



**BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ ALDOZ REDÜKTAZ  
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Bilal AKYÜZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya**

**Ana Bilim Dalı**

**Dr. Öğr. Üyesi Bülent ŞENGÜL**

**2023**

**(Her Hakkı Saklıdır)**

T.C.  
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI

**BAZI BİTKİ EKSR TAKTLARININ ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ  
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**  
(Investigation of The Inhibition Effect of Some Plant Extracts on Aldose Reductase Activity)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilal AKYÜZ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Bülent ŞENGÜL

Bayburt  
Kasım, 2023

## KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Dr. Öğr. Üyesi Bülent ŞENGÜL danışmanlığında, 202223006 numaralı Bilal AKYÜZ tarafından hazırlanan “BAZI BİTKİ EKSR TAKTLARININ ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ” adlı bu çalışma 11.9.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan** : ..... İmza: .....

**Jüri Üyesi** : ..... İmza: .....

**Jüri Üyesi** : ..... İmza: .....

Bu tezin Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

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

Doç. Dr. Murat KUL

Enstitü Müdürü

## ETİK ve BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Bitki Ekstraktlarının Aldoz Redüktaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

.../.../2023

Bilal AKYÜZ

## TEŐEKKÖR

Kimya bölümünde yüksek lisans eğitimim süresince; bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana her konuda yardımcı olan değerli Danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Bülent ŐENGÖL'e teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ BAZI BİTKİ EKSR TAKTLARININ ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Bilal AKYÜZ

Kasım 2023, 72 sayfa

Diabetik komplikasyonların gelişiminde ve önlenmesinde, önemli bir rolü olan poliyol yolağı enzimlerinden Aldoz redüktaz (AR) (Alditol: NADP<sup>+</sup> 1- oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.21) koyun böbreğinden kısmi olarak saflaştırıldı, Etanol, metanol ve su çözenleri kullanılarak hazırlanan *Viscum Album L.* (ökse otu)'nun meyve, yaprak ve gövde kısımlarından hazırlanan ekstraktların enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendi. AR enziminin kısmi saflaştırması homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz basamakları ile gerçekleştirildi. 0,486 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan AR enzimi %44,43 verimle, yaklaşık 1,09 kat saflaştırıldı. *Viscum Album L.* bitki ekstraktlarının aldoz redüktaz (AR) enzimi üzerine *in vitro* ve *in siliko* inhibisyon etkileri araştırıldı. *In vitro* inhibisyon etkileri spektrofotometrik yöntemle belirlendikten sonra, moleküler docking yöntemi ile bağlanma enerjisi ve bağlanma modları belirlendi. *Viscum Album L.* bitkisinin gövde kısmının metanol çözenleri kullanılarak hazırlanan ekstraktın AR enzimine karşı, 0.156 µM IC50 değeri ile en güçlü inhibisyon etki gösteren ekstrakt olduğu belirlenmiştir. *Viscum Album L.* bitkisinin meyve kısımlarının etanol, metanol ve su çözenleri kullanılarak hazırlanan ekstraktların IC50 değerleri sırasıyla 1.174 µM, 0.860 µM, 1.560 µM, bitkinin yaprak kısımlarının etanol, metanol ve su çözenleri kullanılarak hazırlanan ekstraktların IC50 değerleri sırasıyla 1.090 µM, 0.190 µM, 9.260 µM ve bitkinin gövde kısımlarının etanol, metanol ve su çözenleri kullanılarak hazırlanan ekstraktların IC50 değerleri sırasıyla 0.700 µM, 0.153 µM, ve 0.906 µM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *Viscum Album L.* bitki ekstraktlarının etkili birer AR inhibitör olabileceğini göstermiştir. AR enzimine karşı *in vitro* inhibisyon etkisi gösteren ekstraktlarda yapılan moleküler docking sonuçları da edinilen verileri desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Viscum Album L.*, aldoz redüktaz, inhibisyon, diabet, kanser.

## ABSTRACT

### MASTER'S THESIS INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ON ALDOSE REDUCTASE ACTIVITY

**Bilal AKYÜZ**

**November 2023, 72 pages**

Aldose reductase (AR) (Alditol: NADP<sup>+</sup> 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.1.21), one of the polyol pathway enzymes that has an important role in the development and prevention of diabetic complications, was partially purified from sheep kidney. *Viscum Album L.* (The effects of extracts prepared from fruit, leaf and stem parts of mistletoe) on enzyme activity were investigated. Partial purification of AR enzyme was performed by preparation of homogenate, ammonium sulfate precipitation and dialysis steps. The AR enzyme, which has a protein specific activity of 0.486 EU/mg, was purified approximately 1.09-fold, with a yield of 44.43%. *In vitro* and *in silico* inhibition effects of *Viscum Album L.* plant extracts on aldose reductase (AR) enzyme were investigated. After the *in vitro* inhibition effects were determined by spectrophotometric method, the binding energy and binding modes were determined by molecular docking method. It was determined that the extract prepared by using the methanol solvent of the stem part of the *Viscum Album L* plant has the strongest inhibitory effect against the AR enzyme with an IC<sub>50</sub> value of 0.156 µM. The IC<sub>50</sub> values of the extracts prepared using ethanol, methanol and water solvents of the fruit parts of the *Viscum Album L* plant are 1.174 µM, 0.860 µM, 1.560 µM, respectively, and the IC<sub>50</sub> values of the extracts prepared using the ethanol, methanol and water solvents of the leaf parts of the plant are 1.090 µM, 0.190 µM, 9.260 µM, respectively. and the IC<sub>50</sub> values of the extracts prepared using ethanol, methanol and water solvents of the stem parts of the plant were determined as 0.700 µM, 0.153 µM, and 0.906 µM, respectively. The results of this study showed that *Viscum Album L* plant extracts can be effective AR inhibitors. The results of molecular docking of the extracts showing an *in vitro* inhibition effect against the AR enzyme also support the data obtained.

**Keywords:** *Viscum Album L.*, aldose reductase, inhibition, diabetes mellitus, cancer.

# İÇİNDEKİLER

<b>ETİK ve BİLDİRİM SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>BİRİNCİ BÖLÜM</b> .....	<b>1</b>
<b>Giriş</b> .....	<b>1</b>
Diabetes Mellitus .....	3
Poliyol Yolağı (Sorbitol Yolağı) .....	5
Aldoz Redüktaz .....	12
Moleküler Docking Yöntemi .....	13
Ökse Otu ( <i>Viscum Album L.</i> ) .....	19
<b>İKİNCİ BÖLÜM</b> .....	<b>22</b>
<b>Kaynak Özetleri</b> .....	<b>22</b>
<b>ÜÇÜNCÜ BÖLÜM</b> .....	<b>26</b>
<b>Materyal ve Metot</b> .....	<b>26</b>
Materyal .....	26
Yararlanılan kimyasallar.....	26
Yararlanılan aygıtlar.....	28
Bitki örneklerinin toplanması.....	29
Ekstraktların hazırlanması.....	29
Yararlanılan solüsyonların hazırlanması. ....	29
Metot .....	30
AR enziminin aktivite tayini. ....	30
Protein ölçümü.....	31
<i>Kalitatif protein ölçümü</i> .....	31

<i>Kantitatif protein ölçümü</i> .....	31
Koyun böbrek AR enziminin saflaştırılması.....	31
<b>DÖRDÜNCÜ BÖLÜM</b> .....	<b>33</b>
<b>Araştırma ve Bulguları</b> .....	<b>33</b>
Araştırma.....	33
Kantitatif protein ölçümü için yararlanılan standart grafik. ....	33
Koyun böbreğinden aldoz redüktaz enziminin kısmi saflaştırılması.....	33
Bulgular .....	34
Aldoz redüktaz enziminin saflaştırılması. ....	34
Fenolik bileşik analizleri.....	35
Koyun böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscum Album l.</i> ekstraktlarının inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar. ....	40
Ar enzimine karşı inhibisyon etkisi gösteren <i>Viscum Album l.</i> bitkisinin içeriğinde bulunan bileşikler için yapılan moleküler docking çalışması sonuçları. ....	45
<b>BEŞİNCİ BÖLÜM</b> .....	<b>54</b>
<b>Tartışma ve Sonuç</b> .....	<b>54</b>
<b>KAYNAKÇA</b> .....	<b>59</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ</b> .....	<b>72</b>

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>Çalışmalar Esnasında Yararlanılan Kimyeviler ve Tedarik Edildiği Firmalar.</i> .....	26
Tablo 2. <i>Deneyler Sırasında Faydalanılan Aygıtlar.</i> .....	28
Tablo 3. <i>Koyun Böbrek Aldoz Redüktaz Enziminin Kısmi Saflaştırma Sonuçları.</i> .....	34
Tablo 4. <i>Viscum Album L.(Ökse Otu) Bitkisinin Meyve Kısımının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları</i> .....	35
Tablo 5. <i>Viscum Album L.(Ökse Otu) Bitkisinin Yaprak Kısımının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları</i> .....	36
Tablo 6. <i>Viscum Album L.(Ökse Otu) Bitkisinin Gövde Kısımının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları</i> .....	38
Tablo 7. <i>AR enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenen Viscun Album L. bitkisinin yapısında bulunan bileşikler için yapılan moleküler docking çalışmalarıyla edinilen docking skorları.</i>	53

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Diabetik komplikasyonlar( <a href="https://tetralaboratuvar.com/diabetin-komplikasyonlari">https://tetralaboratuvar.com/diabetin-komplikasyonlari</a> ). .	5
Şekil 2. Hipeglisemi ve poliyol yolu arasındaki ilişki (Brownlee, 2005). .....	6
Şekil 3. Poliyol yolağı (Sorbitol yolağı) (Alım, & Beydemir, 2012).....	6
Şekil 4. AR enzimi ile diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişki (Srivastava, vd. 2005). .....	7
Şekil 5. Poliyol yolu ile sinir hücresi ilişkisi (Bhadada, vd. 2001).....	8
Şekil 6. Poliyol yolağının aktivasyonu (Gleissner, vd. 2007).....	10
Şekil 7. Poliyol yolunun pentoz fosfat yoluna ve glikolize etkisi (Dunlop, 2000). .....	11
Şekil 8. AR enziminin kristal yapısı (Barski, vd. 2008).....	13
Şekil 9. Moleküler docking hesaplamalarının genel iş akışı (Torres, vd. 2019). .....	14
Şekil 10. Moleküler docking işleminin ana hatları (Ferreira, vd. 2015).....	16
Şekil 11. Proteinlerin kantitatif tayini için yararlanılan ve BSA ile hazırlanan standart grafik. .....	33
Şekil 12. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürme aralığının belirlendiği grafik.....	34
Şekil 13. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscun Album L. (Ökse Otu)</i> meyve kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafığı. ....	40
Şekil 14. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscun Album L. (Ökse Otu)</i> meyve kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafığı. ....	41
Şekil 15. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscun Album L.(Ökse Otu)</i> meyve kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafığı. .....	41
Şekil 16. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscun Album L.(Ökse Otu)</i> yaprak kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafığı. ....	42
Şekil 17. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscun Album L. (Ökse Otu)</i> yaprak kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafığı. ....	42

Şekil 18. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscum Album L.</i> (Ökse Otu) yaprak kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği. ....	43
Şekil 19. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscum Album L.</i> (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği. ....	43
Şekil 20. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscum Album L.</i> (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği. ....	44
Şekil 21. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine <i>Viscum Album L.</i> (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği. ....	44
Şekil 22. Caffeic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	45
Şekil 23. Chlorogenic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	46
Şekil 24. Cyanidin-3-o-glucoside bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	46
Şekil 25. Ferulic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	47
Şekil 26. Fumaric Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	47
Şekil 27. Isorhamnetin bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	48
Şekil 28. Keracyanin Chloride bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	48
Şekil 29. Myricetin bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	49
Şekil 30. Naringenin bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ). ....	49

<i>Şekil 31.</i> p-Coumaric Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	50
<i>Şekil 32.</i> Quercetin bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	50
<i>Şekil 33.</i> Quinic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	51
<i>Şekil 34.</i> Rosmarinic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	51
<i>Şekil 35.</i> Sinapic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	52
<i>Şekil 36.</i> Taxifolin bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	52
<i>Şekil 37.</i> Vanillic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).....	53

## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>3D</b>	: Üç boyut
<b>AGE</b>	: İleri Glikasyon Ürünleri
<b>AI</b>	: Yapay Zekâ
<b>AR</b>	: Aldo Redüktaz Enzimi
<b>ARİ</b>	: Aldo redüktaz inhibitörü
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>Cys</b>	: Sistein
<b>d</b>	: Işık Yolu
<b>DL-GA</b>	: DL-Gliseraldehit
<b>DM</b>	: Diabetes mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>E.C.</b>	: Enzim Kod Numarası
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetikasit
<b><math>\epsilon</math></b>	: Ekstinsiyon Katsayısı
<b>Gr</b>	: Gram
<b>GTP</b>	: Guanozin Trifosfat
<b>HTS</b>	: Yüksek Verimli Tarama
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>Kb</b>	: Kilobaz
<b>K<sub>a</sub></b>	: Bağlanma Sabiti
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>Ki</b>	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
<b>Mg</b>	: Miligram
<b>mg/dl</b>	: Miligram/Desilitre
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mmol/L</b>	: Milimolar/Litre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>Nox</b>	: NADH-oksidad

<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>PMSF</b>	: Fenil Metil Sülfonil Florid
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asid
<b>ROS</b>	: Serbest oksijen radikalleri
<b>SAR</b>	: Yapı aktivite ilişkileri
<b>SBDD</b>	: Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı
<b>SHD</b>	: Sorbitol dehidrogenaz
<b>Trp</b>	: Triptofan
<b>Tyr</b>	: Tirozin
<b>v(L)</b>	: Enzim Hacmi
<b>V(L)</b>	: Total Hacim
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
<b>A</b>	: Alfa
<b>B</b>	: Beta
<b><math>\Delta A</math></b>	: Test Tüpündeki absorbands değeri
<b><math>\Delta G_L</math></b>	: Gibbs Serbest Enerjisi
<b><math>\Delta t</math></b>	: Zaman (Dakika)

## BİRİNCİ BÖLÜM

### Giriş

Canlı sistemdeki hareketlerin en temel özelliği beklemeye tahammüllerinin olmamasıdır. Örneğin; bir telefon, kamera veya fotoğraf makinesi çektikleri iki fotoğraf arasındaki netleme süresi ne kadar kısa olursa olsun, belirli bir süre beklemek zorunda kalır. Fakat canlı sisteminde görme reaksiyonu anında beyne iletilmek durumundadır. Bu nedenle, bu reflekslerin canlılarda anında gerçekleşmesi kimyasal reaksiyonlardan kaynaklandığının en açık kanıtıdır. Bu sebeple canlı mekanizmasındaki kimyasal reaksiyonların işleyişi seçicilik ve verimlilik prensiplerine uygun olmalıdır. Canlı sistemdeki reaksiyonlar gerçekleşmesi için enerji gereklidir ve bu enerjiyi çevrelerinden temin ederler. Çoğunlukla canlılar enerji kaynağı olarak sükrozu kullanırlar. Sükroz, ortamda oksijen bulunması durumunda reaksiyona girerek CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya parçalanır ve neticede serbest enerji açığa çıkar. Bu reaksiyon egzergonik bir süreç olsada, sükroz yıllarca CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya ayrışmadan da depo edilmektedir. Ancak bu reaksiyon, termodinamik açıdan uygun olmasına rağmen süreç oldukça yavaş ilerler. Ancak insan ve birçok canlı organizmasının sükrozu ya da diğer karbonhidratları tüketmek suretiyle saniyeler içerisinde kimyasal enerji elde ederler. Bu farklılık, katalizörlerin varlığından kaynaklanır. Katalizörlerin yokluğunda, kimyasal reaksiyonların gerçekleşme hızları yaşamla uygun bir şekilde benzerlik göstermez. Katalizörler, biyolojik sistemlerde özelleşmiş polimer yapıda bileşiklerdir ve bu tür katalizörlere enzim adı verilir (Gürdöl, & Ademoğlu, 2010).

Biyolojik katalizörler olan enzimler, canlı sistemlerinde kimyasal reaksiyonların hızını artırarak %100 verimlilikle çalışır ve hiçbir yan ürün oluşturmazlar. Enzimlerin protein yapısında bulunması, DNA tarafından kodlanmaları nedeniyle, bir hücre içerisinde meydana gelen olayların tümü DNA seviyesinde kontrol edilerek düzenlenir. Bu bakımdan, enzimlerin yalnızca katalizör olarak nitelenmesi yetersiz kalır; çünkü enzimler, aynı zamanda hücre içi olayları düzenleme ve kontrol etme işlevlerine de sahiptir. Bir hücreyi diğer hücrelerden ayıran özellikler DNA tarafından aktarılır ve DNA bu bilgileri hücrelere aktarırken enzimler çok önemli rol oynar (Keha, & Küfrevioğlu, 2009).

Dikkate değer ve son derece özelleşmiş proteinler olan enzimler, yapay ve organik olmayan katalizörlere kıyasla daha kuvvetli katalizleme özelliğine sahiptirler

Enzimlerin birçoğu, substratlarına yüksek özgülük gösterir ve kimyasal tepkimeleri hızlandırır. Optimum pH ve sıcaklık koşullarında aktif bir şekilde görev yaparlar. Oysa ki; biyolojik olmayan katalizörlerin sadece birkaçı bu özelliklerin tümüne sahiptir. Enzimler, besinsel moleküllerin parçalandığı yüzlerce tepkime basamağını düzenli tepkime dizileriyle katalizler. Böylece basit öncüllerden biyolojik makro moleküllerin üretimine katkı sağlar, kimyasal enerjiyi korur ve dönüştürürler (Lehninger, *vd.* 2005).

Bazı enzimlerin faaliyetlerini yerine getirebilmesi, protein yapısında olmayan kofaktörlerin varlığına bağlıdır. Kofaktörler, bir koenzim olabileceği gibi metal iyonlarından da oluşabilir. Aktivite göstermek için, kimi enzimler hem metal iyonlarına hem de koenzimlere ihtiyaç duyarlar. Örneğin, B vitamini türevleri ya da  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  gibi metal iyonları gibi koenzimler, enzimler tarafından sıkça kullanılır.  $FAD^+$  koenzimi, riboflavin içerirken  $NAD^+$  koenzimi niyasin içerir. Apoenzim, holoenzimin protein bileşenini temsil ederken, holoenzim enzimle birlikte koenzimi içeren kompleks yapısını ifade eder. Apoenzim, biyolojik aktivite göstermek için uygun bir kofaktöre ihtiyaç duyar. Koenzimler, enzimlerin yapısına prostetik ve nonprostetik biçimde bağlanabilirler. Prostetik grup, enzimden kopmayan ve sıkı bir şekilde enzimin yapısına bağlı olan bir koenzimi ifade eder. Biotin, karboksilaz enziminin üç boyutlu yapısıyla sıkıca ilişkili olan örneklerden birisidir. Substratlar, enzimlerin üzerine etki ederek ürüne dönüştürdükleri bileşiklerdir. Enzimler genellikle belirli bir substrat ile etkileşime girerler, özellikle canlı organizma koşullarında yalnızca belirli tipteki kimyasal reaksiyonları katalizlerler ve bu özellikleriyle son derece spesifiklerdir. Hücre içerisinde çeşitli bölgelerde birçok enzim ifade edilir. (Harvey, *vd.* 2007).

Kimi enzimler, etki ettikleri substrat adlarından sonra ‘-az’ eki getirilerek (DNA polimeraz, lipaz vb.), kimi enzimler ise katalizledikleri reaksiyonu aydınlatacak şekilde (sorbitol dehidrogenaz vb.) ve bir kısım enzimde ilk keşfedenlerin verdiği isimlerle adlandırılırlar. Fakat bu tanımlamalar enzimlerin genel özellikleri ile ilgili eksik bilgi içerdiğinden 1956 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komitesi (IUBMB-EC) enzimler sistemli bir şekilde adlandırılması konusunda çeşitli çalışmalara başlamış ve bu çalışmalar sonucunda bütün enzimler için sırasıyla enzimin ana sınıfını, enzimin alt sınıfını, enzimin alt-alt sınıfını ve bulunduğu sınıftaki seri numarasını temsil edecek şekilde enzim kod numarası (E.C.) belirlenmiştir (Lehninger, *vd.* 2005; Keba, & Küfrevioğlu, 2009).

Enzimler katalizledikleri tepkimelere göre altı ana gruba ayrılır. Bunlar; Oksidoredüktazlar, Transfrazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, İzomerazlar ve Ligazlar olarak adlandırılır (Keha, & Küfrevioğlu, 2009).

## **Diabetes Mellitus**

Hipeglisemi (yüksek kan şekeri) ile belirgin hale gelen diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun kısmen olmadığı ya da tamamen olmadığı durumlarda gelişen bir hastalıktır. DM'nin gelişim sürecinde, insülin eksikliğinin rolü olduğu gibi insüline karşı artan direncin de önemli bir rolü bulunmaktadır. Protein, karbonhidrat ve lipit mekanizmasında meydana gelen DM'nin olumsuz etkileri insan mekanizmasında önemli bir şekilde hissedilmektedir (Hasselbaink, *vd.* 2003; Abou-Seif, *vd.* 2004). Tip1 diabet ve Tip2 diabet olmak üzere temelde 2 tip diabet mevcuttur.

Genellikle çocuk yaşlarda görülen tip 1 DM, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin, gerek otoimmün gerekse otoimmün olmayan sebeplere bağlı olarak tahribata uğraması neticesinde ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Bu durum insülopeni ve hipeglisemi ile karakterizedir. (Alemzadeh, *vd.* 2004; Fiallo-Scharer, *vd.* 2004). Etiyolojisinde, kalıtsal, çevre kaynaklı ve otoimmün faktörlerin önemli bir rol oynadığı düşünülen Tip 1 diabet, mikroorganizmalar, somatosensoryel uyarılar, tensiyon gibi dış faktörler ve kalıtsal yatkınlık, insülin hormonu üreten pankreastaki beta hücrelerine otoimmün saldırı başlatması neticesinde tetiklenebilir. Bu süreçte oluşan hasarın anormal görünümüne "insülitis" denir. (Haller, *vd.* 2005).

Tip 2 diabetin gelişiminde, kas ve yağ dokusu gibi çevresel bölge dokularında, insüline bağımlı olma durumundan kaynaklanan insülin yetersizliği ve insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasının önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. (Patricia, *vd.* 2003). İnsülin direnci, Tip 2 diabete bağlı oluşan komplikasyonların başlıca nedenidir (Gilligan, & Spector, 1984). İnsülin, plazmadaki glukozun kas ve yağ dokusu gibi okside edilerek enerji üretiminde kullanılmasını veya glikojen şeklinde depolanmasını sağlamaktadır. İnsülin, karaciğerdeki glukoneogenez ve glikojenolizi baskı altına alarak hepatik glukoz üretiminin de önüne geçer (Donkin, *vd.* 1997).

İnsülin direncine paralel olarak başlayan periferik dokulardaki direnç ile birlikte insüline bağımlı glukoz kullanımı, yağ ve kas dokularında bariz bir şekilde azalır ve beraberinde karaciğerdeki glukoz supresyonu da bozular. Ayrıca insülin direnci, plazmadaki

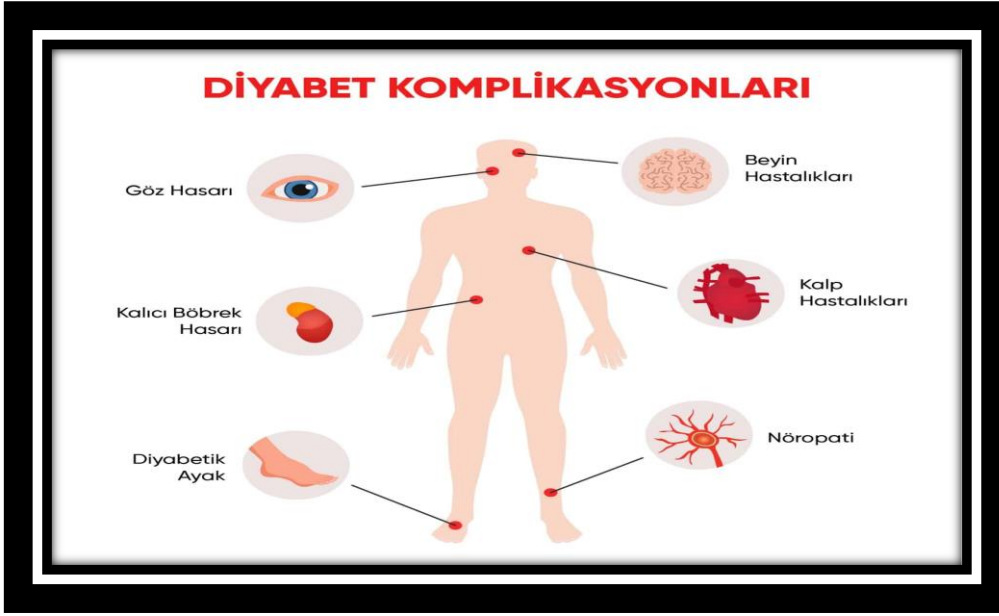
glukoz düzeyinin artmasını engelleyebilmek amacıyla pankreasın beta hücrelerini her zamankinden daha çok insülin üretmi yapar. Aşırı çalışmaya bağlı olarak pankreasın beta hücrelerinde zamanla fonksiyon kaybı meydana gelir. Hücrelerde meydana gelen bu fonksiyon kaybı ise insülin sentezinin azalmasına ve tip 2 diabetin ortaya çıkmasına neden olur (Ferrannini, *vd.* 1987; Hollenbeck, & Reaven, 1987).

