiklikleri. *Türkiye aile hekimliği dergisi*. 2019;23(1):31-40.
41. Kayıkçıoğlu M, Tokgözoğlu L, Kılıçkap M, Göksülük H, Karaaslan SDD, Özer N, Abacı A, Yılmaz MB, Barçın C, Ateş K. Türkiye’de dislipidemi sıklığı ve lipit verileri: Kardiyovasküler risk faktörlerine yönelik epidemiyolojik çalışmaların sistematik derleme ve meta-analizi. *Türk kardiyol dern ars*. 2018;46(7):556-574.
42. Guasch-Ferre M, Li J, Hu FB, Salas-Salvado J, Tobias DK. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: An updated meta-analysis and systematic review of controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*. 2018;108(1):174-187.
43. Kayaalp SO. *Akılclı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. 13. baskı. Ankara: Pelikan Kitabevi; 2018.
44. TEMD. *TEMD dislipidemi tanı ve tedavi klavuzu*. 7. baskı. Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği; 2019.
45. Akbulut İM, Gürlek A, Erol Ç. Statin dışı LDL kolesterol düşürücü ajanlar. *MN Kardiyoloji*. 2017;24(3):127-134.
46. Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Reece JB. *Campbell biology*. 11<sup>th</sup> ed. United States: Pearson; 2017.
47. Gunasekaran B, Shukor MY. Hmg-coa reductase as target for drug development. *Methods mol biol*. 2020;2089:245-250.
48. Luskey KL, Stevens B. Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J biol chem*. 1985;260(18):10271-10277.
49. Asmaa BH, Ream N. In vitro screening of the pancreatic cholesterol esterase inhibitory activity of some medicinal plants grown in syria. *Int journal pharmacogn phytochem res*. 2016;8(8):1432-1436.
50. Ec 3.1.1.13. 2021. <https://enzyme.expasy.org/EC/3.1.1.13>. Erişim tarihi: 25 Mart 2020.
51. Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase. *Journal of lipid research*. 2002;43(12):2017-2030.
52. Pietsch M, Gütschow M. Alternate substrate inhibition of cholesterol esterase by thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-ones. *Journal of biological chemistry*. 2002;277(27):24006-24013.

53. Chiou S-Y, Lai G-W, Lin L-Y, Lin G. Kinetics and mechanisms of cholesterol esterase inhibition by cardiovascular drugs in vitro. *Indian J biochem biophys.* 2006;43:52-55.
54. Im KH, Choi J, Baek SA, Lee TS. Hyperlipidemic inhibitory effects of phellinus pini in rats fed with a high fat and cholesterol diet. *Mycobiology.* 2018;46(2):159-167.
55. Sparkman OD, Penton Z, Kitson FG. *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide.* Elsevier Science; 2011.
56. Hübschmann H-J. *Handbook of gc-ms: Fundamentals and applications.* John Wiley & Sons; 2015.
57. Feldman EB. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *The Journal of nutrition.* 2002;132(5):1062S-1101S.
58. Arranz S, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Technology. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): Contribution of oil and defatted matter. *European food research.* 2008;227(2):425-431.
59. Cobzaru C, Serban A-N, Cernatescu C. Identification and analysis of tanins in extracts from walnuts green fruits and leaves. *Smart energy sustainable environment.* 2019;22(1):103-112.
60. Oriakhi K, Uadia P. Hypolipidemic activity of tetracarpidium conophorum (african walnut) seed oil and its mechanism of action. *Planta medica international open.* 2020;07(04):e170-e178.
61. Yiğitkan S, Ertaş A, Fırat M, Yeşsi Y, Erdoğan Orhan İ. Lamiaceae familyasına ait 37 tıbbi bitkinin hmg-koa redüktaz İnhibitör aktiviteleri. *Gazi sağlık bilimleri dergisi.* 2021;5(3):24-33.
62. Gholamhoseinian A, Shahouzehi B, F S-F. Inhibitory activity of some plant methanol extracts on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *International journal of pharmacology.* 2010;6.
63. Baskaran G, Salvamani S, Ahmad SA, Shaharuddin NA, Pattiram PD, Shukor MY. Hmg-coa reductase inhibitory activity and phytochemical investigation of basella alba leaf extract as a treatment for hypercholesterolemia. *Drug design, development and therapy.* 2015;9:509.
64. Hao K, Hu W, Hou M, Cao D, Wang Y, Guan Q, Zhang X, Wang A, Yu J, Guo B. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total phenolics from citrus

- aurantium L. Blossoms and evaluation of free radical scavenging, anti-hmg-coa reductase activities. *Molecules*. 2019;24(13).
65. Hafidz K, Puspitasari N, Ma'mur A, Yanuar A, Artha Y, Mun'im A. Hmg-coa reductase inhibitory activity of gnetum gnemon seed extract and identification of potential inhibitors for lowering cholesterol level. *Journal of young pharmacists*. 2017;9:559-565.
  66. Chawannuch M, Prasob-Orn R. In vitro 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme: A reductase inhibition assay of triphala ayurvedic formulation. *Pharmacognosy research*. 2020;12(4).
  67. Sompong W, Muangngam N, Kongpatpharnich A, Manacharoenlarp C, Amorworasin C, Suantawee T, Thilavech T, Adisakwattana S. The inhibitory activity of herbal medicines on the keys enzymes and steps related to carbohydrate and lipid digestion. *BMC complement altern med*. 2016;16(1):439.
  68. Adisakwattana S, Intrawangso J, Hemrid A, Chanathong B, Mäkynen K. Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. *Food technology biotechnology*. 2012;50(1):11.
  69. Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules*. 2011;16(6).
  70. Kumar AP, Sivashanmugam A, Umamaheswari M, Subhadradevi V, Jagannath P. Cholesterol esterase enzyme inhibitory and antioxidant activities of leaves of camellia sinensis (L.) kuntze. Using in vitro models. *International journal of pharmaceutical sciences research*. 2011;2(10):2675.
  71. Aissata KM, Wenping L, Lamine TS, Barra CJ, Sidikiba S. Effect of selected plant extracts on pancreatic lipase inhibition, pancreatic cholesterol esterase activities and cholesterol micellization. *Journal of academia industrial research*. 2019;7(11):150.
  72. Sakunpak A, Saingam W, Jaisamut S, Issuriya A, Ruangrunsi N. Pyranocarbazole alkaloids, isolated from clausena cambodiana leaves, as a pancreatic cholesterol esterase inhibitor, and their hplc–dad quantitative determination method. *Chemical papers*. 2021;75(6):2451-2458.
  73. Zhang H-l, Wu Q-x, Wei X, Qin X-m. Pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory effect of camellia nitidissima chi flower extracts in vitro and in vivo. *Food bioscience*. 2020;37:100682.

74. Mäkynen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, Sakai N, Puranachoti S, Nirojsinlapachai N, Chattapat V, Caengprasath N, Ngamukote S, Adisakwattana S. Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food Chemistry*. 2013;139(1):735-743.
75. Gururaja GM, Mundkinajeddu D, Deth SM, Sangli GK, Abhilash K, Agarwal A. Cholesterol esterase inhibitory activity of bioactives from leaves of *Mangifera indica* L. *Pharmacognosy Research*. 2014;7(4):355-362.