Tip 2 diabetin eşlik ettiği hepatik glukoz supresyonunun bozulması sonucu, plazma glukoz düzeyi yükselir ve bu durumda karaciğerde glukoneogenez ve glikojenolizin üzerindeki baskının kalkmasıyla birlikte hepatik glukoz üretimi de beraberinde artar. (Mithieux, *vd.* 1996). Bu duruma bağlı olarak gelişen hipegliseminin, damar içi tabaka fonksiyon kaybına sebebiyet verdiği düşünülmektedir. (Hsueh, & Law, 1998; Jiang, *vd.*1999).

Tip 2 diabetin ortaya çıkmasının bir başka nedeni ise pankreasta amiloid plakların oluşmasına bağlı olarak  $\beta$  hücre sayısındaki azalma neticesinde meydana gelen yetersiz insülin sekresyonudur (Rhodes, 2005). Genetik faktörler, yaşlılık, Obezite, stres ve hareketsiz yaşam şekli gibi çeşitli risk faktörlerinin ortaya çıkmasında önemli bir etkisinin olduğu düşünülen tip 2 diabete aynı zamanda erişkin başlangıçlı diabet adı verilmektedir (Sacks, 2005). DSÖ'nün 2010 yılına ait verilerine göre dünya genelindeki yüzellibir milyon diabet hastasının yaklaşık %97'sinin Tip 2 diabet olduğu bildirilmiştir (Amos, *vd.* 2010).

Diabet kaynaklı sorunlar, kandaki glukoz düzeyinin artmasına paralel olarak aktivitesi artan bazı metabolik yolların birbirini etkilemesi sonucunda meydana gelmektedir. Bahsi geçen bu metabolizmadaki yolların ilki Sorbitol yoludur. İkinci metabolik yolak, Glikoz oksidasyonudur. Üçüncüsü, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu olup sonuncusuda enzimatik olmayan glikasyon ile ileri glikasyon ürünleri (AGE) oluşumudur (UKPDS Research Group, 1998; Chappey, *vd.* 1997; Temelkova-Kurktschiev, *vd.* 2000; Brownlee, 2001; Zimmet, & Alberti, 2001; Lipinski, 2001; Ostenson, 2001; Jakus, & Rietbrock, 2004; Yamagishi, & Takeuchi, 2004; Oates, 2008).

Diabet kaynaklı sorunlar, iki ana kategoride değerlendirilir: mikroanjyopatik ve makroanjyopatik komplikasyonlar. DM'nin mikroanjyopatik komplikasyonları arasında nöropati, retinopati ve nefropati yer alırken, makroanjyopatik komplikasyonları arasında ekstremiteler damar, koroner arter ve beyin damar hastalıkları bulunmaktadır. (Kurt, *vd.* 2004).



Şekil 1. Diabetik komplikasyonlar(<https://tetralaboratuvar.com/diabetin-komplikasyonlari> ).

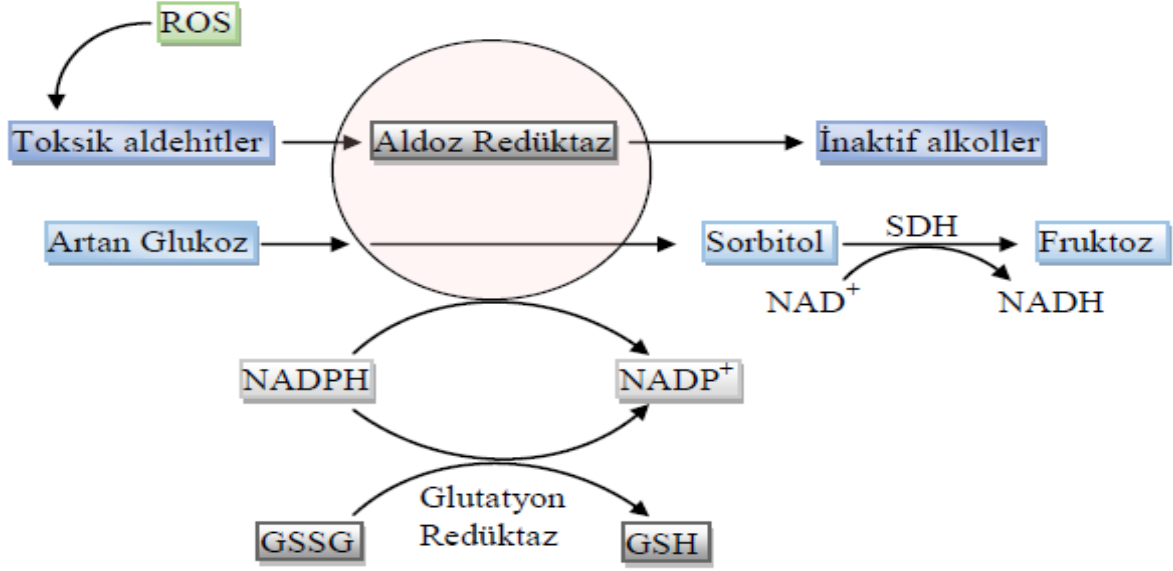
### Poliyol Yolağı (Sorbitol Yolağı)

Diabet kaynaklı sorunların gelişimi açısından etkili olan metabolik yollardan birisi de poliyol yoludur. Hipeglisemi durumunda aktif hale geçen ve iki adımda gerçekleşen glikoliz metabolizmasının bu ufak metabolik yolağında aldoz redüktaz (AR) ile sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimi görevlidir (Harvey, *vd.* 2007). sorbitol yolunun birinci ve hız kısıtlayıcı enzimi AR; NADPH'dan sağladığı elektronları glukozu vererek, sorbitol oluşumuna sebep olurken, yolağının diğer enzimi SDH ise kofaktör  $NAD^+$ 'in indirgenmesi ile birlikte sorbitolün fruktoza yükseltgenmesini katalizler (Hers, 1956; Kao, *vd.* 1999).

Normalde hücrelere giren glukoz, heksokinaz enzimi etkisiyle fosforillenerek glukoz-6-fosfat oluşturarak glikolize dahil olur. Glikoliz sonucunda oluşan ürünler, oksijen varlığında elektron transport zinciri üzerinden krebs çemberine girerek enerjiye dönüşür. Oksijen yokluğunda ise glikoliz ürünleri laktata dönüşür. Poliyol yolu, kandaki glukoz derişimi istenilen seviyelerde olduğunda aktif olan metabolik bir yol değildir. (Cameron, & Cotter, 1996).

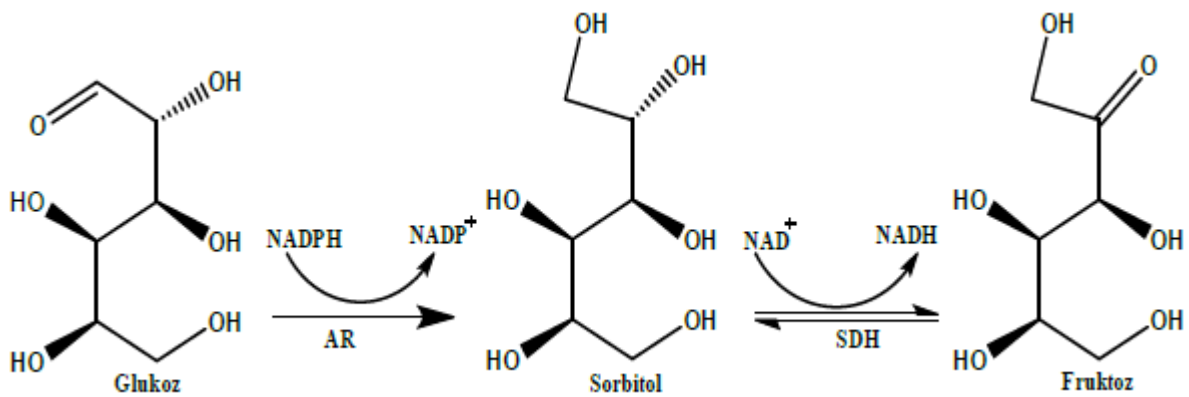
Retina, lens, karaciğer, böbrek, pankreas adacıkları, sinirler, eritrosit, beyin, kapiller damarlar ve aort gibi dokular, glukozun hücrelere girişi bakımından ortak özelliğe sahiptir. Bahsi geçen dokular, insüline bağımlı olmaksızın glukozu hücre içine alabilirler. Hücre içerisindeki glukoz derişimi ile kan glukoz derişimi birbirine bağımlı şekilde değişebilir. (Cameron, & Cotter, 1996).

Hipeglisemi durumunda, intrasellüler glukoz seviyesi yükselir ve bu nedenle heksokinaz doymun hale gelir. Bu durumda, glukozu daha düşük afinitesi olan AR enzimi aktif hale geçerek poliyol yolağını etkinleştirir. (Cameron, & Cotter, 1996). Poliyol yolu etkinliğinin fizyolojik önemi, diabetes mellitus sonucu oluşan katarakt, retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz gibi hipeglisemi kaynaklı sorunların oluştuğu dokularda hala tam olarak anlaşılammıştır. (Yenigün, & Altuntaş, 2001).



Şekil 2. Hipeglisemi ve poliyol yolu arasındaki ilişki (Brownlee, 2005).

Diabetik hipeglisemi durumunda aktifleşen hücre içinde sorbitolün ve fruktozun birikmesine yol açan sorbitol yolu, hücresel toksisiteyi açıklamada en önemli mekanizmalardan birisidir.



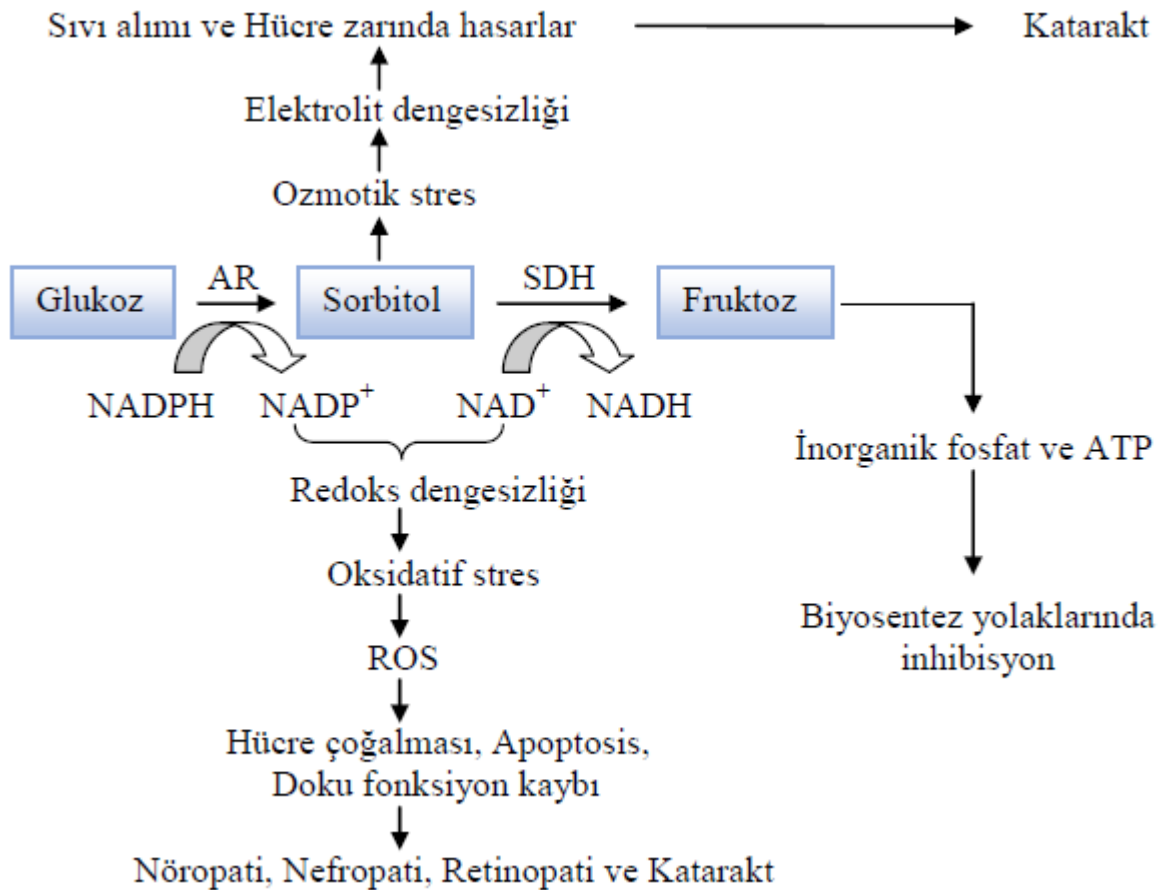
Şekil 3. Poliyol yolağı (Sorbitol yolağı) (Alım, & Beydemir, 2012).

Aldoz Redüktaz enzimi, karbonil gruplarını alkol gruplarına indirgenmesini katalizleyen NADPH bağımlı bir enzimdir. Ayrıca poliyol yolağının ilk ve reaksiyon hızını belirleyen enzimidir. Glukoza olan afinitesi düşük olan aldoz redüktaz enzimi, hücre içi

glukoz derişimi fizyolojik düzeylerde olduğu müddetçe aktif değildir. Ancak, hücre içi glukoz derişimi fizyolojik düzey eşiğini aştığında, ortaya çıkan hipeglisemi AR enzimini aktive eder. Hipeglisemi durumunda AR enzim aktivitesinde artma olurken, SDH enzim aktivitesinde azalma meydana gelir. Bu nedenle sorbitolün dokulardaki fruktoza dönüşme hızı azalır.

Sorbitol, hücre membranı dışına çıkamayan ve metabolik kullanımı olmayan bir şeker alkolüdür. Bu nedenle dokularda birikerek ozmotik etkiye sebebiyet verir ve hücre içerisine daha fazla su girişine neden olur.

Sorbitol, dokularda birikerek hücre ödemine yol açtığı için dokularda toksik etkiye sebep olur. Bu durum, kalp hastalığı, nöropati, retinopati ve nefropati gibi komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı değerlendirilmektedir.(Karasu, *vd.* 1990; Bukan, *vd.* 2004).

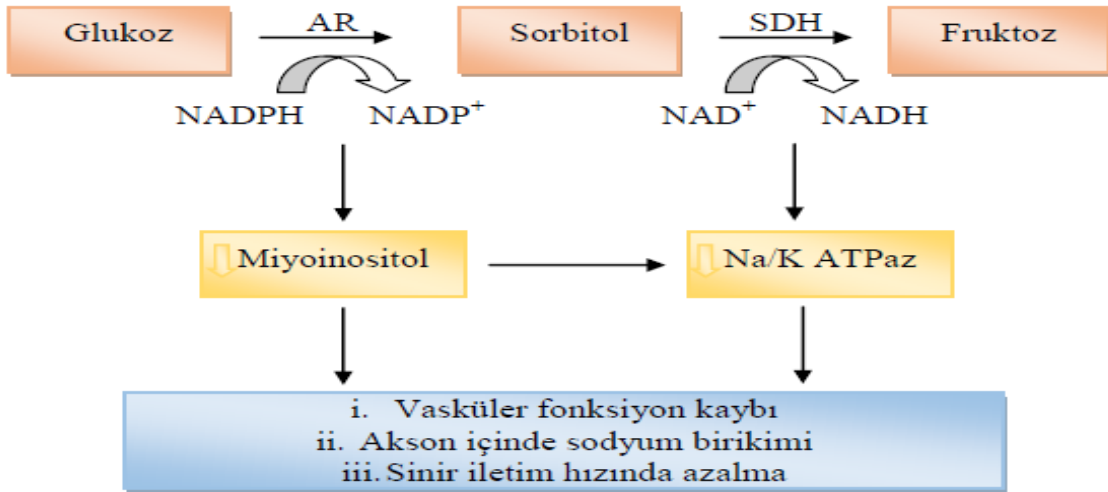


Şekil 4. AR enzimi ile diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişki (Srivastava, *vd.* 2005).

Hipeglisemi durumunda hücrelerde biriken sorbitolün sebep olduğu ozmotik etki, hücreden hücreye farklılık gösterir. Sorbitol kaynaklı ozmotik etki, daha çok böbrek bazal membranları ve sinir vazo nervorumlarına zarar vermektedir (Yenigün, & Altuntaş, 2001).

Miyoinositol taşıyıcıları için glukoz rekabetçi bir inhibitördür. Piridin nükleotitlerinin redoks durumunu sorbitolün sebep olduğu ozmotik etki ile değişir. Buna bağlı olarak NADH/NAD<sup>+</sup> oranı ile birlikte protein kinaz C aktivitesini artırır. Aksine periferik sinir hücresinde sentezlenen miyoinositol miktarı ise azalır. Gerek hücreye giren glukoz gerekse miyoinositol Na<sup>+</sup>'a bağımlı olduklarından yarışır. Bu sebeple kan glukoz oranındaki artış Na-K ATPaz enziminin aktivitesini azalttığı içindir ki Na<sup>+</sup> bağımlı miyoinositol miktarı düşer. Sinir hücrelerindeki miyoinositol miktarındaki azalma, anormal fosfoinositidlerin oluşumuna yol açar ve Na-K ATPaz enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. Miyoinositol transportu Na-K ATPaz enzime bağımlı olduğu için azalmış miyoinositolün reabsorpsiyonu güç olur. Ayrıca, aktivitesi azalan Na-K ATPaz enzimi, sinir içi Na birikmesine neden olur. Böylece periferik sinirlerde sinir iletim hızı azalır (Greene, *vd.* 1987, 1992; Kilo, *vd.* 2000; Bozdemir, 2001; Dinçer, *vd.* 2002).

Diabetik retinopati, retinanın beslenmesini sağlayan kan damarlarında oluşan tahribat sebebi ile ortaya çıkan bir durumdur. Bu durum, gözyaşı üretiminde ve kornea hassasiyetinde azalmaya, kornea damarlarında değişikliklere ve yaraların yavaş iyileşmesine neden olabilir. Ayrıca, yükselen glukoz seviyeleri, AR enzim aktivitesinde artışa yol açarak lens dokusunun opaklaşmasına ve diabetik katarakt oluşumuna katkıda bulunur. Bu tür hasarlar ilerledikçe, körlük gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilir. (Davidson, 1991; Kubo, *vd.* 2004; Chibber, *vd.* 2007; Kyselova, *vd.* 2004).



Şekil 5. Poliyol yolu ile sinir hücresi ilişkisi (Bhadada, *vd.* 2001).

Diabetik komplikasyonlar sonucunda ortaya çıkan bir başka durum ise diabetik nefropatidir. Böbreki besleyen mikrovasküler damar sistemlerinde oluşan hasarlar sonucunda

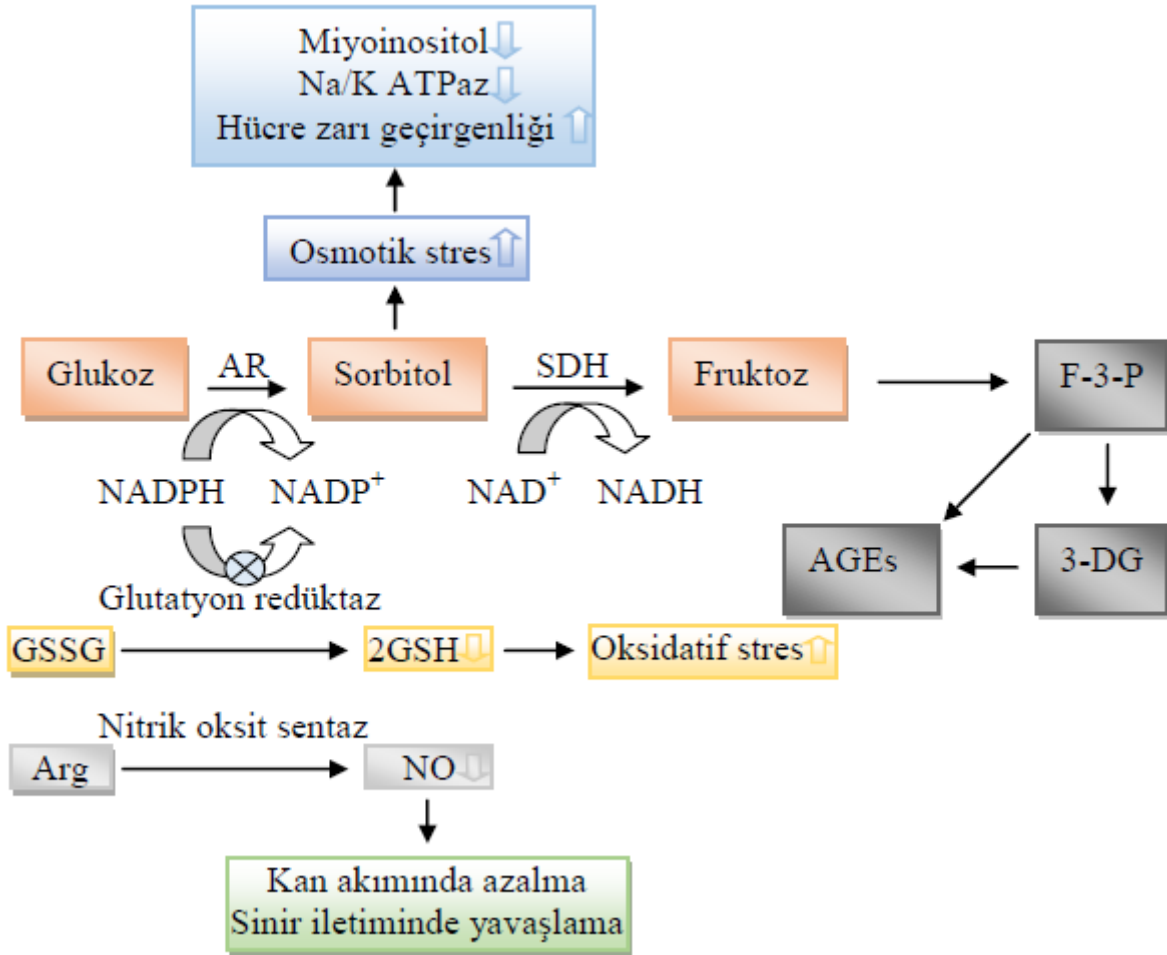
ortaya çıkan nefropatinin ileri boyutlara erişmesi neticesinde böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır (Kimmelstiel, & Wilson, 1936; Lehmann, & Schleicher, 2000; Dunlop, 2000). Nefropati, diabet kaynaklı komplikasyonların sebep olduğu ölümlerin %10'undan sorumlu tutulmaktadır. Diabetle paralel olarak nefropati hastalığının da belirli bir artış görülmektedir (Humphrey, *vd.* 1989; Forsblom, *vd.* 1998). Diabetik nefropati hastalığının gelişmesi ve ilerlemesi, hipoglisemi ile birlikte aktifleşen sorbitol yolağının aktive olması ile ilişkilidir. (Kikkawa, *vd.* 2003).

Poliyol yolu ile miyokardiyal glukoz metabolizması arasındaki ilişkinin araştırıldığı bazı çalışmalarda, iskemi sırasında kardiyak aldoz redüktaz aktivasyonunda artma belirlenmiştir (Ramasamy, *vd.* 1999; Hwang, *vd.* 2002). İskemi sırasında, poliyol yolunun etkisiyle NADH/NAD<sup>+</sup> oranı miyokardiyumda artar. bu durumda glikoliz ile ATP üretiminin azalmasına yol açar ve iskemik hasar meydana gelir. Bu süreçte, AR enziminin inhibe edilmesi, iskemik hasarı azaltır ve kalbin korunmasında önemli bir rol oynar. (Williamson, *vd.* 1993).

Poliyol yolunun diğer enzimi olan SDH enziminin aktifleşmesi sonucu NADH oluşur. Aktif hale gelen NADH-oksidadaz (Nox) enzimide serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açar (Tefamariam, 1994; Morre, *vd.* 2000). Serbest oksijen radikalleri, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimini (GAPDH) inhibisyonuna sebebiyet vererek, sorbitol yolağına yönelen glukoz miktarını artırır. Buna bağlı olarak aldoz redüktaz enzim aktivitesi artar (Stevens, *vd.* 2000). Aktif hale gelmek için NADPH'a ihtiyaç duyan AR enzimi, hücre içi NADPH tüketiminde artışa neden olur. Aldoza redüktaz gibi NADPH bağımlı bir başka enzim ise glutatyon redüktaz (GR)'dir. GR; yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) redükte eder. Aldoza redüktazın NADPH'a olan afinitesi, GR enziminin NADPH'a olan afinitesinden daha fazladır. Bu yüzden artan AR aktivitesine bağlı olarak, NADPH tüketiminde ve GSH üretiminde azalma olur. Hücre içerisinde antioksidan olarak görev yapan GSH üretimindeki düşme, hücrelerin antioksidan gücünü azaltır ve oksidasyona bağlı ortaya çıkan olumsuzluklar karşısında tepkisini zayıflatarak serbest radikal zararına sebebiyet verir. Poliyol yolağı, bu mekanizma üzerinden antioksidan savunma sistemine zarar verir (Yeh, & Ashton, 1990; Giugliano, *vd.* 1996; Nishimura, 1998; Lee, & Chung, 1999; Nishikawa, *vd.* 2000; Maritim, *vd.* 2003).

Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi de, AR ve GR gibi NADPH bağımlı enzimdir. Hipoglisemi ile birlikte aktif hale gelen poliyol yolu kaynaklı hücre içi NADPH miktarının azalmasına bağlı olarak, hem GSH üretimini hem de NO sentezini de olumsuz etkiler. Aynı

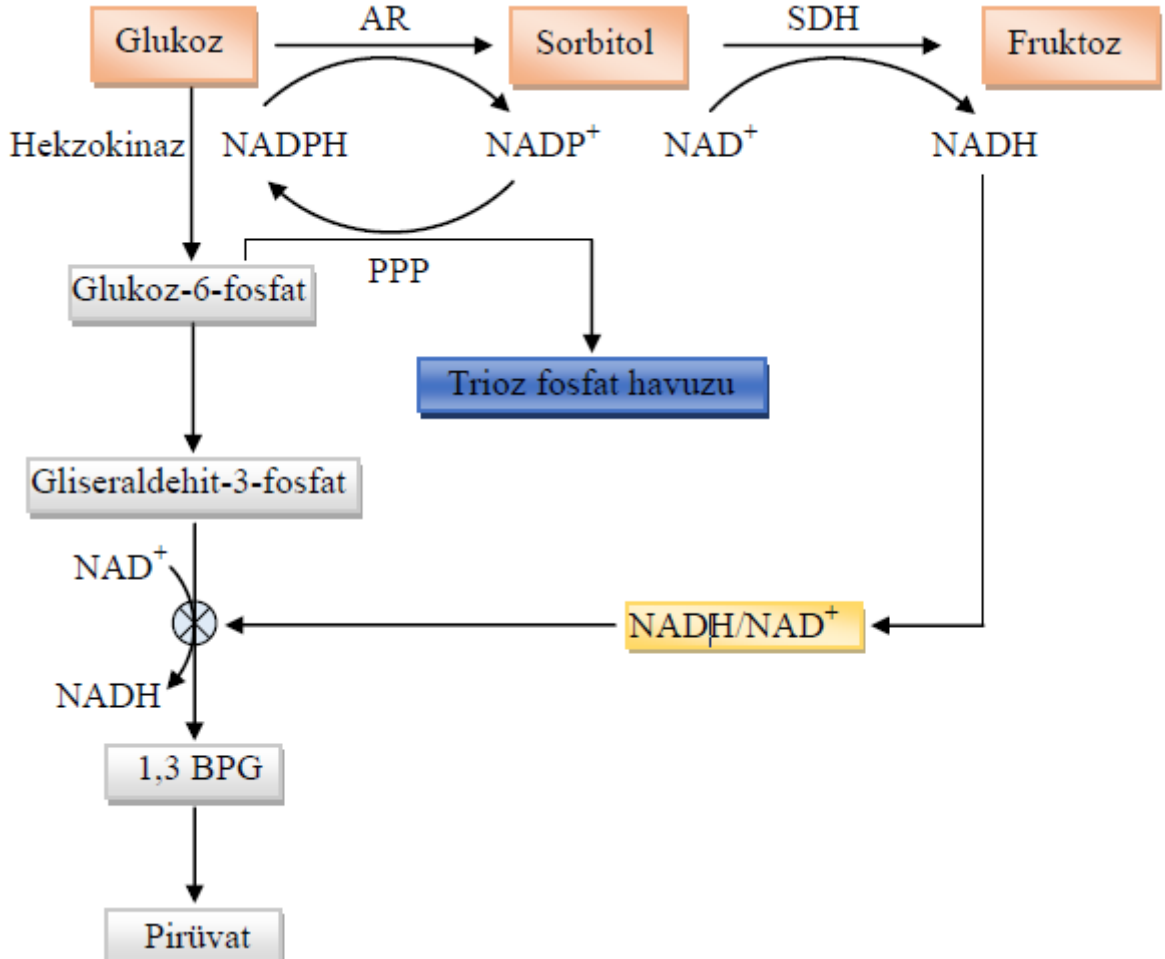
zamanda azalan NADPH, arjininden NO oluşumunu katalize eden NOS'un aktivasyonundaki azalmadan kaynaklanan damar içi tabakadaki NO sentezini azalmasına da sebebiyet verir Oksidatif stres ile ilişkili NO sentezindeki azalma ise ateroskleroza neden olur (Tsfamariam, 1994; Kurowska, 2002).



Şekil 6. Poliyol yolağının aktivasyonu (Gleissner, vd. 2007).

Ayrıca sorbitolün fruktoza yükseltgenmesi sonucu NADH miktarındaki artmaya bağlı olarak glisaldehit-3-fosfat-dehidrogenaz (GAPDH) enziminin inhibisyonu ile birlikte Trioz-fosfat izomeraz enziminin aktivasyonu gerçekleşir. Trioz-fosfat izomeraz enzimi, gliseraldehit-3- fosfatı dihidroksiaseton-fosfata (DHAP) dönüştürür. NADH bağımlı DHAP'ın indirgenmesi sonucu oluşan diaçilgliserol (DAG) ise sorbitol yolunun bir aktivatörü olan protein kinaz C (PKC) enzimini aktifleştirir. Diabetik komplikasyonların ortaya çıkması ile PKC yolunun aktif hale gelmesi arasında bir ilişki söz konusudur (Williamson, vd. 1993; Xia, vd. 1994; Baynes, & Thorpe, 1999; Dunlop, 2000; Garcia, vd. 2001; Setter, vd. 2003).

Ayrıca sorbitol yolunun son ürünü olarak ortaya çıkan fruktoz ise fruktoz-3-fosfat (F3P) ve 3-deoksiglukoza (3DG) metabolik olarak çevrilir. Oluşan früktoz-3-fosfat ve 3-deoksiglukoz bileşikleri, glukozdan çok daha kuvvetli, enzimatik olmayan glikasyon prekürsörleridir. Ayrıca, lens, eritrosit, böbrek, beyin ve sinir gibi insüline bağlı olmayan dokularda hipeglisemi durumunda glukozun, enzimatik olmayan reaksiyonlarla proteinlere bağlanması sonucu gerçekleşen kontrolsüz glikasyon tepkimeleri sonucunda ortaya çıkan ürünlerin glikooksidasyonu ile glikasyon ürünleri (AGEs) oluşur. AGE bileşiklerinin, proteinlerin gerek form ve gerekse işlevlerinde meydana gelen değişime bağlı diabetik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli rolü vardır (Szwergold, *vd.* 1990; Grandhee, & Monnier, 1991; Brownlee, 1992; Mueckler, 1994; Lal, *vd.* 1995; Hamada, *vd.* 1996; Hamada, *vd.* 2000; Jakus, & Rietbrock, 2004).



Şekil 7. Poliyol yolunun pentoz fosfat yoluna ve glikolize etkisi (Dunlop, 2000).

AR enzimini inhibe edebilecek bileşikler (ARI), diabet kaynaklı sorbitol birikimesinin ve buna bağlı gelişebilecek diabetik komplikasyonların önüne geçebilir. Şayet glukoz düzenlemesi yapılarak hipeglisemi durumu ortadan kaldırılamaz ise geri dönüşümü olmayan

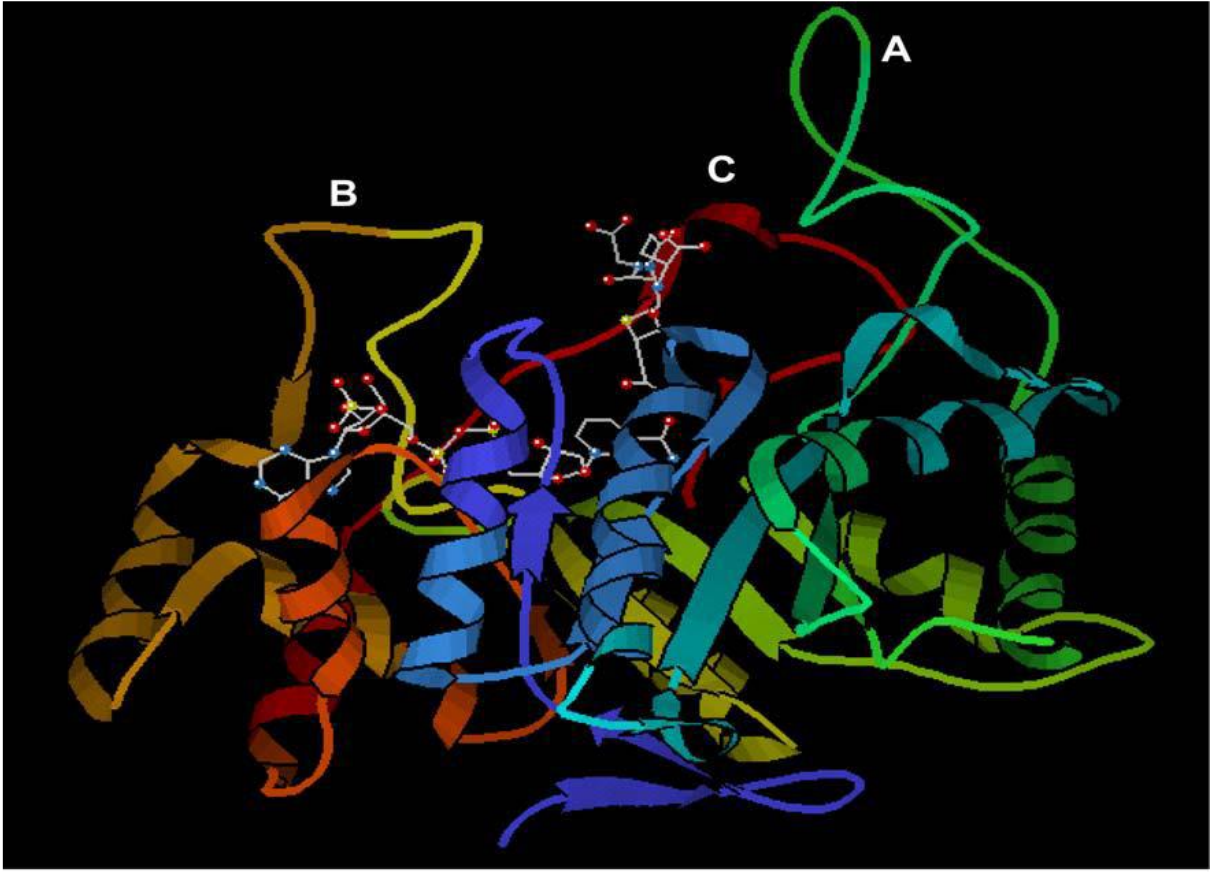
retinopati, nöropati, nefropati gibi diabetik komplikasyonların oluşumunun önüne geçilemez (Yenigün, & Altuntaş, 2001).

### **Aldoz Redüktaz**

Aldo-keto redüktazlar (AKR) oksidoredüktaz enzim sınıfında yer alırlar. AKR enzimleri NADPH'ı kofaktör olarak kullanırlar. AKR enzimleri aldehitleri primer alkollere ve ketonlarıda sekonder alkollere dönüştürürler. Bu redüksüyon sonucunda oluşan alkoller, sülfat veya glukuronidlere tutunarak vücuttan atılırlar. Sonuç olarak AKR enzimlerinin vücuttaki eliminasyon mekanizmasında önemli bir yeri vardır. (Hyndman, *vd.* 2003; Penning, 2004).

Aldo-keto oksidoredüktazların bir üyesi olan AR enziminin kısa adı, ALR2 'dir. AR'nin enzim kodu (E.C.1.1.1.21)'dir. Enzim kodundaki ilk (1) rakamı H, O veya elektronların bir substratlar arası aktarımını katalizleyen enzimlerin numarasıdır. İkinci (1) rakamı ise proton verici olan CH-OH grubunun üyesi olduğunu Üçüncü (1) rakamda reaksiyonunun NADPH'a bağımlı olduğunu ifade eder. (Flynn, 1982; Jez, *vd.* 1997).

Hiperglisimi durumunda aktif hale gelen AR enzimi, diabet kaynaklı sorunların ortaya çıkmasında önemli rol oynar. 315 aminoasit diziliminden oluşan AR'nin molekül kütlesi yaklaşık 36 kDa'dur. Monomerik yapıda ve stozolik bir enzimdir. (Yabe-Nishimura, 1998; Kumar, & Reddy, 2007).



Şekil 8. AR enziminin kristal yapısı (Barski, vd. 2008).

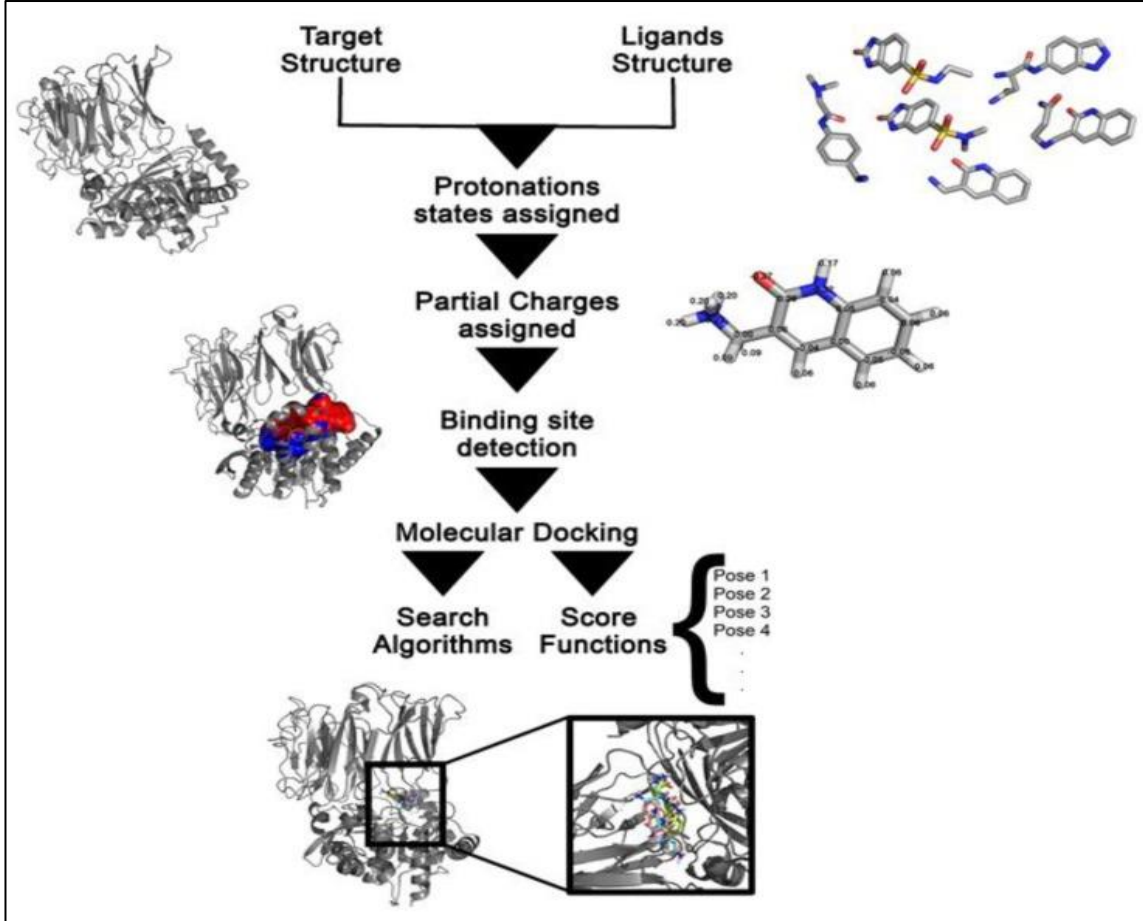
### Moleküler Docking Yöntemi

Moleküler Docking yöntemi, moleküllerin bir makromoleküler hedefin bağlanma bölgesine uyumunu ve yönelimini analiz eden bir bilgisayarlı görüntü elde etme yöntemidir (Torres, vd. 2019). Bu işlem, bağlanma bölgesini aramak ve ligandı belirli bir 3 boyutlu (3D) alana "uydurmak" için algoritmalar kullanır. Farklı algoritmalar, puanlama işlevlerine göre sıralanan olası görüntüler üretmek için farklı ligandları karşılaştırmak için kullanılır. Moleküler docking, grafik kullanıcı arayüzleri aracılığıyla bilgisayar programlama dillerine ihtiyaç duymadan kolayca gerçekleştirilebilir ve akademik kullanım için ücretsiz olarak sunulan yazılımlar mevcuttur.

Pratik olarak, moleküler docking gerçekleştirilmeden önce, ilgilenilen proteinin bir bilgisayar dosyası olması gerekmektedir (Schweiker, & Levonis, 2020). Bu yöntem, olası bileşik tasarımı hakkında değerli bilgiler sağlayarak ilaç keşfi ve geliştirme süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır.

Moleküler docking hesaplamasının ilk adımı çoğunlukla biyolojik bir makromolekülden (protein, DNA veya RNA gibi) çıkarak hedeflenen yapının elde

edilmesidir. Moleküler docking, bir reseptörün bağlanma bölgesindeki kısıtlamaları dikkate alarak, bir ligandın yapısını doğru bir şekilde tahmin etmeyi ve bağlanma gücünü doğru bir şekilde değerlendirmeyi amaçlamaktadır (Torres, *vd.* 2019). Bu yöntem, ilaç tasarımı ve keşfi gibi alanlarda, ligandların potansiyel etkileşimlerini anlamak ve uygun moleküllerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 9. Moleküler docking hesaplamalarının genel iş akışı (Torres, *vd.* 2019).

Moleküler docking yaklaşımları genellikle hedef ve ligandların 3D yapılarını elde ederek başlar. Bu yapılar daha sonra protonasyon durumları ve kısmi yükler atanır. Eğer daha önceden bilinmiyorsa, hedefin bağlanma bölgesi belirlenir veya bir kör yerleştirme simülasyonu gerçekleştirilebilir. Moleküler docking hesaplamaları iki ana adımda gerçekleştirilir: pozlama ve puanlama. Bu adımlar, hedef ve ligandlar arasındaki olası komplekslerin sıralı bir listesini oluşturur (Torres, *vd.* 2019). Bu yöntem, ilaç tasarımı ve biyolojik etkileşimlerin anlaşılması gibi birçok alanda önemli bir araştırma ve geliştirme aracı olarak kullanılmaktadır.

Moleküler docking, Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı araç kutusunun önemli bir parçasıdır. "Yapıya dayalı ilaç tasarımı" yöntemlerinin bir parçası olarak, aktif bileşiklerin

bağlanma modunu tahmin etmek, maliyetleri azaltmak ve ilaç geliştirme sürecini hızlandırmak için büyük dijital bileşik kitaplıklarını sanal olarak taramak amacıyla geliştirilmiştir (Torres, *vd.* 2019).

Moleküler docking, yerleştirme bilgisi olmadan da kullanılabilir ve terapötik açıdan ilgi çekici yeni bileşiklerin keşfini, yapı-aktivite ilişkilerinin (SAR) belirlenmesini, moleküler düzeyde ligand-hedef etkileşimlerini tahmin etmeyi veya diğer hedef modülatörlerin kimyasal yapılarını tanımlamayı sağlar (Pinzi, & Rastelli, 2019). Bu yöntem, ilaç tasarımında önemli bir araç olarak kullanılmakta ve yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Moleküler docking, başlangıçta küçük ve büyük moleküller arasındaki moleküler tanıma mekanizmalarını anlamaya yardımcı olmak için geliştirilmiştir. Ancak, son yıllarda ilaç keşfi alanında moleküler docking yönteminin kullanımları ve uygulamaları önemli ölçüde değişmiştir (Pinzi, & Rastelli, 2019). Bu yöntem, ilaç keşfinde ve tasarımında büyük bir rol oynamakta, ilaç adaylarının keşfi ve moleküler etkileşimlerin anlaşılmasında önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Yeni algoritmalar, puanlama fonksiyonları ve hedefe özgü yaklaşımlar sayesinde moleküler docking yöntemi daha etkili ve verimli hale gelmiştir.

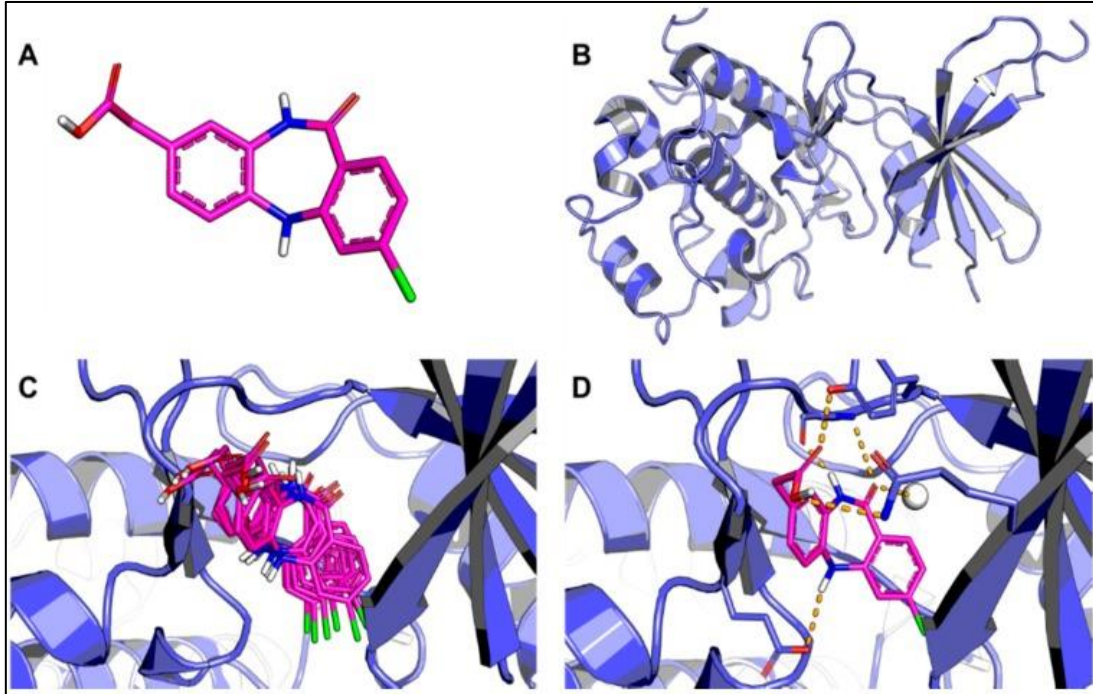
Yüksek Verimli Tarama (HTS), büyük bileşik kitaplıklarının moleküler hedef panellerine karşı deneysel olarak taranmasıyla biyolojik olarak aktif bileşikler keşfetmek için altın standart olarak kabul edilir. Ancak, bu tarama platformlarını kurmak ve sürdürmek için gereken yüksek maliyetler, genellikle ilaç keşfi için kullanımlarını kısıtlamaktadır. Son yıllarda, bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler ve terapötik hedefler üzerindeki verilerin artışı sayesinde, *in silico* kullanımı kemoinformatik, moleküler modelleme ve yapay zekâ (AI) alanlarında önemli ölçüde artmıştır.

*In silico* yaklaşımlar artık milyonlarca bileşiği uygun bir zamanda sanal olarak tarayarak isabet tespitinin maliyetini azaltmaya ve istenen ilaç adaylarını bulma şansını artırmaya yardımcı olmaktadır. Bugün, ilaç keşfi görevlerini kolaylaştırmak için genellikle yapı tabanlı ve ligand tabanlı moleküler modelleme teknikleri kullanılmaktadır (Pinzi, & Rastelli, 2019). Bu yöntemler, ilaç adaylarının tasarımında, hedef moleküllere etkileşimlerin anlaşılmasında ve biyolojik etkinliklerin öngörülmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Yapıya dayalı yöntemler, ilgi duyulan hedefin 3D yapı bilgisi kullanılarak edinilen verilere dayanır ve belirgin bir hedefe yönelik ligandların yapısal ve elektronik uyumuna göre molekül veritabanlarını sıralamaya müsaade eder. Bu çerçevede moleküler docking, biyolojik ve moleküller hedefler arasındaki etkileşim ihtimallerini ortaya çıkarmaya yardımcı olan en

popüler ve başarılı yapı tabanlı in silico yöntemlerden biridir. Bu yöntem genellikle, öncelikle bir reseptör içerisindeki bir ligandın moleküler uyumunu tahmin ederek başlar ve sonra bir puanaj fonksiyonu kullanarak tamamlayıcılıklarını tahmin eder (Pinzi, & Rastelli, 2019). Moleküler docking, ilaç tasarımı ve keşfi gibi birçok alanda etkili bir araç olarak kullanılmaktadır ve hedef moleküllere uygun ligandların keşfinde önemli bir rol oynamaktadır.

Moleküler docking, Yapıya Dayalı İlaç Tasarımı (SBDD) alanında en sık kullanılan yöntemlerden biridir, çünkü uygun hedef bağlanma bölgesi içindeki küçük molekülü ligandların konformasyonunu yüksek doğrulukla tahmin etme yeteneğine sahiptir. 1980'lerde ilk algoritmaların geliştirilmesinden sonra, moleküler docking, ilaç keşfi süreçlerinde önemli bir araç haline gelmiştir. Örneğin, ligand bağlanma modları ve ligand-reseptör kompleksini stabilize eden ilgili moleküller arası etkileşimleri içeren önemli moleküler olayların araştırılması, moleküler docking ile kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Ayrıca, moleküler docking algoritmaları, bağlanma afinitesine dayalı olarak ligand-reseptör komplekslerine bağlanan bileşikler sıralayarak, bağlanma enerjilerinin nicel tahminlerini yapmaya olanak tanır (Ferreira, vd. 2015). Bu sayede, potansiyel ilaç adaylarının seçimi ve tasarımı için önemli bilgiler elde edilebilir.



Şekil 10. Moleküler docking işleminin ana hatları (Ferreira, vd. 2015).

(A) Ligandın üç boyutlu yapısı; (B) Reseptörün üç boyutlu yapısı; (C) Ligand, reseptörün bağlanma bölgesine kenetlenir ve çeşitli konformasyonları araştırılır; (D) En olası

bağlanma şekli ve ilgili moleküller arası etkileşimler tanımlanır. Proteindeki omurga, bir karikatür şeklinde temsil edilir. Ligand (mor renkli karbon atomları) ve aktif bölgedeki kalıntılar (mavi renkli karbon atomları) çubuklarla gösterilir. Su molekülleri beyaz kürelerle temsil edilir ve hidrojen bağları kesikli çizgilerle gösterilir (Ferreira, *vd.* 2015). Bu şekil, moleküler docking sürecinin basamaklarını ve ligandın reseptöre nasıl bağlandığını ve etkileşimlerin nasıl oluştuğunu anlamamıza yardımcı olur.

Moleküler docking programları, tahmin edilen ligand-reseptör komplekslerinin bağlanma enerjisini hesaplamak için puanlama fonksiyonlarını kullanır. Bu bağlanma enerjisi, bağlanma sabiti (Kd) ve Gibbs serbest enerjisi ( $\Delta G$ ) gibi terimlerle ifade edilir. Bağlanma enerjisinin tahmini, ligand-reseptör arasındaki moleküller arası etkileşimlerin, desolvasyon ve entropik etkiler gibi önemli fiziksel-kimyasal fenomenlerin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. Dolayısıyla, değerlendirilen fiziksel-kimyasal parametrelerin sayısı arttıkça, puanlama fonksiyonunun doğruluğu da artar (Ferreira, *vd.* 2015). Bu şekilde, moleküler docking programları, olası ligand-reseptör etkileşimlerini değerlendirerek potansiyel ilaç adayları arasından en uygun olanları seçmemize yardımcı olur.

Moleküler docking uygulamalarında, puanlama işlevleri anahtar bir rol oynar ve üç grupta sınıflandırılır: kuvvet alanı temelli, deneysel temelli ve bilgi temelli işlevler (Ferreira, *vd.* 2015). Bu puanlama işlevleri, ligand-reseptör etkileşimlerinin enerjilerini tahmin etmek ve bağlanma gücünü değerlendirmek için kullanılır. Kuvvet alanı temelli işlevler, moleküller arasındaki fiziksel etkileşimleri hesaplamak için atomik düzeyde kuvvet alanı parametrelerini kullanırken, deneysel temelli işlevler deneysel bağlanma verilerini ve yapıları kullanarak bağlanma afinitesini tahmin eder. Bilgi temelli işlevler ise, bilgi tabanlı özellikler ve moleküler öznitelikler kullanarak bağlanma enerjisi ve etkileşimleri tahmin etmeye dayanır. Bu puanlama işlevleri, moleküler docking uygulamalarında ligand-reseptör etkileşimlerinin değerlendirilmesini ve potansiyel ilaç adaylarının sıralanmasını kolaylaştırmaktadır.

Kuvvet alanı temelli puanlama işlevleri, bağlanma enerjisini tahmin etmek için genellikle bağlı (bağ gerdirme, açılı bükme ve dihedral varyasyon gibi) ve bağlı olmayan terimlerin (elektrostatik ve van der Waals etkileşimleri gibi) katkılarını toplar. Bu tür puanlama fonksiyonları, klasik mekaniğin denklemlerini kullanarak her bir terimle ilişkili enerjiyi hesaplamak için *ab initio* yöntemlerine dayanır (Ferreira, *vd.* 2015). Kuvvet alanı temelli puanlama işlevleri, moleküler docking uygulamalarında ligand-reseptör etkileşimlerinin enerjilerini hesaplamak ve bağlanma gücünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan ve başarılı sonuçlar veren bir yöntemdir.

Deneysel puanlama (Ampirik) işlevleri, ligand-reseptör kompleksinin oluşumunda yer alan çeşitli fiziksel olayları tanımlayan bir değerlendirme yöntemi türüdür. Bu işlevler, ligand-reseptör etkileşimlerinin enerjisini tahmin etmek için deney verilerini kullanır ve bağlanma gücünü değerlendirmeye yardımcı olur. Hidrojen bağı, iyonik ve apolar etkileşimler gibi çeşitli etkileşim türlerinin yanı sıra desolvasyon ve entropik etkiler de deneysel puanlama işlevlerinde yer alabilir (Ferreira, *vd.* 2015). Bu tür puanlama işlevleri, moleküler docking uygulamalarında ligand-reseptör etkileşimlerinin enerjilerini değerlendirmek için deneysel verilerden edinilen bilgilere dayanır ve ilaç keşfinde önemli bir araç olarak kullanılır.

Deneysel puanlama işlevlerinin dezavantajlarından biri, modeli geliştirmek için kullanılan verilerin doğruluğuna bağımlı olmalarıdır. Yani, bu işlevlerin doğruluğu, kullanılan deneysel verilerin kalitesine ve kapsamına bağlıdır. Bununla birlikte, kullanılan enerji terimlerinin basitliği sayesinde, ampirik fonksiyonlar, kuvvet alanı tabanlı yöntemlere göre daha hızlı çalışabilirler. Surflex ve FlexX, ampirik puanlama fonksiyonlarını kullanan ve yaygın olarak kullanılan moleküler yerleştirme programlarıdır (Ferreira, *vd.* 2015). Bu programlar, moleküler docking uygulamalarında yaygın olarak kullanılır ve ligand-reseptör etkileşimlerinin enerjilerini değerlendirmek için deneysel verilere dayanan ampirik puanlama işlevlerini kullanırlar.

Ligand-reseptör bağlanma enerjisini değerlendirmek için kullanılan üçüncü bir yaklaşım, bilgiye dayalı puanlama fonksiyonlarıdır. Bu yöntem, bilinen ligand-reseptör komplekslerinden çıkarılan ikili enerji potansiyellerini kullanarak genel bir fonksiyon elde etmeyi amaçlar. Bu potansiyeller, yapısal veri setinde belirli bir mesafe içinde iki farklı atomun bulunma sıklığını dikkate alarak oluşturulur. Veri setinde gözlemlenen farklı etkileşim türleri, oluşma sıklıklarına göre sınıflandırılır ve ağırlıklandırılır. Nihai puan, bu bireysel etkileşimlerin toplamı olarak verilir. Bilgiye dayalı işlevler, bağlanma afinitelerinin (ampirik yöntemler) veya ab initio hesaplamalarının (kuvvet alanı yöntemleri) yeniden üretilmesine dayanmadığından doğruluk ile hız arasında uyumlu bir denge sunarlar (Ferreira, *vd.* 2015). Bu sayede, moleküler docking uygulamalarında geniş bir çeşitlilik sağlayarak, bilinen verilere dayanan etkileşimleri kullanarak ligand-reseptör etkileşimlerini değerlendirmeye yönelik etkili bir yaklaşım sunarlar.

## Ökse Otu (*Viscum Album L.*)

Çok eski bir tarihe sahip olan ökseotu (*Viscum Album L.*), Kuzey Avrupa'lı bazı toplumlar ökseotunun nadir görülen meşe ağaçlarında meydana getirdiği enfeksiyon nedeniyle ökse otuna saygı göstermişlerdir. Ökseotunun toprakta değil de ağaçların üzerinde yetişiyor olması, bitkinin önemli bir özelliğidir. (Walker, 1983).

Ökseotu, Yunan botanikçi Theophrastus tarafından M.Ö. 305 yılında parazitik bir bitki olarak tanımlanmış, Carl Linnaeus ise 18. yüzyılda bitkiyi *Viscum album* olarak adlandırmıştır (Gill, 1953).

Avustralyalı tıp doktoru Rudolf Steiner, ökseotundan tedavi amaçlı antroposofik ilaçlar üretmiştir. Kanser hastaları üzerinde alışılmadık tedavi yöntemleri denemek amacıyla hastalara ökseotu özütleri enjekte etmiştir. Steiner, ökseotunu özellikle kanser tedavisinde kullanarak modern bilim dünyasında araştırmaların yapılmasına ve önemli bir yer edinmesine katkıda bulunmuştur (Urech, 1993).

Steiner'in çalışmaları, alternatif tedavi yöntemi olarak yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Habeck, 2003). Ökseotu, günümüze kadar onkoloji alanında kullanımının yanı sıra birçok enfeksiyon hastalıkları üzerinde klinik çalışmalar ortaya konmuştur (Van Wely, vd. 1996; Stoss, vd. 1999).

Bitkilerin insanlık tarihi boyunca ilaç, yiyecek ve kozmetik amaçlı kullanılmıştır. Bu geçen zaman içinde çeşitli hastalıkların varlığı ve tedavi edilmesi amacıyla bitkilerin kullanımı yaygınlaşmıştır. İnsanlar, her bir bitkinin özelliklerini keşfetmiş ve pozitif veya negatif denemelerle bu kullanımları geliştirmiştir (Baytop, 1999).

Bugün, onbinlerce bitki alternatif tedavi maksadı ile kullanılmaya devam edilmektedir (Ascenzi, 1996). Günümüzde, çeşitli bitkilerden izole edilen maddeler üzerine, hastalıkların tedavisi için umut olabilmek adına birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır.

Bitki bazlı çeşitli ilaçlar simyacılarından günümüze kadar uzanan geleneksel tıbbi tedavinin önemli bir parçası olarak değerini hala korumaktadır. Bu tür tedavi yöntemleri uluslararası literatürde "bitkisel kaynaklı halk ilaçları" olarak bilinir ve "fitoterapi" olarak adlandırılır (Baytop, 1963; Baytop, 1982).

*Santalales* takımı, *Loranthaceae* familyasına ve *Viscum* cinsine bağlı olan ökseotu, çeşitli tıbbi etkilere sahip olan yarı asalak bir bitkidir. Bu bitki, köknar, çam, ladin, armut, vişne, kiraz, kabak ağaçları gibi ağaçların üzerinde dört mevsim boyunca yeşil kalabilen yarı asalak bir bitkidir *Viscum album L.* bitkisinde yapılan bilimsel çalışmalar, lektin (Wagner, vd.

1986), viskotoksin, fenilpropan, lignan, flavonoid (Fukunaga *vd.* 1983), alkaloit ve poliholozit gibi çeşitli etken maddelerin bulunduğunu ortaya koymuştur (Khıvaja, *vd.* 1986).

*Viscum albüm L* bitkisinin meyve, yaprak ve dalları, epilepsi, tansiyon düzenleme, kanın temizlenmesi, kalp gücünün artırılması, idrar artırma, kusma, güç verme ve sindirim üzerinde yararlı etkiler gösterebilir. Ayrıca idrar söktürücü ve spazm giderici özelliklere sahiptir. Ökseotu, salgı bezlerine olan faydası nedeniyle metabolizmayı olumlu yönde etkileyen bir bitkidir (Özer, *vd.* 1996; Baytop, 1999).

Ökseotu meyvelerinin ezilmesi ile edinilen merhem, Güneydoğu bölgemisindeki kimi illerde romatizma ağrı giderici ve çıban tedavisinde kullanılmaktadır. (Baytop, 1999). Alternatif tıp tedavisinde ökseotu çayı, özsu ve merhem olarak kullanılan bitkinin yaprakları ve sapları toksik değilken, meyveleri oral olarak kullanılırsa toksik olabilir. Ökseotu çayı kronik kramplara ve histeri krizlerine iyi geldiği ifade edilirken, pankreas üzerindeki etkisi ile diabete neden olan dengesizlikleri düzeltebilir. Atar damar sertliğini etkileyebilir ve akciğerdeki olası kanamaları ve enfeksiyona bağlı bağırsakta olabilecek kanamaları durdurabilir. (Treben, 1997).

Alerjik nedenlere bağlı olarak uyarılan lökositlerin histamin aminoasit salgılanması *Viscum albüm L.* bitkisi ile inhibe edilir (Luther, *vd.* 1978). Lenfositler arasında farklı salınımı uyardığı (Coeugniet, & Elek, 1987), nötrofiller üzerinde süperoksit anyonunun aktivasyonunu sağladığı (Timoshenko, & Gabius, 1993), lenfositler yoluyla immünoglobülin-G (IgG) üretimini lektinlere karşı uyardığı (Stettin, *vd.* 1990), T yardımcı lenfosit hücrelerini ve monositleri uyaran etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Stettin, *vd.* 1990; Stein, & Berg, 1996),

*Viscum albüm L.* bitkisinin sulu ekstraktlarının yapılan *in vitro* çalışmalarda, birçok tümörlü hücre üzerine toksitite etkisinin olduğu bildirilmiştir (Bayazit, 2004). Yapılan içerik analizi sonucu ökse otundan izole edilen lektin maddesinin, zehirli olan rizin maddesi ile kimyasal yapıları bakımından benzerlik olduğu görülmüştür (Dietrich, *vd.* 1992). Ayrıca, hücreyel protein sentezini ribozomu inaktive ederek inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Stirpe, *vd.* 1980). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, tümörün büyüklüğünü azalttığı tespit edilmiştir (Zarkovic, *vd.* 1997). Diabetik bireylerde pankreas hücrelerini uyararak insülin hormon salınımını artırdığı tespit edilmiştir (Swanson, *vd.* 1989; Gray, & Flatt, 1999). Yüksek tansiyonlu bireylerde, tansiyonu düşürüğü, tansiyona bağlı ortaya çıkan baş ağrısı ve baş dönmesi durumlarını ortadan kaldıran rehabilite edici etkisi saptanmıştır (O'Hare, & Hoyt, 1928; Bowman, 1990).

*Viscum album L.* ekstralarının insanlar üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sınırlı sayıda ve küçük çaplı klinik çalışmalar yapılmıştır. Bazı kanser hastaları üzerinde yapılan çalışmada, ökseotu ekstraktları ile hazırlanmış ilaçların uygulandığı hastaların, ilaç uygulaması yapılmayan hastalara göre daha uzun süre hayata tutundukları saptanmıştır (Grossarth, vd. 2001).



## İKİNCİ BÖLÜM

### Kaynak Özetleri

Doğada bulunan birçok bitki, hastalıkların tedavisinde doğrudan veya dolaylı olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir. Şifa amaçlı kullanılan bu bitkilerden bir tanesi de ökse otu (*Viscum album*)'dur. Ökse otu, *Santalales* takımı, *Loranthaceae* familyasına ve *Viscum* cinsine bağlı olup köknar, çam, ladin, armut, vişne, kiraz, kabak ağaçları gibi ağaçlar üzerinde yetişen dört mevsim boyunca yeşil olan yarı asalak bir bitkidir (Shinde, vd. 2012). Günümüze kadar yapılmış olan bilimsel çalışmalar *Viscum album* bitkisinde, lektin (Wagner, vd. 1986), viskotoksin, fenilpropan, lignan, flavonoid (Fukunaga, vd. 1983), alkaloid ve poliholozit ( Khivaja, vd. 1986) gibi çeşitli etken maddelerinin varlığı tespit edilmiştir. *Viscum album L.*, birçok tıp otoritesi tarafından değerli bir bitki olarak kabul edilmiştir. Bugünlerde *Viscum album*'den edinilen özütler, çeşitli kanser vakalarının tedavisinde ve bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitki özütleri, sağlık alanında çeşitli amaçlar için kullanılan doğal bir tedavi seçeneği olarak önem kazanmıştır (Luther vd. 1987; Rote, 1994). Yapılan içerik analiz çalışmalarında *Viscum album L.* bitkisinin yetiştiği konakçıya göre alkaloid içeriğinde farklılıklar gözlenmiştir ( Khwaja, vd. 1986). *Viscum album*'un içerdiği lektin ve viskotoksin grubu etken maddelerinin yanı sıra kansere karşı etkili olduğu bilinen poliholozitlerin varlığında bilinmektedir. Bitkinin yaprakkısmaları, gövde kısımları ve meyve kısımları ile hazırlanan ekstraktlarda yapılan içerik analizlerinde belirli oranlarda poliholozit etken maddesi tespit edilmiştir (Luther, vd. 1987; Gonda, vd. 1990). Diabet, metabolik bir hastalıktır ve insülin hormonu sekresyonundaki veya insülin etkinliğindeki bozukluklar sonucunda hipeglisemi (yüksek kan şekeri) ile karakterizedir. Bu hastalıkta, vücutta yeterli miktarda insülin üretilemez veya üretilen insülinin etkisi yetersizdir. Sonuç olarak, kan şekerinin normal seviyelerde kontrol edilememesi ve yükselmesi, uzun vadede ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Diabetin neden olduğu hipeglisemi, çeşitli dokularda işlev bozukluklarına ve organ hasarına neden olabilir (Anonymous, 2004). Birinci tip diabet, insülin hormonunu sentezleyen pankreas beta hücrelerinin otoimmün tahribatı sonucunda ortaya çıkar. Gençlik diabeti şeklinde bilinen birinci tip diabetli bireylerde, meydana gelen beta hücrelerindeki tahribat sonucunda insülin hormonu az miktarda salgılanır veya salgılanamaz. Bu durumda, vücutta yeterli miktarda insülin bulunmadığından, hipeglisemi (yüksek kan şekeri) meydana gelir. Tip-1 diabet, genellikle çocukluk veya gençlik döneminde başlar ve yaşam boyu sürekli insülin tedavisi gerektirir. Pankreasın beta hücrelerindeki hasar, bağışıklık sisteminin yanlışlıkla kendi

hücrelerine saldırması sonucu oluşur. Bu durum, insülinin vücuda yeterli şekilde taşınmasını ve kullanılmasını engeller, bu da kan şekeri düzeylerinin kontrol edilememesine ve hipeglisemiye yol açar (Anonymous, 1999; Hoogwerf, vd. 2006). Diabetin her türü, kronik hipeglisemi (yüksek kan şekeri) ile karakterizedir. Hipeglisemi durumunda, glukozun hücrelere insülin bağımsız bir şekilde girebildiği ve retina, lens, periferik sinir sistemi, böbrek glomerülü ve damar içi tabakalardaki dokularında metabolik bozukluklar ortaya çıkar.

Hipeglisemi, uzun süre devam ettiğinde ve uygun şekilde kontrol edilmediğinde, vücuttaki çeşitli dokularda hasara yol açabilir. Diabetik mikrovasküler komplikasyonlar, gözlerde (diabetik retinopati), lenslerde (katarakt), periferik sinirlerde (nöropati) ve böbrek glomerüllerinde (nefropati) meydana gelebilir. Bunun yanı sıra, diabetik makrovasküler komplikasyonlar, kalp-damar sistemini (kardiyovasküler hastalıklar), periferik arterlerde daralmalara veya tıkanmalara yol açabilir (periferik arteriyel hastalıklar) ve beyin damarlarında sorunlara neden olabilir (serebrovasküler hastalıklar).

Bu nedenle, diabetin uzun vadeli kontrolü ve kan şekeri düzeylerinin yönetimi önemlidir. Hipeglisemiye bağlı olarak gelişebilecek mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar, diabet yönetimi ve düzenli sağlık takibi ile azaltılabilir. Hipeglisemiye bağlı olarak ortaya çıkan diabete bağlı sorunlar biyokimyasal ilişkisi içerisinde olan dört ayrı mekanizma ile açıklanabilir. Sorbitol yolu, protein kinaz C aktifleşmesi, ileri glikasyon son ürünlerin oluşumu ve heksozamin yolu diabete bağlı sorunların ortaya çıkmasında sorumlu olan yolaklardır. Hipeglisemi ile ilişkili bu metabolik yollar, büyük damarların iç tarafını çevreleyen damar içi tabaka hücrelerinin işlevini bozarak kardiyovasküler, periferik, arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar gibi makroanjyopatik hastalıkların oluşumuna sebep olur. Diabet kaynaklı sorunların ortaya çıkmasında, AR ve SDH enzim ikilisinden oluşan poliyol yolağının önemli bir rolü vardır. İnsüline bağlı olmayan dokulardaki glukoz derişiminin artmasıyla aktifleşen poliyol yolağının ilk enzimi olan AR, NADPH'dan elde ettiği elektronları glukozu vererek, glukozdaki aldehit grubunun primer alkol grubuna indirgenmesi sonucu sorbitol oluşur. İlk basamağın ürünü olan sorbitoldeki sekonder alkol grubu, bu yolağın öteki enzimi SDH, kofaktör NAD<sup>+</sup>'nin redüksiyonu ile keton grubuna yükseltgenmesi sonucu früktoz oluşur. AR, tipik zehirli aldehit bileşiklerini, aktif olmayan alkollere redükte eder Diabet kaynaklı sorunların ortaya çıktığı dokularda AR enzim aktivitesinin fazla olması, bu sorunların ortaya çıkmasında sorbitol yolağının sorumlu olduğunun bir göstergesidir. Bitki fizyolojisinde ve biyokimyasında büyük önemi olan bu bitkiler antioksidan, toksik bileşiklerin ve enzim inhibitörlerinin öncüleri gibi davranmaktadır. Flavonoidler memeli enzim mekanizmasındaki birçok enzimi inaktif hale getirmeleriyle birlikte önemli metabolik

yolakları etkilediği bilinmektedir ve bitkilerden saflaştırılan özellikle flavonoidler ve polifenollerin belirli bir kısmı AR enziminin inhibisyonuna önemli rol oynadığı bulunmuştur. Farklı bir çalışmada ise AR enziminin flavonoidler ile inhibe edilmesini hedefleyen çalışmalarda sıçan dokularında sorbitol birikmesini takip edilmesinin yolunu açmıştır ve beraberinde AR enziminin inhibisyonu kontrol edilmesinin yolu açılmıştır. Bu olay ise flavonoidlerin diabetik komplikasyonların önlenmesinde aracılık yapabileceğini belirlemiştir (Klip vd. 1994; Tanimoto, vd. 1998; Kao, vd.1999; Brownlee, 2001; Lim, vd. 2001; Lopez-Lazaro, 2002; Brownlee, 2005; Fernandez, vd. 2005; King, vd. 2005; Iwata, vd. 2007; Gleissner, 2007; Patel, & Mishra 2012).

Sığır lens AR enzimi üzerine yapılan bir başka araştırmada ise *Amaryllidaceae*, *Anacardiaceae*, *Papilionaeaceae* ve *Polygonaceae* ailesi bitki ekstraktlarının % inhibisyonu sırasıyla 1, 92, 8 ve 14 şeklinde belirlenmiştir. Bununla birlikte *Melastomataceae*, *Zingiberaceae* ve *Myrtaceae* ailesi inhibiyon değerleri sırasıyla 0-50, 14-75 ve 40-88 aralığın da belirlenmiştir. Ayrıca *Umbelliferae* ve *Sapotacea* ailesinin bitki özütleri, AR enzime etkisinin bulunmadığını belirlenmiştir (Guzman, & Guerrero 2005).

Yukardaki araştırmanın devamında ise farklı çözümler kullanılarak *Ericaceae* ailesine mensup *Vaccinium myrtillus* ve *Lamiaceae* ailesine mensup olan *Nepeta cataria* bitki özütlerinin ekstraksiyonun da farklı % değerler elde edildiğini belirlemiştir. *N. Cataria*'nın ekstraksiyonunda su, etanol ve diklorometan çözümleri ile edinilen veriler sırasıyla %9, %21 ve %18 olarak AR enziminin inhibisyon değerleri bulunmuştur. En yüksek değerlere sahip *V.myetillus* ekstraksiyonunda ise etanol ve distile su sırasıyla bulunan değerleri %67 ve %32 AR enzim inhibisyonunun olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ile çözümlerin içeriği ile ilişkileri olarak, flavonoidlerin ve polifenol farklı miktarlara çözümlerini sağlayarak bitki özütünün etkisini değiştirdiğini gözlemlenmiştir (Guzman, & Guerrero 2005; Ghasemzadeh, vd. 2011).

Ülkemize yapılan bir çalışmaya göre, *Lamiaceae* ailesine mensup olan *Lavandula stoechas*, *Ocimum basilicum* ve *Melissa officinalis*, *Fabaceae* ailesine mensup olan *Glycyrrhiza globra* ve *Tiliaceae* ailesine mensup olan *Tilia tomentosa* bitki ekstraktlarının sığır lens AR enzime olan inhibisyon etkisinin araştırıldığı çalışmada IC50 değerleriyle sırasıyla 39.28, 45.89, 54.15, 25.53 ve 31,76 µg/mL olarak belirlenmiştir (Onay, 2008).

Diğer bir çalışmada *Acanthaceae* ailesine mensup *Adhatoda vasica*, *Caesalpinaceae* ailesine mensup olan *Caesalppinia bonduc* ve *Cassia fistula* ve *Oxalidaceae* ailesine mensup olan *Biophytum sensitivimun* bitki ekstraktlarının sıçan lens AR enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemeye yöneliktir. Yukarıda isimleri belirtilen bitkilerin arasında en yüksek

inhibisyon etkisine sahip *C.fistula'nın* IC50 değeri 154 µg/mL olarak bulunmuştur (Gacche, & Dhole, 2011).

*Burceraceae, Myrtaceae, Lythraceae ve Lamiaceae* ailesi bitki özütlerinin AR enzimi üzerinde etkilerinin incelendiği farklı bir çalışma da ise sıçan lens AR enzimi IC50 değeri 5-60 µg/mL aralığında belirlenmiştir (Rao, *vd.* 2012).

oğunun asidik grup taşıdığı bilinen AR enzim inhibitörlerinin asidik gruplarının kofaktörlerin de nikotinamid kısmı ve AR enziminin 110. Histidin (His.), 48. Tirozin (Tyr.) ve 111. Triptofan (Trp.) aminoasit kalıntıları ile hidrojen bağı kurarak AR enzimini inhibe ettiği bilinmektedir. AR enzimi inhibitörlerinin yapılarında, enzimin lipofilik aktif bölgesi ile bağ yapabilen bir veya daha fazla aromatik gruplar olduğu bilinmektedir. Yapılan farklı çalışmalar ile karboksilik asit yapısı bulunan fenil, pirol ve benzimidazol türevli tiyanosinolinon karboksilik asit ve asetik asit bileşik türevleri AR enzim inhibitörleri olarak tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise aralarında arlestatik, tolrestat, epalrestat ve zopolrestat bulunan karbosilik asit türevlerinin AR enzimi üzerindeki etkilerinin yapay inhibitörler üzerinde çok fazla çalışıldığı görölmektedir. Fakat günümüze kadar bu yapay inhibitörlerin sadece epalrestatın ilaç olarak kullanılması Japonya'da kabul edilmiştir (Alexiou, *vd.* 2009).

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### Materyal ve Metot

#### Materyal

##### Yararlanılan kimyasallar.

Tablo 1. *Çalışmalar Esnasında Yararlanılan Kimyeviler ve Tedarik Edildiği Firmalar.*

Yararlanılan Kimyasallar	Firmalar
2', 5' ADP-sepharose 4B	E.Merc AG
Akrilamid	E.Merc AG
Amonyum persülfat	E.Merc AG
Amonyum Sülfat	Sigma
Asetik Asit	Sigma
Brom timol mavisi	E.Merc AG
CM-Selüloz	Sigma
Coomessie Brillant Blue G-250	E.Merc AG
Coomessie Brillant Blue R-250	E.Merc AG
DEAE Sephadex	Sigma
Diyaliz Torbaları	E.Merc AG
DL-Gliseraldehit	E.Merc AG
Etanol	E.Merc AG

Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Fluka
Gliserin	Sigma
Gliserol	E.Merc AG
Glisin	Sigma
Glutaraldehit	E.Merc AG
Hidroklorik Asit	Sigma
İzopropanol	Sigma
Metanol	Sigma
Molekül kütlesi Standartları Jel filtrasyon	E.Merc AG
N,,N' - metilen bisakrilamid	E.Merc AG
N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin(TEMED)	E.Merc AG
Potasyum fosfat	Riedel de Haen
Potasyum fosfat	Sigma
Protein Marker	BioRad 0375
Sephadex G-100	Sigma
Sephadex G-100	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum Fosfat	Riedel de Haen

Sodyum Klorür	Sigma
Sorbitol	Sigma
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Sigma
Triklor asetik asit (TCA)	Riedel de Haen
$\beta$ -Merkapto etanol	Sigma
$\beta$ -Merkapto etanol	Fruka
$\beta$ -NAD <sup>+</sup>	Sigma
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH)	E.Merc AG
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP <sup>+</sup> )	E.Merc AG

### Yararlanılan aygıtlar.

Tablo 2. Deneyler Sırasında Faydalanılan Aygıtlar.

Yararlanılan Aygıtlar	Marka
Soğutmalı satrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Karıştırıcı (Vorteks)	GFL 3025
pH metre	Sehott pH-Meter CG840
Hassas terazi	Gec avery
Otomatik pipet	Eppendorf
Spektrofotometre	Beckman Coulter
Magnetik karıştırıcı	Chilten Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	Nüve
Su banyosu	Barnstead Easy Pure UV/UF
(-20°C'ye kadar)	Sanyo Ultra Low
(-85°C'ye kadar)	Sanyo Madical Freezer

### **Bitki örneklerinin toplanması.**

*Viscum Album L.* bitki numuneleri Erzurum iline bağlı Olur ilçesinde Ormanağzı bölgesindeki sarıçam ormanlarından toplandı. Bitkinin türü, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Meryem Şengül Köseoğlu tarafından teşhis edildi. Harmanlanan numuneler, meyve, yaprak ve gövde olarak üç kısma ayrıldı. Saf su ile fiziksel kirler uzaklaştırdı. 25°C'de kurumaya bırakıldı. Kuru örnekler deneylere kadar 4°C'de muhafaza edildi.

### **Ekstraktların hazırlanması.**

Öğütücü yardımıyla meyve, yaprak ve gövde bitki örnekleri fiziksel olarak parçalandı. Örneklerden 10 gr tartılarak ve ağzı kapalı dokuz ayrı erlene konuldu. Üzerlerine 200 mL metanol, etanol ve su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süzüldükten sonra edinilen ekstraktlardan çözücüler evaporatör yardımıyla uygun sıcaklıklarda uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir ekstrakt için konsantrasyon 1000 ppm olacak şekilde stok solüsyon hazırlanacak (Ergün, 2021).

### **Yararlanılan solüsyonların hazırlanması.**

#### ***AR enziminin aktivite tayininde kullanılacak solüsyonlar.***

1. 200 mM Na-PO<sub>4</sub> tompon solüsyonu (pH:5.5): 40 ml saf su içerisine 4.8 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak çözüldü pH:5,5'e sabitlendi ve son olarak solüsyonun hacmi 50 ml olacak şekilde destile su ile tamamlandı.

2. 0,11 mM NADPH solüsyonu: 5ml saf su ile 0.0045 g NDPH tartılıp çözüldü.

3. 4.7 mM DL- gliseraldehit solüsyonu: 10 ml saf su ile 0.021 g DL-gliseraldehit tartılarak çözüldü.

#### ***AR enzimi için homojenatın hazırlanmasında yararlanılan solüsyonlar.***

10 mM Na-PO<sub>4</sub> tompon solüsyonu (pH:7.4): 900 ml saf su içinde 1,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartılarak çözüldü. Toplam hacmi 1000 ml tamamlandı ve pH 7,4'e sabitlendi.

#### ***AR enziminin diyalizinde yararlanılan solüsyonlar.***

5 mM β-Merkaptoetanol içeren 10mM Na-PO<sub>4</sub> tompon solüsyonu (pH=7.4): 900ml saf su içinde 12 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartarak çözüldü ve içine 72 µl β-Merkaptoetanol eklenerek pH:7,4 olacak şekilde ayarlandı. Son olarak solüsyon destile su kullanılarak hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

### ***Proteinlerin kantitatif tayininde yararlanılan solüsyonlar.***

1. 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözülerek bu solüsyonun içersine %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Solüsyon hacmi destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Standart serum albümin solüsyonu (1mg/ml; protein ölçümü için yararlanılan solüsyon): 1 ml saf su içerisinde 1mg standart serum albümin çözdürülerek hazırlanmıştır.

### **Metot**

#### **AR enziminin aktivite tayini.**

Yararlanılan solüsyonlar:

1. 0.11 mM NADPH solüsyon
2. 4.7 mM DL-gliseraldehit solüsyonu
3. 0.8 M Na-PO<sub>4</sub> tompon solüsyonu

AR enziminin aktivite tayini Cerelli prosedürü ile gerçekleştirildi. Tepkime ortamı, 0,25 ml Na-PO<sub>4</sub> tompon solüsyonu, 0,1 ml NADPH ve 0,45 ml destile H<sub>2</sub>O üstüne 0,1 ml saflaştırılmış enzim ilave edilerek hacim 1 ml'ye tamamlandı. Tepkime, küvete 0,1 ml DL-gliseraldehit substratı ilave edilerek başlatıldı. 340 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak ve 25°C'de NADPH derişimindeki azalış 3 dak boyunca gözlendi. Absorbans değerleri, lineer olan aralıklar tespit edilerek eğim hesaplamaları yapıldı.

Eğim aktivitesi aşağıda verilen formül kullanılarak enzim aktivitesi U/L cinsinden hesaplanacak.

$$U/L = \Delta A \times V(L) \times 1000 \text{ (}\mu\text{mol/dk}^{-1}/L^{-1}\text{)}$$

$$\Delta t = v(L) \times d$$

$$\Delta A = \text{Test tüpündeki absorbans farkı}$$

$$\Delta t = \text{Zaman (Dakika)}$$

$$\Delta A / \Delta t = \text{Eğim}$$

$$\epsilon = \text{Ekstraksiyon Katsayısı (3.4 \times 10^2 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1})}$$

$$d = \text{Işık Yolu (10 mm)}$$

$$V(L) = \text{Total Hacim}$$

$$v(L) = \text{Enzim Hacmi}$$

## **Protein ölçümü.**

### ***Kalitatif protein ölçümü.***

280 nm dalga boyunda proteinlerin yapısında bulunun triptofan, fenilalanin ile trozin aminoasitlerin maksimum absorbans gösterme temeline uzanır. (Segel, 1968). Kromatografi işlemlerin ardından eşit miktarda tartılan tüm fraksiyonlarda kalitatif protein ölçümü yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak ve absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

### ***Kantitatif protein ölçümü.***

Homojenat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürmesi neticesinde edilen enzim solüsyonu ve saflaştırılan enzim için kantitatif protein miktarı Bradford prosedürü takip edilerek tespit edildi. Prosedürde (-) yüke sahip olan Coomassie brilliant blue G-250 boyası, protein üzerinde bulunan (+) yüke bağlanır. İki farklı formda boya mevcuttur. Kırmızı ( $\lambda_{\text{max}}:465$  nm) ve mavi ( $\lambda_{\text{max}}:595$  nm). Proteinin bağlanması ile birlikte kırmızı form mavi forma dönüşür sağlar. Tekrarlanabilen reaksiyon 2 dak gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Protein tayin işlemleri 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albumin solüsyonundan ayrı tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{l}$  konularak tüplerin hacmi 0,1 ml olacak şekilde destile  $\text{H}_2\text{O}$  ilave edildi. Her bir tüpe 5'er ml Coomessie brilliant blue G-250 solüsyon eklenerek vortekste karıştırıldı. 10 dak sonra 595 nm dalga boyunda 3 ml'lik cam küvetler kullanılarak köre karşı absorbansları tespit edildi. Kör olarak, 0,1 ml enzim, tompon solüsyon ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 solüsyon bulunduğu karışım kullanılarak edinilen sonuçlar ile absorbans rakamları ile kesişen  $\mu\text{g}$  protein değerleri kullanılarak standart grafik çizildi. Tüm saflaştırma aşamalarında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numunelerinde seyreltme işlemi uygulandı. Seyreltik solüsyonlardan üç farklı tüpe 50, 100 ve 200  $\mu\text{l}$  olacak şekilde konularak üstüne 5'er ml boyar madde ilave edildi ve tüpler karıştırıcı ile karıştırılıp sonra bir süre beklenerek 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlendi. Üç ayrı tekerrürde edinilen tayin sonuçlarının aritmetik ortalaması alınarak standart grafik ile protein miktarları belirlendi (Bradford, 1976).

## **Koyun böbrek AR enziminin saflaştırılması.**

### ***Homojenatın hazırlanması.***

-80°C'de muhafaza edilen doku örnekleri, kendi kütlelerinin (gr) 3 katı 5 mM  $\beta$ -Merkaptoetanol ihtiva eden 10 mM Na- $\text{PO}_4$  tompon solüsyonu (pH:7,4) ile homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Sonrasında homojenat, 4°C'de 10000xg'de 40 dak santrifüj

işlemi uygulandı. Saflaştırma sürecinde kullanılmak üzere süpernatant 4°C’de muhafaza edildi.

#### ***(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi.***

Homojenat sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70 ve %70-80 aralıklarında katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çöktürüldü. Sonrasında homojenat 4°C, 10000xg’de 40 dak santrifüj işlemi uygulandı. Örnekler, tompon solüsyonu içinde çözünerek aktivite ölçüldü ve çöktürme aralığı saptandı. Daima çökelek ve süpernatantda enzim aktivitesi ölçüldü. Manyetik karıştırıcı kullanılarak (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>’ın homojenat içerisinde çözünmesi buz banyosunda ile yapıldı. Katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarı şu formül ile hesap edildi.

$$m_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

m: gerekli olan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarı (g)

V: Hacim (ml) (enzim solüsyonu)

S1: 1’in kesri olarak solüsyondaki (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturasyonu

S2: 1’in kesri olarak istenen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturasyonu

AR enziminin tümünün çökme aralığı tamamının işlemler sonucunda belirlendi. Sonrasında tespit edilen aralıkta (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kesitlemesi işlemi yapıldı. Sonrasında örnek 10000xg’de 20 dak santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Çöken kısım fosfat tompon solüsyonu içerisinde (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,9) çözüldü.

#### ***Diyaliz.***

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi sonrasında örnek, diyaliz torbasına konularak bir gün boyunca 5 mM β-Merkaptoetanol içeren, 10 mM Na-PO<sub>4</sub> pH=7,4’e karşı 3 kez diyaliz işlemi yapıldı. Bu uygulamalar 4°C’de yapıldı.

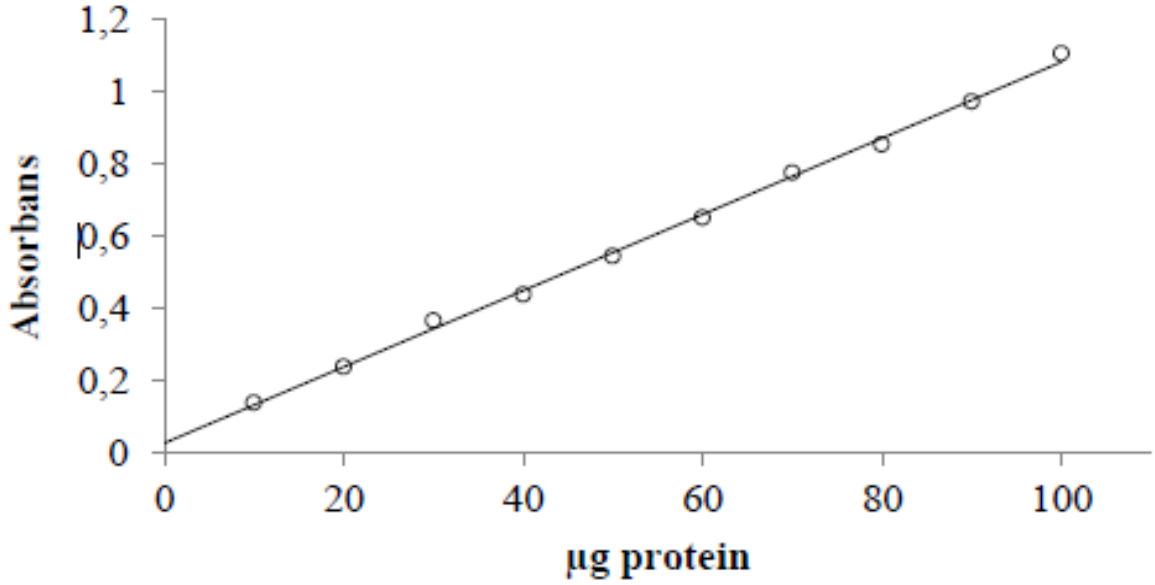
## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### Araştırma ve Bulguları

#### Araştırma

##### **Kantitatif protein ölçümü için yararlanılan standart grafik.**

Çalışmamızda ki AR solüsyonunda kantitatif protein ölçümü Bradford yöntemi kullanılarak saptandı. Standart grafik yukarıdaki gibi uygulandı. Anfinite kromatografisi ve homojenat işlemleri neticesindeki enzim solüsyonlarımızda ki kantitatif protein ölçümü standart grafikten yararlanılarak sonuçlar tespit edildi. Bu standart solüsyonların  $\mu\text{g}$  proteine karşılık olarak absorban değerleri şekil 11’ de gösterildi.

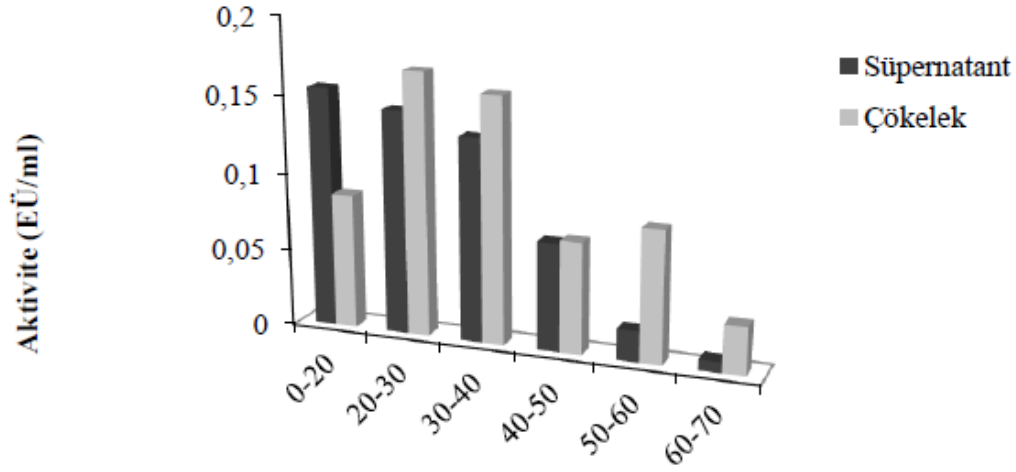


Şekil 11. Proteinlerin kantitatif tayini için yararlanılan ve BSA ile hazırlanan standart grafik.

##### **Koyun böbreğinden aldoz redüktaz enziminin kısmi saflaştırılması.**

##### ***(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çöktürülmesi.***

Yukarıdaki gibi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme işlemi uygulandı yapıldı. Çöktürme uygulamasında süpernatantta ile çökekte enzim aktivitesi ölçülerek çöktürme aralığı %0-%70 şeklinde saptandı.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ‘ın homojenat içerisinde çözünme uygulaması sırasında buz banyosu kullanılıp manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.



**Amonyumsülfat Çöktürme Aralığı**

Şekil 12. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme aralığının belirlendiği grafik.

### **Diyaliz.**

Diyaliz uygulaması yukarıda anlatıldığı şekliyle yapıldı. Diyaliz tompon solüsyonu yararlanılan metoda göre daima yenilendi.

### **Bulgular**

#### **Aldoz redüktaz enziminin saflaştırılması.**

Tablo 3. Koyun Böbrek Aldoz Redüktaz Enziminin Kısmi Saflaştırma Sonuçları.

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Hacim (ml)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim
Homojenat	1,315	2,95	48	63,120	141,6	0,446	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve Diyaliz	1,390	2,86	22	30,58	62,92	0,486	1,09	44,43

### Fenolik bileşik analizleri.

Bu çalışmadaki fenolik bileşik içerik testleri DAYTAM laboratuvarında yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Tablo 4. *Viscum Album L.*(Ökse Otu) Bitkisinin Meyve Kısımının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları

BİTKİ	ÇÖZGEN	BİLEŞİK	MİKTAR	BİRİM
<i>Viscum Album L.</i> Meyve	Etanol	Kinik Asit	17,7639	µg/mL
	Metanol		16,1487	
	Su		8,6615	
	<hr/>			
	Etanol	Kafeik Asit	0,2603	
	Metanol		0,0000	
	Su		0,0000	
	<hr/>			
	Etanol	KlorojenikAsit	22,797	
	Metanol		27,7181	
	Su		0,3161	
	<hr/>			
	Etanol	Siyanidin-3-o-glukozit	0,911	
	Metanol		0,634	
	Su		0,4689	
	<hr/>			
	Etanol	Ferulik Asit	0,5092	
	Metanol		0,2748	
	Su		0,2781	
	<hr/>			
Etanol	Fumarik Asit	0,1639		
Metanol		3,8901		
Su		37,1243		
<hr/>				
Etanol	Isorhamnet	0,0415		
Metanol		0,0484		
Su		0,0000		
<hr/>				
Etanol	Keracyanin Klorür	0,0000		
Metanol		0,004		

	Su		0,0029	
	Etanol	Mirisetin	0,0000	
	Metanol		0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol	Naringenin	1,0057	
	Metanol		0,8418	
	Su		0,6749	
<i>Viscum Album L.</i> Meyve	Etanol	p-Kumarik Asit	0,0265	
	Metanol		0,0154	
	Su		0,0000	
	Etanol	Kuersetin	0,1354	µg/mL
	Metanol		0,122	
	Su		0,0964	
	Etanol	Rosmarinik Asit	0,0346	
	Metanol		0,0054	
	Su		0,0004	
	Etanol	Sinapik Asit	0,4055	
	Metanol		0,237	
	Su		0,0061	
	Etanol	Tasifolin	0,0000	
	Metanol		0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol	Vanillik Asit	0,0041	
	Metanol		0,0408	
	Su		0,2334	

Tablo 5. *Viscum Album L.* (Ökse Otu) Bitkisinin Yaprak Kısmının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları

BİTKİ	ÇÖZGEN	BİLEŞİK	MİKTAR	BİRİM
<i>Viscum Album L.</i> Yaprak	Etanol	Kinik Asit	51,842	µg/mL
	Metanol		64,978	

	Su		33,7183	
	Etanol		0,0000	
	Metanol	Kafeik Asit	0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol		29,0683	
	Metanol	Klorojenik Asit	49,0526	
	Su		0,1779	
	Etanol		1,1991	
	Metanol	Siyanidin-3-o-glukozit	0,4593	
	Su		0,1564	
	Etanol		0,0164	
	Metanol	Ferulik Asit	0,0000	
	Su		0,0006	
	Etanol		0,3649	
	Metanol	Fumarik Asit	1,8435	
	Su		16,8263	
	Etanol		0,3041	
	Metanol	Isorhamnet	0,4877	
	Su		0,0000	
	Etanol		0,0000	
	Metanol	Keracyanin Klorür	0,0004	
	Su		0,0004	
	Etanol		0,0981	
	Metanol	Mirisetin	0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol		5,7967	
	Metanol	Naringenin	2,0907	
	Su		1,5254	
	Etanol		0,0275	
	Metanol	p-Kumarik Asit	0,0104	
	Su		0,0000	
	Etanol		0,3261	
	Metanol		0,1032	

*Viscum Album L.*

Yaprak

µg/mL

	Su	Kuersetin	0,2579
	Etanol		0,0276
	Metanol	Rosmarinik Asit	0,0053
	Su		0,0008
	Etanol		0,1689
	Metanol	Sinapik Asit	0,0827
	Su		0,0000

Viscum Album L. Yaprak	Etanol	Tasifolin	0,3115	µg/mL
	Metanol		0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol	Vanillik Asit	0,0000	
	Metanol		0,0373	
	Su		0,0000	

Tablo 6. *Viscum Album L.* (Ökse Otu) Bitkisinin Gövde Kısımının Etil Alkol, Metil Alkol ve Su Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Analiz Sonuçları

BİTKİ	ÇÖZGEN	BİLEŞİK	MİKTAR	BİRİM
Viscum Album L. Gövde	Etanol	Kinik Asit	113,927	µg/mL
	Metanol		110,7368	
	Su		74,8547	
	Etanol	Kafeik Asit	28,5629	
	Metanol		43,7664	
	Su		0,1335	
	Etanol	KlorojenikAsit	28,5629	
	Metanol		43,7664	
	Su		0,1335	
	Etanol	Siyanidin-3-o-glukozit	0,39	
	Metanol		0,1281	
	Su		0,0221	
	Etanol	Ferulik Asit	0,0000	
	Metanol		0,0000	

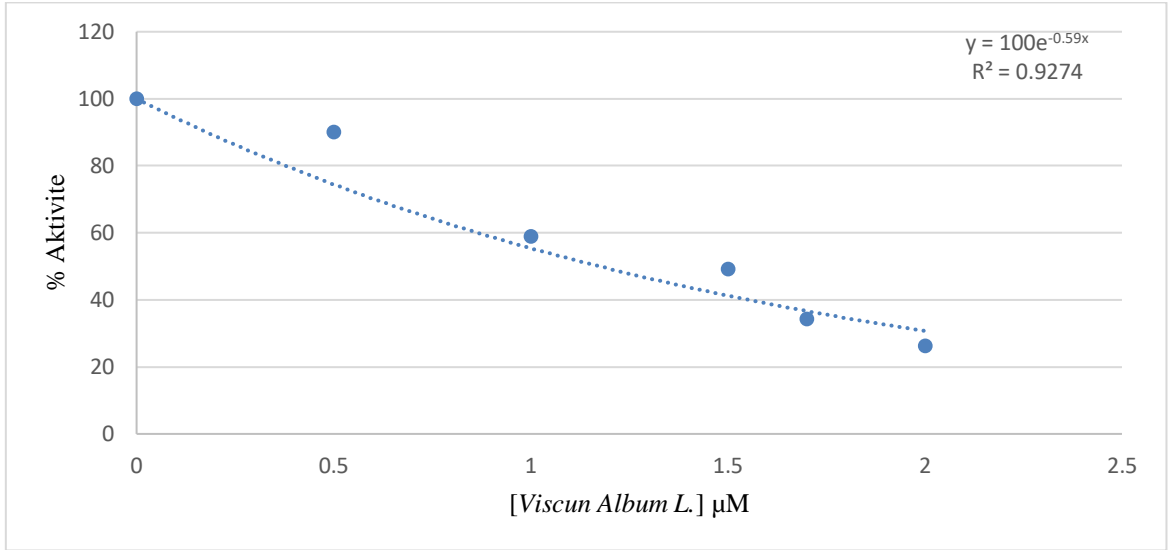
Su		0,0000
Etanol		0,4295
Metanol	Fumarik Asit	1,9199
Su		15,7103
Etanol		0,0000
Metanol	Isorhamnet	0,0000
Su		0,0000
Etanol		0,0003
Metanol	Keracyanin Klorür	0,0008
Su		0,0008

<i>Viscum Album L.</i> Gövde	Etanol	Mirisetin	0,0000	
	Metanol		0,0000	
	Su		0,0000	
	Etanol		1,7808	
	Metanol	Naringenin	0,1745	
	Su		1,1272	
	Etanol		0,0275	
	Metanol		0,0104	
	Su	p-Kumarik Asit	0,0000	
	Etanol		0,0165	µg/mL
	Metanol		0,0015	
	Su	Kuersetin	0,2272	
	Etanol		0,0447	
	Metanol	Rosmarinik Asit	0,0052	
	Su		0,0001	
Etanol		0,0646		
Metanol	Sinapik Asit	0,0000		
Su		0,0000		
Etanol	Tasifolin	0,0000		
Metanol		0,0000		

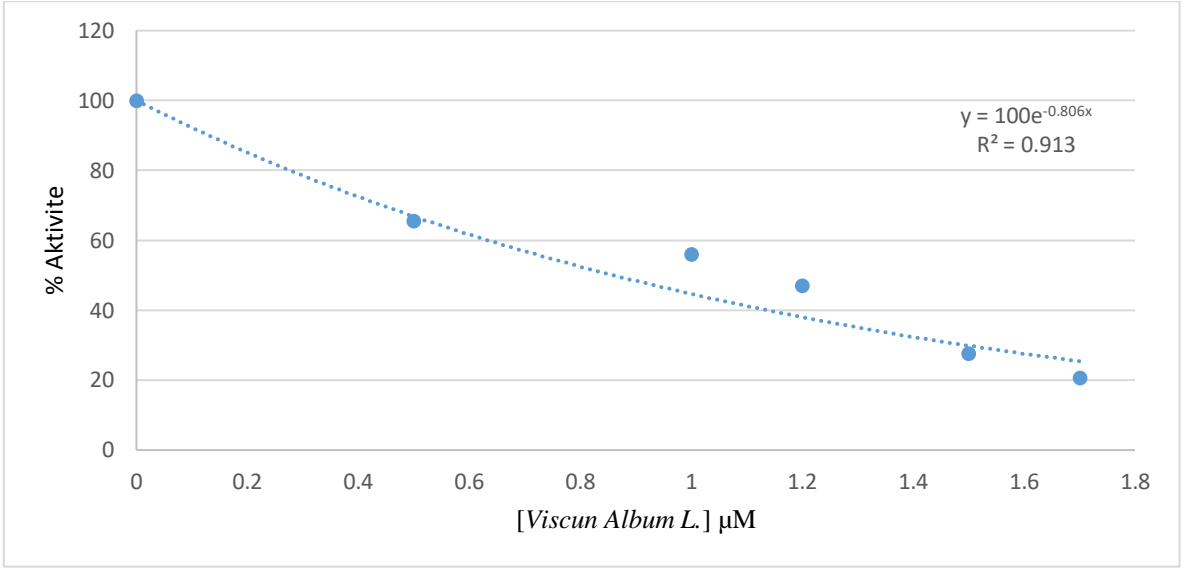
Su		0,0000
Etanol		0,0000
Metanol	Vanillik Asit	0,0000
Su		0,0057

**Koyun böbrek aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscum Album L.* ekstraktlarının inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.**

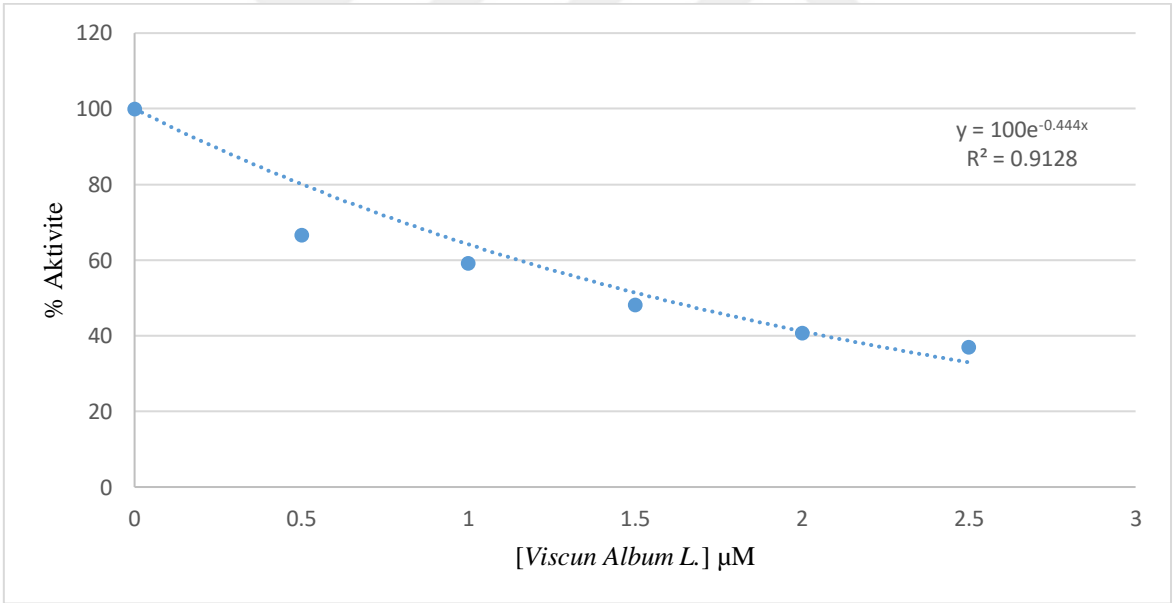
Çalışmamızda koyun böbrek dokusundan kısmi saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscum Album L.* bitki ekstraktlarının inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.



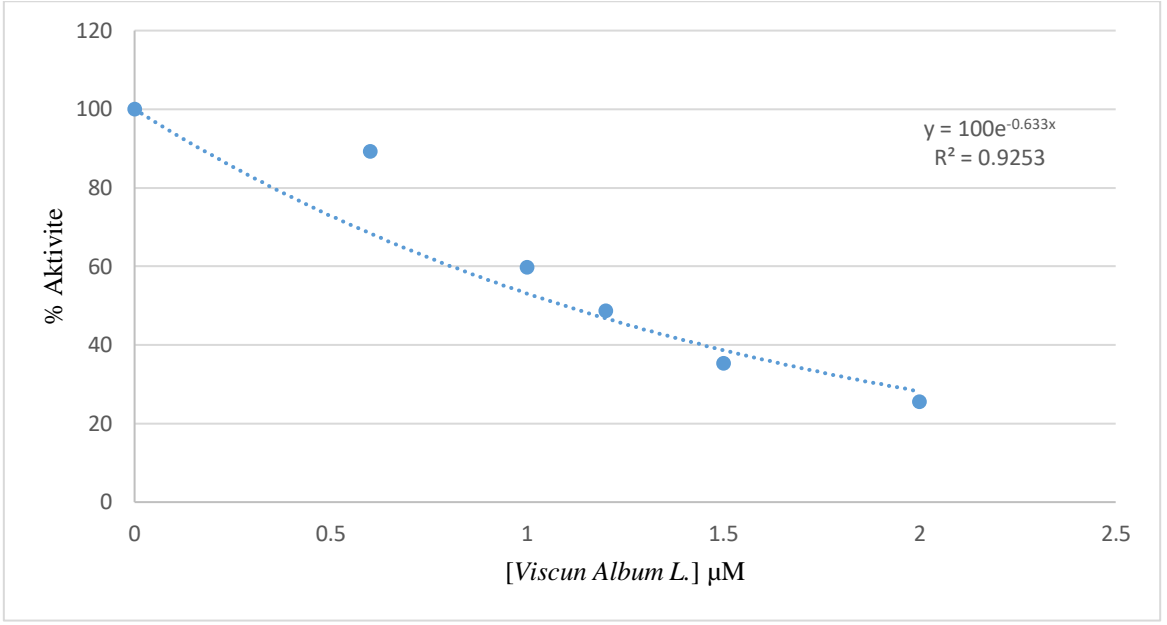
Şekil 13. Aldoiz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscum Album L.* (Ökse Otu) meyve kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



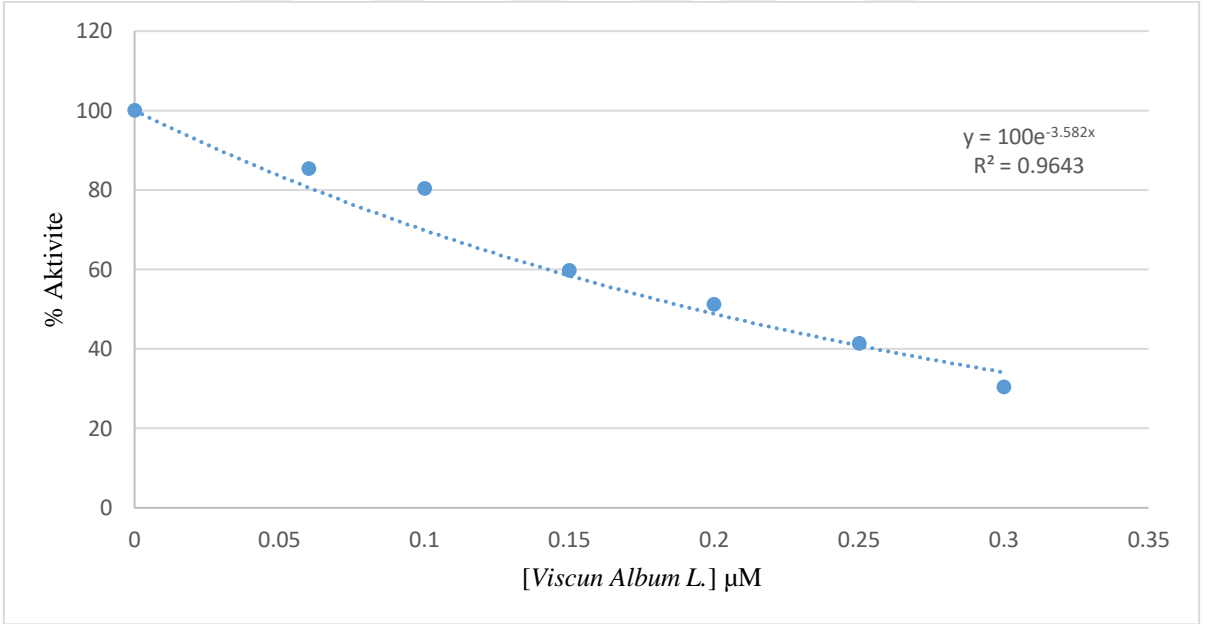
Şekil 14. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) meyve kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



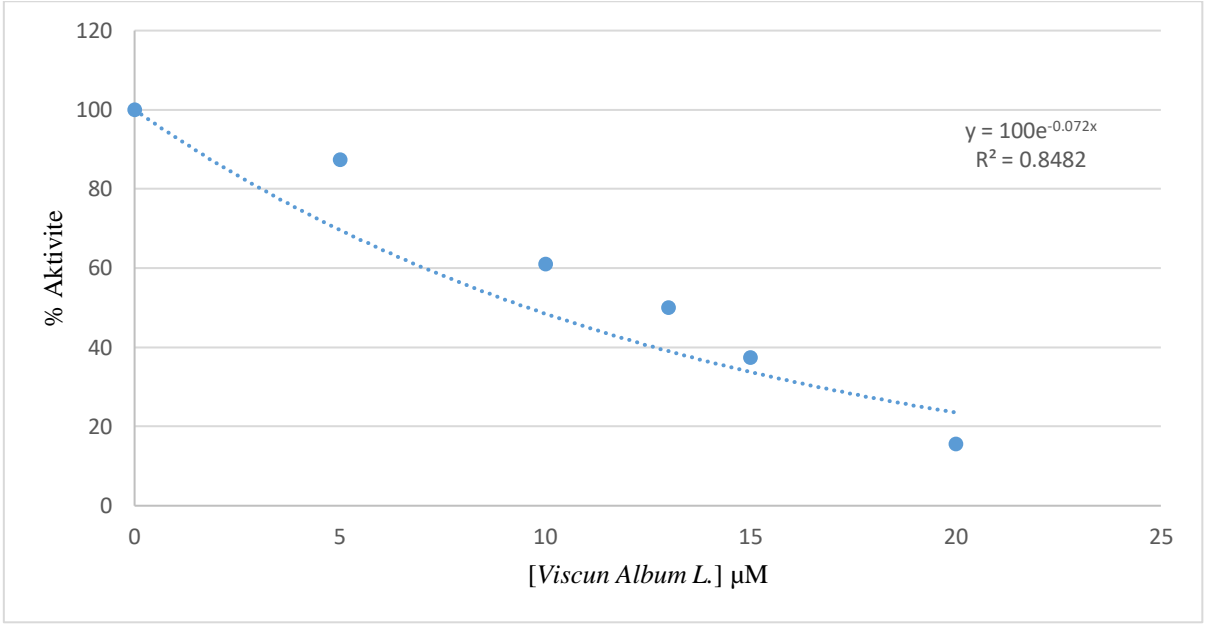
Şekil 15. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) meyve kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



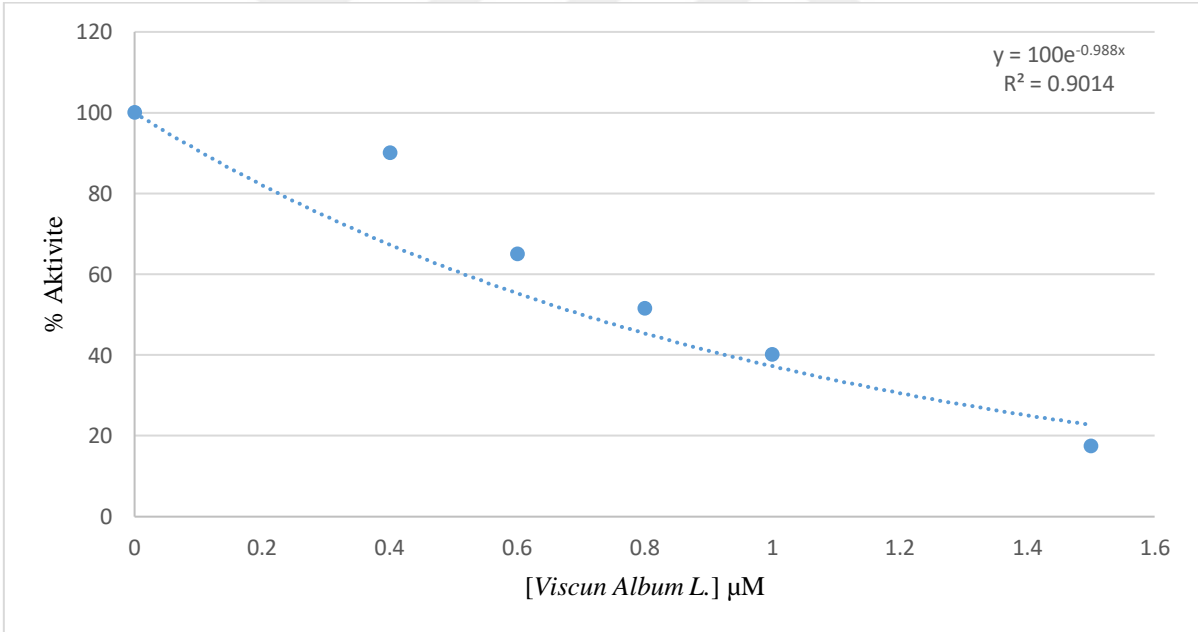
Şekil 16. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) yaprak kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



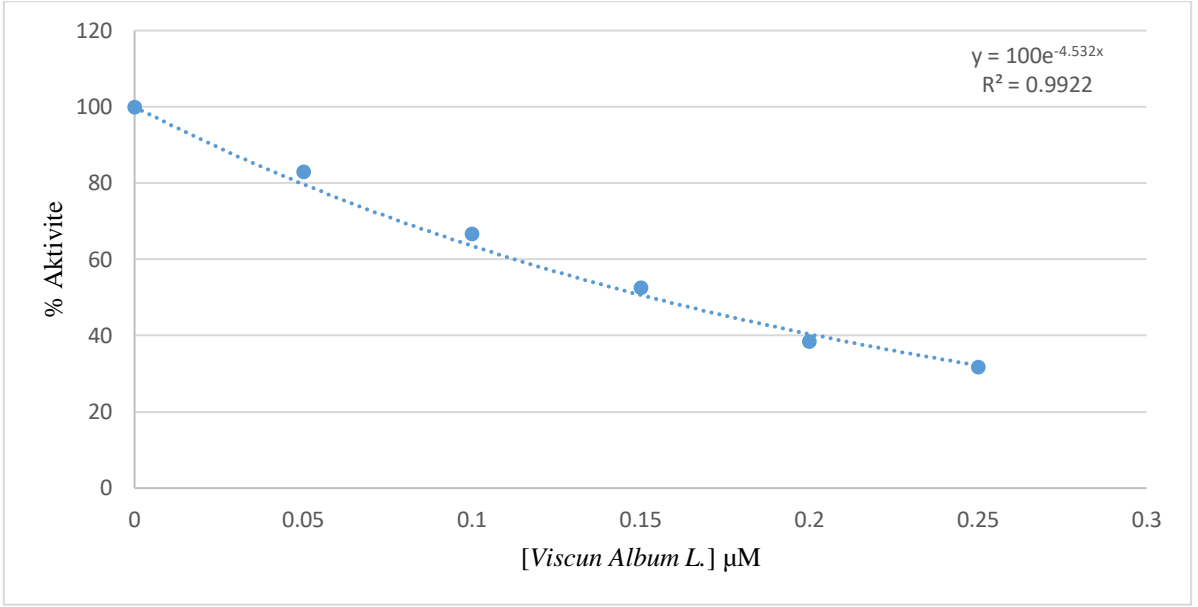
Şekil 17. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) yaprak kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



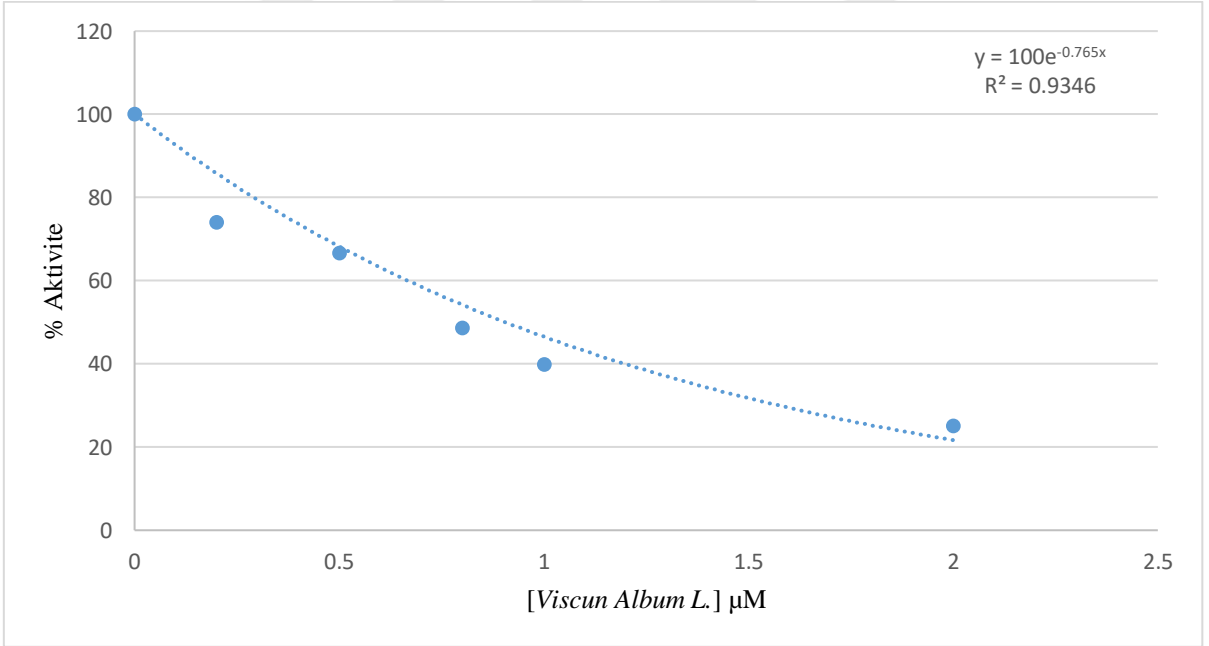
Şekil 18. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) yaprak kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



Şekil 19. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscun Album L.* (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan etil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



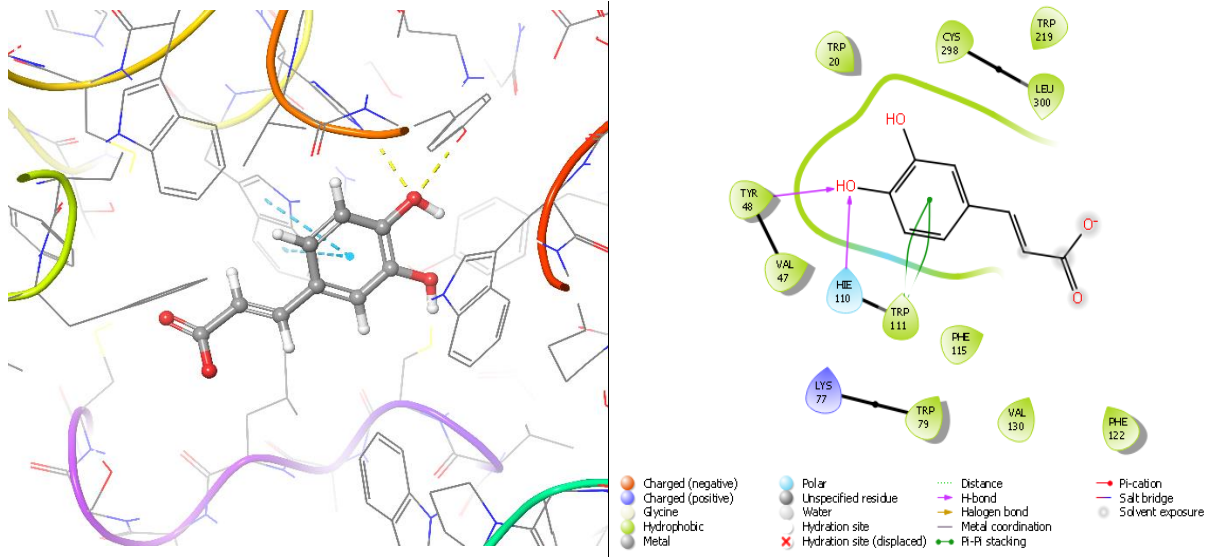
Şekil 20. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscum Album L.* (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan metil alkol ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.



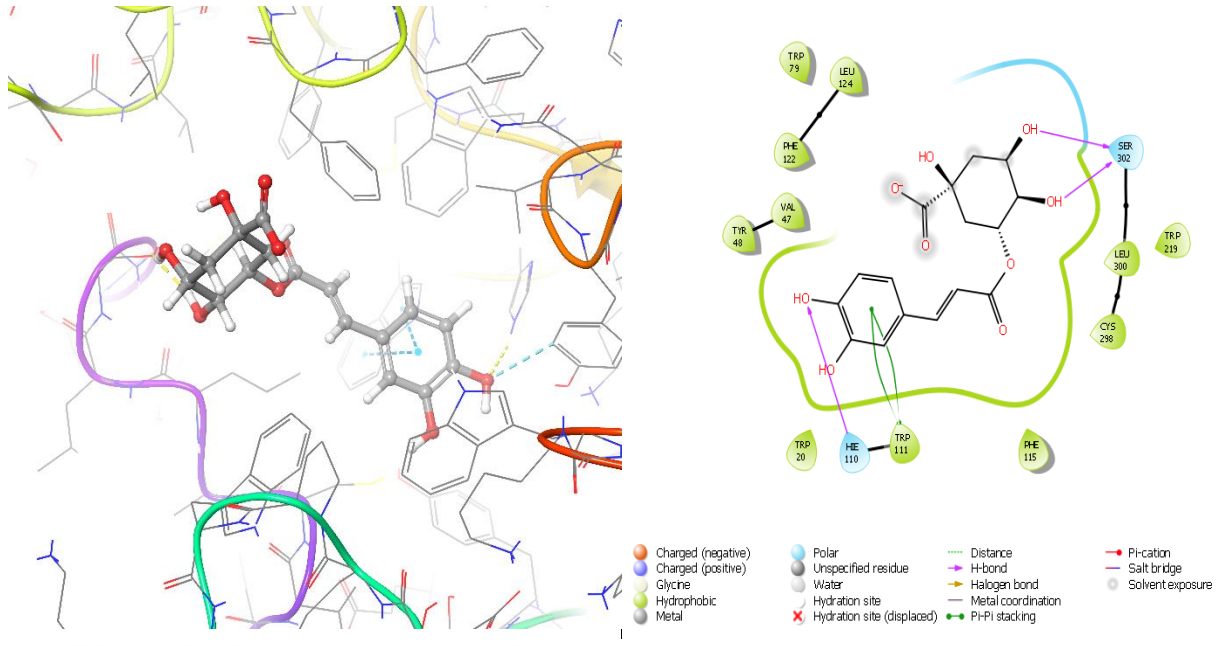
Şekil 21. Aldoz Redüktaz enzim aktivitesi üzerine *Viscum Album L.* (Ökse Otu) gövde kısmı ile hazırlanan su ekstraktının farklı inhibitör konsantrasyonlarında edinilen %Aktivite grafiği.

## AR enzime karşı inhibisyon etkisi gösteren *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde bulunan bileşikler için yapılan moleküler docking çalışması sonuçları.

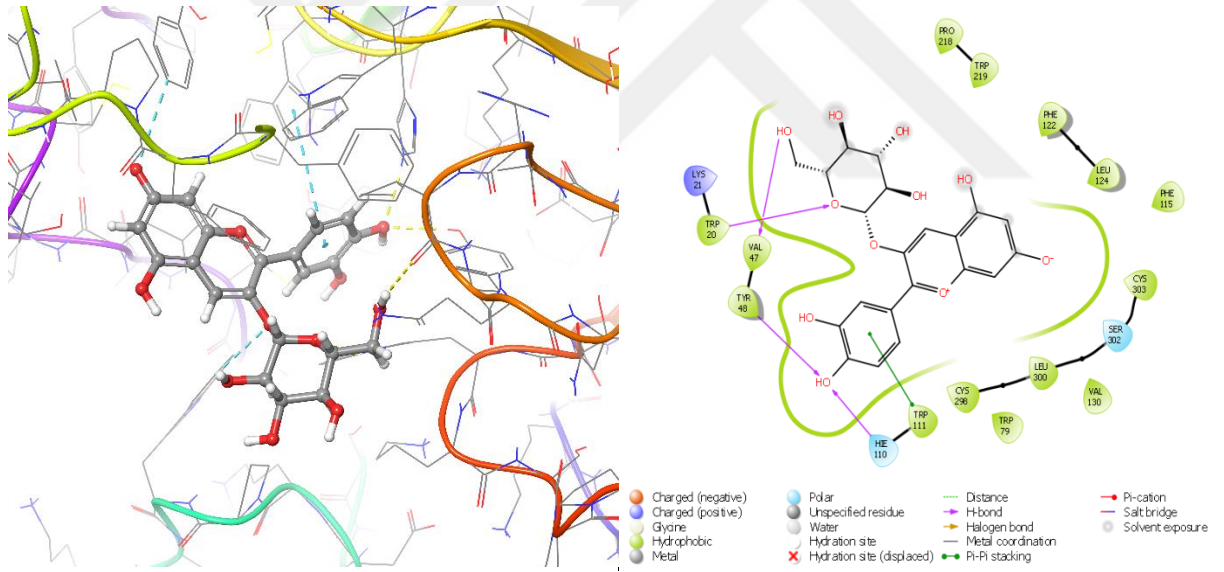
AR enzime karşı inhibisyon etkisi gösteren *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde bulunan bileşiklerin, inhibisyon mekanizmalarını belirlemek amacıyla moleküler docking simülasyonları yapıldı. Bu amaçla, materyal-metot kısmında belirtildiği gibi hazırlanan ligand(bileşik)lar, aldoz redüktaz enziminin yüksek çözünürlüklü X-Ray kristal yapısına kenetlendi. Bileşiklerinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 2 boyutlu (2D) ligand-enzim etkileşim diyagramları ve 3 boyutlu (3D) docking pozları aşağıda verilmiştir.



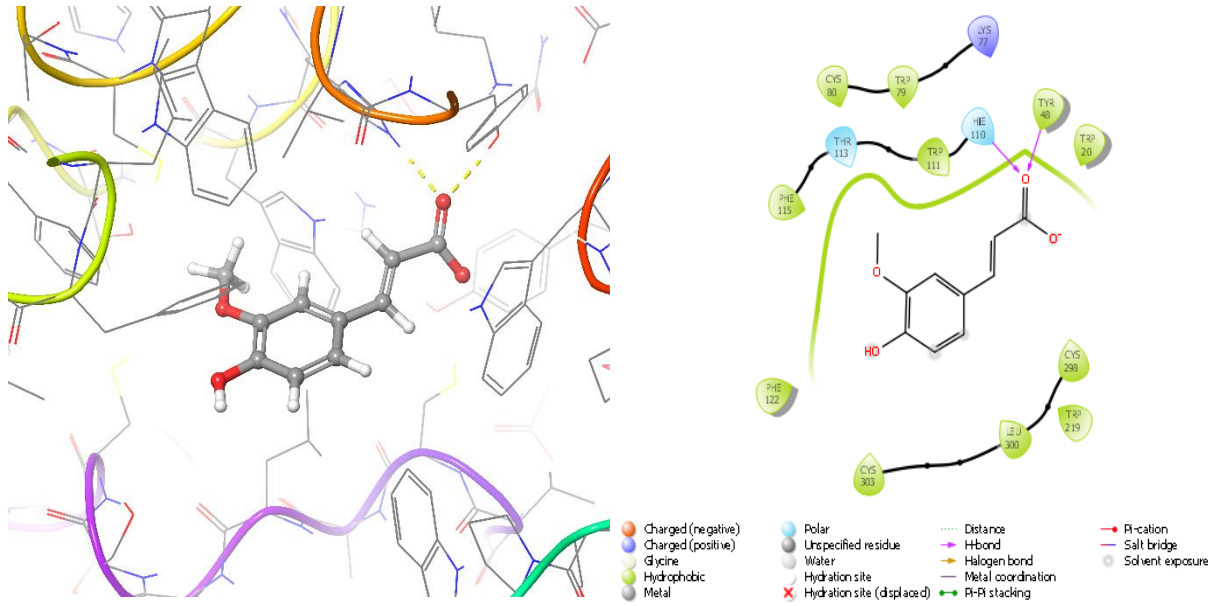
Şekil 22. Caffeic Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



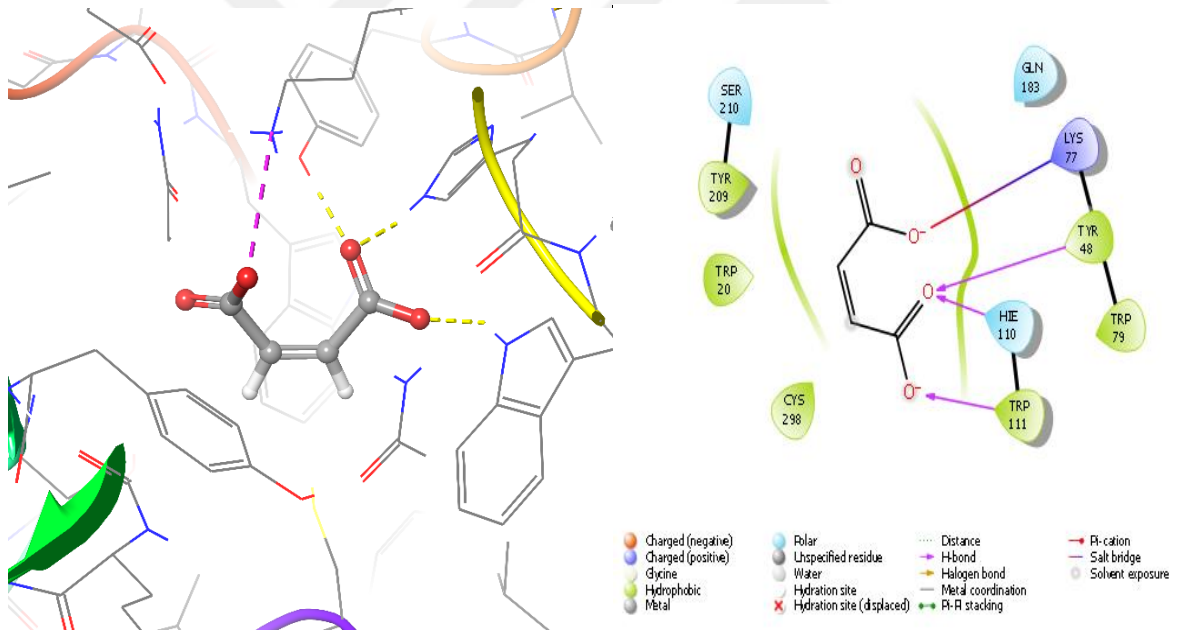
Şekil 23. Chlorogenic Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



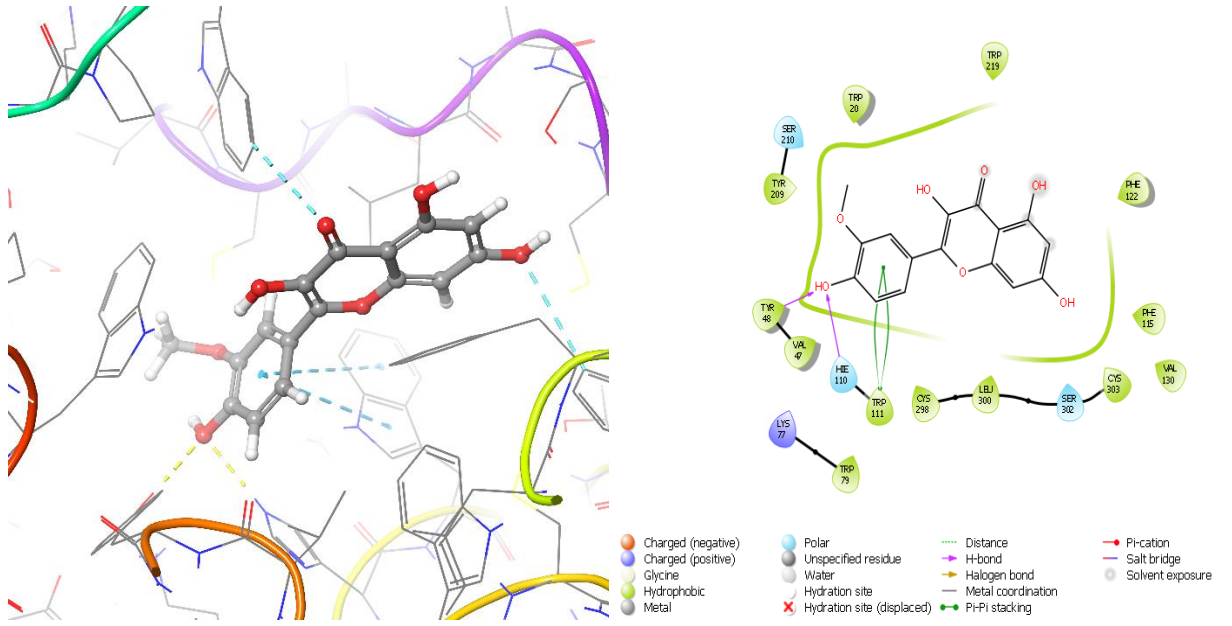
Şekil 24. Cyanidin-3-o-glucoside bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



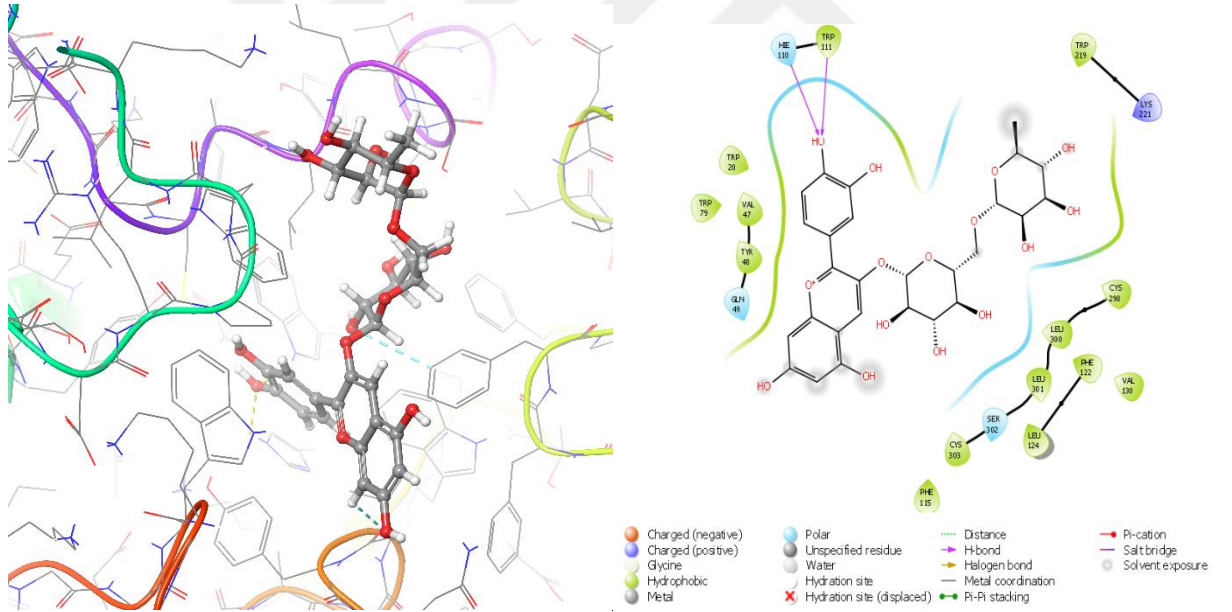
Şekil 25. Ferulic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



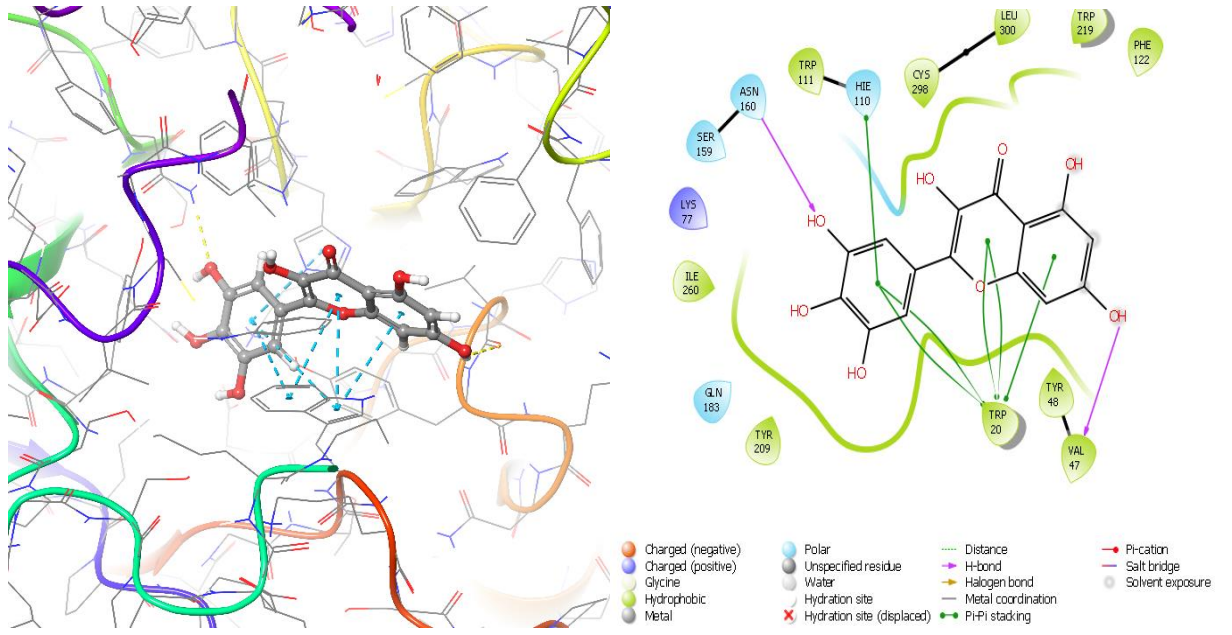
Şekil 26. Fumaric Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



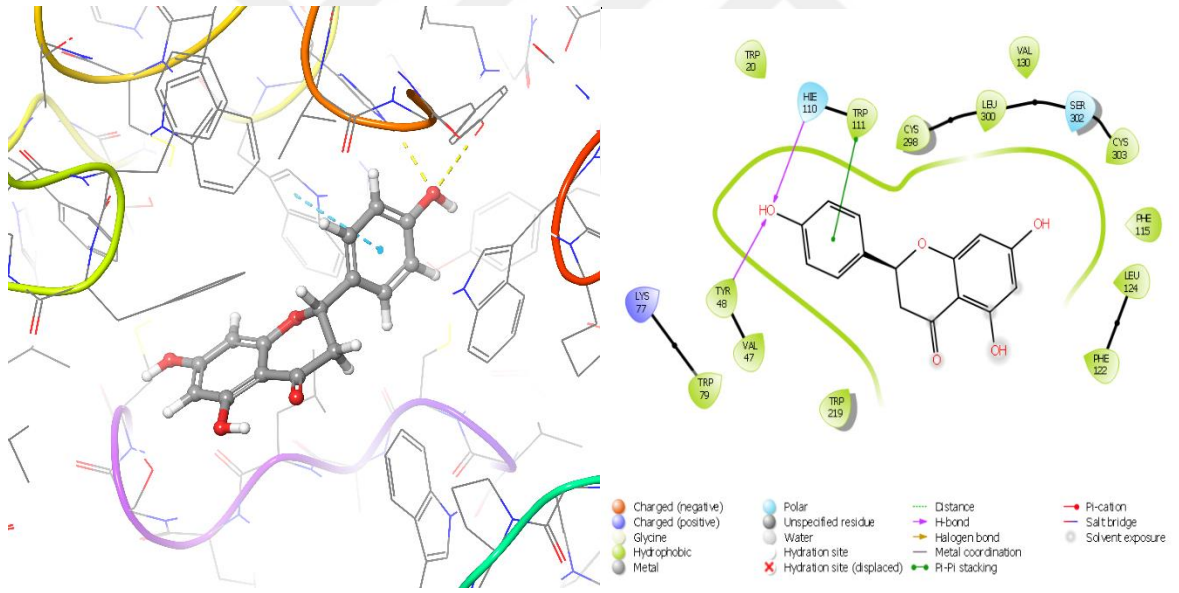
Şekil 27. Isorhamnetin bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



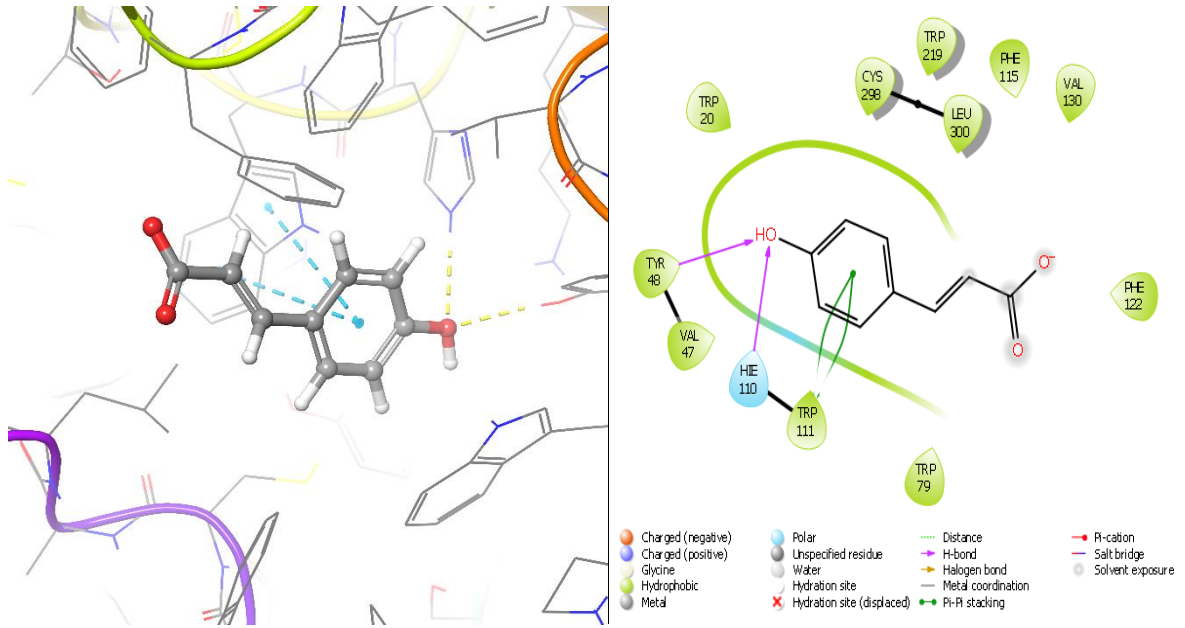
Şekil 28. Keracyanin Chloride bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



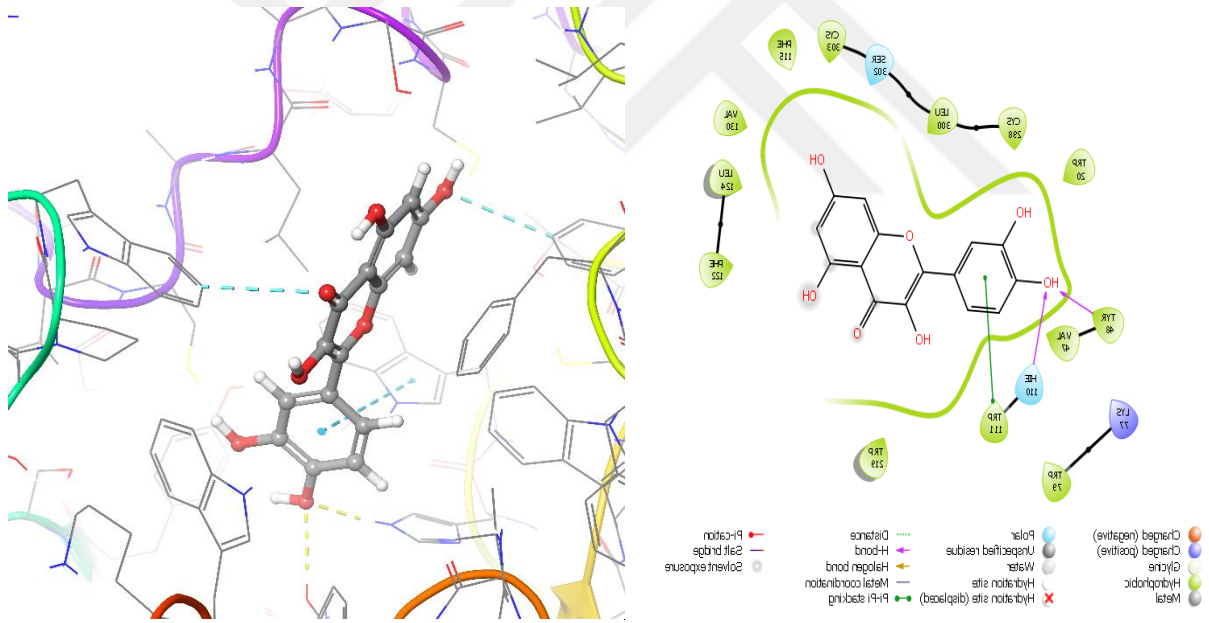
Şekil 29. Myricetin bileşiminin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



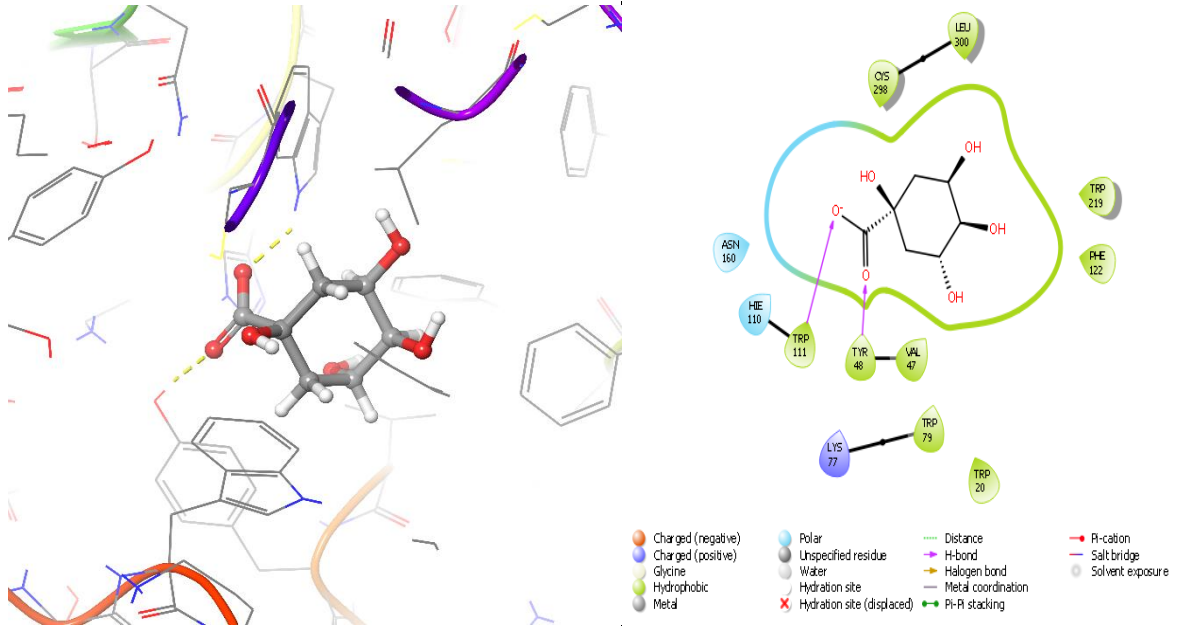
Şekil 30. Naringenin bileşiminin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



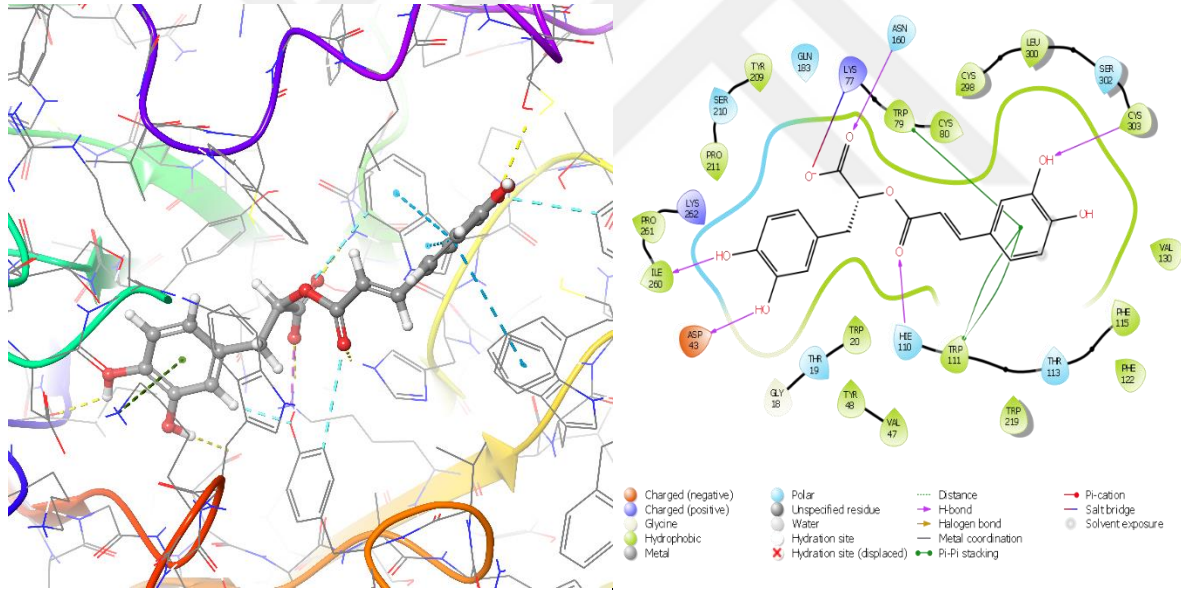
Şekil 31. p-Coumaric Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



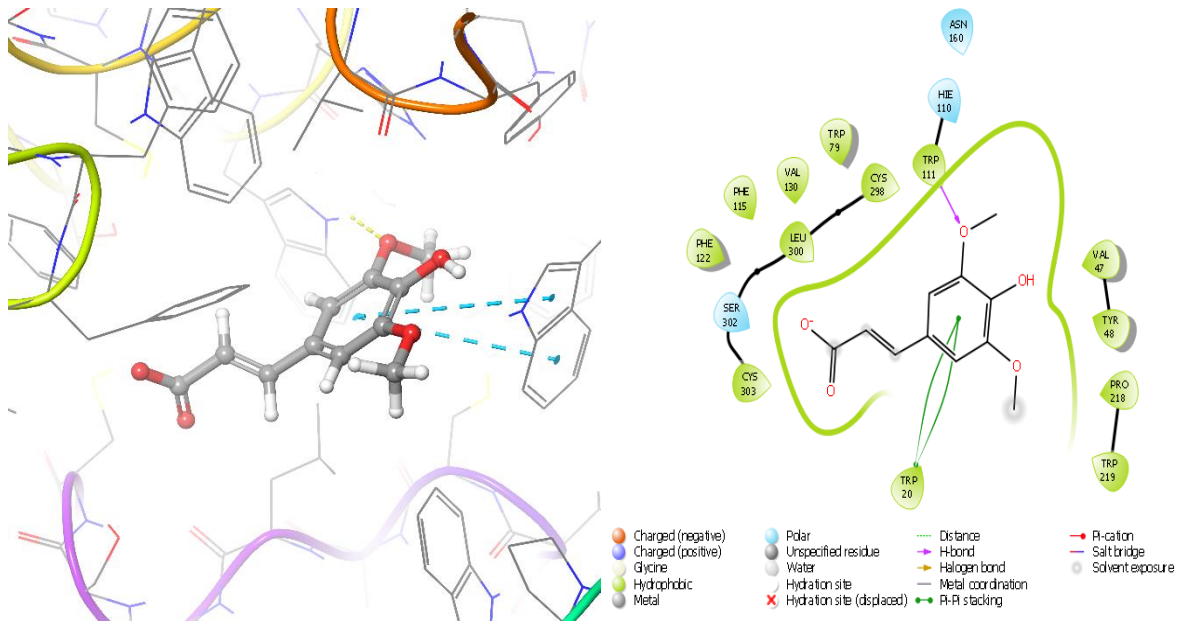
Şekil 32. Quercetin bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



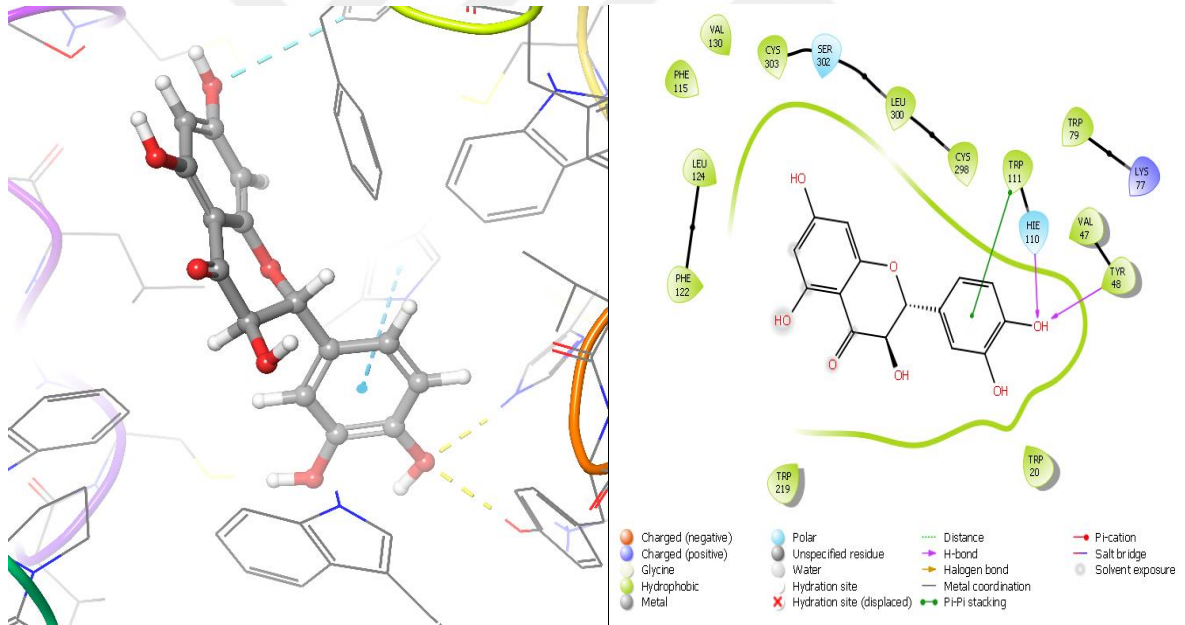
Şekil 33. Quinic Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



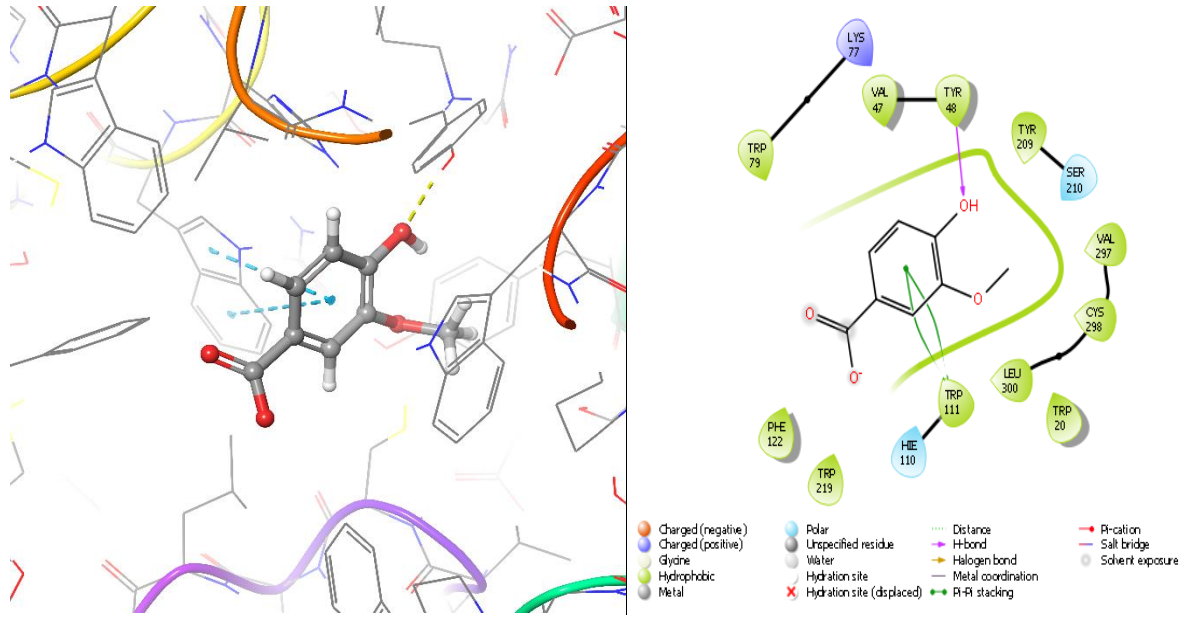
Şekil 34. Rosmarinic Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



Şekil 35. Sinapic Acid bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



Şekil 36. Taxifolin bileşiğinin AR enzime karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramı (sağ).



Şekil 37. Vanillic Acid bileşiğinin AR enzimine karşı moleküler docking sonucu edinilen 3D docking pozunu (sol) ve 2D ligand-enzim etkileşim diyagramını (sağ).

Tablo 7. AR enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenen *Viscum Album L.* bitkisinin yapısında bulunan bileşikler için yapılan moleküler docking çalışmalarıyla edinilen docking skorları.

Bileşik	docking score	XP GScore
Rosmarinic Acid	-12,76128748	-12,76128748
Quercetin	-10,97426343	-11,00626343
Isorhamnetin	-10,96748429	-10,99948429
Cyanidin-3-o-glucoside	-10,88684612	-12,78804612
Chlorogenic Acid	-10,87931967	-10,88191967
Taxifolin	-10,87225347	-10,89945347
Keracyanin Chloride	-10,00778752	-10,09268752
Myricetin	-9,52848884	-9,56578884
Naringenin	-9,351226809	-9,369526809
Caffeic Acid	-7,768763381	-7,768763381
Sinapic Acid	-7,203330657	-7,203330657
Vanillic Acid	-6,972049648	-6,972049648
Ferulic Acid	-6,887545364	-6,887545364
Quinic Acid	-6,853810928	-6,854010928
p-Coumaric Acid	-6,749047514	-6,749047514
Fumaric Acid	-3,383626381	-3,427626381

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### Tartışma ve Sonuç

Kronik Hipeglisemi, diabetes mellitus olarak adlandırılan kompleks bir rahatsızlıktır ve bu durum metabolik hasara yol açar. Ayrıca, diabetes mellitus'e bağlı olarak kardiyovasküler komplikasyon riski de artmaktadır. Aynı zamanda tedavi edilmemiş veya tedavisi gecikmiş diabetli bireylerde, hastalık sıklığı ve ölümlerin majör sebebi kardiyovasküler sorunlardır (O'Keefe, *vd.* 1999).

Diabete bağlı, damar kaynaklı sorunların oluşumunda ve gelişmesinde majör tehditlerin başında hipeglisemi gelir. Hipeglisemi, kimi metabolik yolların aktivitesinde artışa neden olur. Aktif hale gelen bu metabolik yollar neticesinde oksidatif stres gelişir, bu da damar içi tabaka fonksiyonlarında bozukluklara yol açar. Bu durum birçok vasküler komplikasyona nedeni olarak kabul edilir (UKPDS Research Group, 1998; Temelkova-Kurktschiev, *vd.* 2000).

Diabet kaynaklı komplikasyonların ortaya çıkmasındaki önemli mekanizmalardan birisi de, kan glukoz konsantrasyonunun artmasıyla aktif hale gelen sorbitol yoludur. Bu yolda, glukoz, ilk ve hız kısıtlayıcı enzim olan aldol reductase (AR) tarafından sorbitole indirgenirken oluşan sorbitol, sorbitol dehidrogenaz (SHD) enzimi tarafından fruktoza oksitlenir. AR, retina, nöral tabaka, glomerul ve endotel gibi dokularda GLUT-4 ve insülin bağımsız olarak glukoz alımını gerçekleştirir. Bu yoldaki AR enziminin yüksek Km değeri nedeniyle normal koşullarda aktif değildir. Ancak hipeglisemi durumunda poliyol yolu aktif hale gelir ve hücre içinde glukoz türevleri olan metilglioksal ve asetol birikimine neden olur. Sorbitol, hücre membranlarını kolayca geçemediği için dokularda ozmotik etki oluşturarak tahribata sebebiyet verebilir (Williams, & Pickup, 2004).

Doğaki pek çok bitki, fenolik bileşik bakımından zengin bir içeriğe sahip olup doğal antioksidan ve antimikrobiyal özellikler taşımaktadır. Bu nedenle, bu bitkiler son yıllarda biyoteknolojik bakımdan önem kazanmaya ve kronik hastalıkların tedavisi için alternatif tedavi kaynağı olarak tercih edilmeye başlanmıştır. Günümüzdeki önemli sağlık sorunlarından birisi olan diabet hastalığının tedavisinde anti-diabetik özellik taşıyan bu bitkilerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu özelliklere sahip bitkiler, son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Bu özelliklere sahip bitkilerden birisi olan ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ökse otunun (*Viscum album L.*), diabet hastalığının tedavisinde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sebep göz önünde bulundurularak,

yaptığımız bu çalışmada Erzurum ili, Olur ilçesine bağlı Ormanağzı bölgesinden toplanan çam ağacı üzerinde yetişen ökse otu bitkisinin üç farklı çözen (etanol, metanol ve su) ile hazırlanmış ekstraktlarının fenolik madde içerik tayinleri, *in vitro* ve *in silico* enzim inhibisyon aktivite tayinleri yapılmıştır. Bu çalışmadan edinilen sonuçlardan yola çıkarak yüksek bir biyolojik aktiviteye sahip olan ökse otu (*Viscum Album L.*) bitkisinin AR inhibisyonunda önemli bir aktör olduğu ve anti-diabetik ilaç endüstrisinde alternatif bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

Yaptığımız çalışmada, 0,486 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip olan AR enzimi, sırasıyla homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi (0-70%) ve diyaliz işlem basamaklarıyla koyun böbreğinden %44,43 verimle ve yaklaşık 1,09 kat kısmi saflaştırılmıştır.

Yüksek rakımlarda yetişen bazı bitkilerde doğal olarak bulunan flavonoidler bitki fizyolojisi ve biyokimyası açısından oldukça büyük bir öneme sahip olmakla birlikte antioksidan, enzim inhibitörü ve toksik bileşiklerin öncüsü olarak davranmaktadırlar. Memeli enzim sistemindeki çoğu enzimi inhibe edebilen flavonoidler, önemli metabolik yolları da etkilemektedir. Bitkilerden saflaştırılan polifenoller ve özellikle flavonoidlerin belirli bir kısmının AR enzimini inhibisyonunda etkili olduğu geçmiş yıllardaki pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Lopez-Lazaro, 2002; Fernandez, vd. 2005; Goodarzi, vd. 2005; Yadav, vd. 2010; Patel, & Mishra, 2012).

Erzurum ili, Olur ilçesi sınırlarında bulunan Ormanağzı bölgesindeki sarıçam ağaçlarından topladığımız *Viscum Album L.* bitkisi harmanlanarak meyve, yaprak ve gövde olmak üzere üç kısma ayrılarak her bir kısım için etanol, metanol ve su kullanılarak hazırladığımız dokuz ayrı ekstraktın DAYTAM laboratuvarında yapılan fenolik bileşik içerik analizlerinde; *Viscum Album L.* bitkisinin meyve kısımları ile hazırlanan etanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, Vanillic Acid, p-Coumaric Acid, Sinapic Acid, Ferulic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin, Isorhamnetin bulunduğu, *Viscum Album L.* bitkisinin meyve kısımları ile hazırlanan metanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Vanillic Acid, p-Coumaric Acid, Sinapic Acid, Ferulic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin, Isorhamnetin bulunduğu ve *Viscum Album L.* bitkisinin meyve kısımları ile hazırlanan su ekstraktlarında ise, Quinic Acid, Fumaric Acid, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Vanillic Acid, Sinapic Acid, Ferulic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin bulunduğu belirlenmiştir.

*Viscum Album L.* bitkisinin yaprak kısımları ile hazırlanan etanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, p-Coumaric Acid, Sinapic Acid, Taxifolin, Ferulic Acid, Rosmarinic Acid, Myricetin, Quercetin, Naringenin, Isorhamnetin bulunduğu, *Viscum Album L.* bitkisinin yaprak kısımları ile hazırlanan metanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Vanillic Acid, p-Coumaric Acid, Sinapic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin, Isorhamnetin bulunduğu ve *Viscum Album L.* bitkisinin yaprak kısımları ile hazırlanan su ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Ferulic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin bulunduğu belirlenmiştir.

*Viscum Album L.* bitkisinin gövde kısımları ile hazırlanan etanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, p-Coumaric Acid, Sinapic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin bulunduğu, *Viscum Album L.* bitkisinin gövde kısımları ile hazırlanan metanol ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin bulunduğu ve *Viscum Album L.* bitkisinin gövde kısımları ile hazırlanan su ekstraktlarında, Quinic Acid, Fumaric Acid, Keracyanin Chloride, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Vanillic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin, Naringenin bulunduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca yapılan analizlerde elde sonuçlara göre, bütün ekstraktlarda Quinic Acid, Fumaric Acid, Cyanidin-3-o-glucoside, Chlorogenic Acid, Rosmarinic Acid, Quercetin ve Naringenin bulunduğu tespit edilmiştir.

Yine yapılan analizlerde elde sonuçlara göre, Caffeic Acid bileşiğinin sadece meyve kısmı etanol ekstraktında, Taxifolin ve Myricetin bileşiklerinin sadece yaprak kısmı etanol ekstraktında bulunduğu tespit edilmiştir.

Diabetik komplikasyonları engellemek ya da geciktirmek amacı ile günümüze kadar yapılan çalışmalara bir katkıda bulunmak ve bu anlamda umut olmak adına planladığımız tez çalışmasında *Viscum Album L.* bitkisinin meyve, yaprak ve gövde kısımları kullanılarak hazırlanan etil alkol, metil alkol ve su ekstraktlarının AR enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini *in vitro* ve *in silico* olarak incelenmesi amaçladık.

Ülkemizde yapılan bir çalışmaya göre *Fabaceae* ailesine ait olan *G. Glabra*, *Tiliaceae* ailesine ait olan *T. tomentosa* ve *Lamiaceae* ailesine ait olan *L. stoechas*, *O. basilicum*, ve *M. officinalis*, ve bitki özütlerinin sıgır lens AR enzimine olan inhibitör

etkilerinin IC50 değerleri sırayla 25.53, 31.76, 39.28, 45.89 ve 54.15 µg/mL olarak bulunmuştur (Onay, 2008).

Yaptığımız çalışmada, *Viscum Album L.* (ökse otu) bitkisinin meyve kısmı ile hazırlanan etanol, metanol ve su ekstraktlarının, AR enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisinin IC50 değerleri sırasıyla 1.174 µg/ml, 0.860 µg/ml ve 1.560 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Viscum Album L.* (ökse otu) bitkisinin yaprak kısmı ile hazırlanan etanol, metanol ve su ekstraktlarının, AR enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisinin IC50 değerleri sırasıyla 1.090 µg/ml, 0.190 µg/ml ve 9.260 µg/ml olarak belirlenmiştir. *Viscum Album L.* (ökse otu) bitkisinin gövde kısmının etanol, metanol ve su ekstraktlarının, AR enzim aktivitesine olan inhibisyon etkisinin IC50 değerleri sırasıyla 0.700 µg/ml, 0.153 µg/ml ve 0.906 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak *Viscum Album L.* bitkisinin gövde kısmının methanol çözüne kullanılarak hazırlanan ekstraktın AR enzime karşı, 0.156 µM IC50 değeri ile en güçlü inhibisyon etki gösteren ekstrakt olduğu belirlenmiştir.

AR enzimi üzerine inhibisyon etki gösteren *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde bulunan bileşiklerin muhtemel AR enzimi etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla moleküler docking çalışmaları yapılmıştır. Bu bitkinin içeriğinde en fazla bulunan bileşiklerden biri olan Quinic asit bileşiği AR enzime karşı -6,85 kcal/mol ile oldukça yüksek bağlanma skoru göstermiştir. Quinic asit bileşiği AR enziminin aktif merkezinde TYR48 ve TRP111 amino asit rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunmuştur (Şekil 33). *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde en fazla bulunan bir diğer bileşik olan Chlorogenic asit bileşiği AR enzime karşı -10,88 kcal/mol ile oldukça yüksek bağlanma skoru göstermiştir. Chlorogenic asit bileşiği AR enziminin aktif merkezinde HIS110 ve SER302 amino asit rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunurken TRP111 amino asit rezidüsüyle de ikili pi-pi etkileşiminde bulunmuştur (Şekil 23). *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde en fazla bulunan bir diğer bileşik olan Naringenin bileşiği AR enzime karşı -9,37 kcal/mol ile oldukça yüksek bağlanma skoru göstermiştir. Naringenin bileşiği AR enziminin aktif merkezinde HIS110 ve TYR48 amino asit rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunurken TRP111 amino asit rezidüsüyle de pi-pi etkileşiminde bulunmuştur (Şekil 30). *Viscum Album L.* bitkisinin içeriğinde en fazla bulunan bir diğer bileşik olan Fumaric asit bileşiği AR enzime karşı -3,42 kcal/mol bağlanma skoru göstermiştir. Bitki içeriğinde fazlaca miktarda bulunmasına rağmen bileşiğin yapısının oldukça küçük olmasından dolayı düşük bağlanma skoru gösterdiği sonucu çıkarılabilir. Fumaric asit bileşiği AR enziminin aktif merkezinde

HIS110, TRP111 ve TYR48 amino asit rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunurken LYS77 amino asit rezidüsüyle de tuz köprüsü etkileşiminde bulunmuştur (Şekil 26). *Viscun Album L.* bitkisinin içeriğinde en fazla bulunan bir diğer bileşik olan Cyanidin-3-o-glucoside bileşiği AR enzime karşı -12,78 kcal/mol ile bağlanma skoru en yüksek olan bileşiklerden biri olmuştur. Cyanidin-3-o-glucoside bileşiği AR enziminin aktif merkezinde HIS110, TYR48, TRP20 ve VAL47 amino asit rezidüleriyle hidrojen bağı etkileşiminde bulunurken TRP111 amino asit rezidüsüyle de pi-pi etkileşiminde bulunmuştur (Şekil 24).

*Viscun Album L.* bitkisinin içeriğinde bulunan bileşikler için yapılan moleküler docking çalışmaları bu bileşiklerin AR enzimini muhtemel inhibisyonlarında HIS110, TYR48 ve TRP111 amino asit rezidüleriyle olan etkileşimlerin oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur.



## KAYNAKÇA

- Abou-Seif, M., & Youssef, A. (2004). Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, 346(2), 161-170.
- Akileshwari, C., Muthenna, P., Nastasijević, B., Joksić, G., Petrash, J., & Reddy, G. (2012). Inhibition of aldose reductase by *Gentiana lutea* extracts. *Journal of Diabetes Research*, 2012.
- Alemzadeh, R., & Wyatt, D. (2004). Diabetes Mellitus. R. Behrman, R. Kliegman, & H. Jenson içinde, *Nelson Textbook of Pediatrics* (Cilt 17 edition, s. 1947-72). Pennsylvania: Saunders.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, J., & Demopoulos, V. (2009). Aldose reductase enzyme and its implications to major health problems of the 21th century. *Current Medicinal Chemistry*, 16(6), 734-752.
- Alım, Z., & Beydemir, Ş. (2012). Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol Dehydrogenase Archives of Physiology and Biochemistry. *Early Online*, 1-9.
- Amos, A., McVarty, D., & Zimmot, P. (2010). The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year. *Diabetic Med.*, 1997, 14-755.
- Anonymous. (1999). World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease Surveillance: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO Publication, Geneva*, 1-59.
- Anonymous. (2004). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27(1), 5-10.
- Ascenzi, J. (1996). Handbook of Disinfectants and antiseptics. *Marcel Dekker Inc.* içinde Newyork: M.
- Barski, O., Tipparaju, S., & Bhatnagar, A. (2008). The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification Drug Metabolism Reviews. 40, 553-624.
- Bayazit, V. (2004). Cytotoxic Effects of Some Animal and Vegetable Extracts and Some Chemicals on Liver and Colon Carcinoma and Myosarcoma. *Saudi Med J.*, 25, 156-163.

- Baynes, J., & Thorpe, S. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.
- Baytop, T. (1963). *Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri*. İstanbul: İsmail Akgün Matbaası.
- Baytop, T. (1982). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- BAYTOP, T. (1999). Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. *Nobel Tıp Kitap Evleri(2)*, 975-420-21.
- Bhadada, S., Sahay, R., Jyotsna, V., & Agrawal, J. (2001). Diabetic neuropathy: Current concepts. *Clinical Medicine*, 2(4), 305-318.
- Bowman, I. (1990). The Everlasting Mistletoe and the Cardiovascular System. *Texas Heart Inst J*, 17, 4-310.
- Bozdemir, H. (2001). Diyabetik Otonomik Nöropati Kliniği. 1. *Ulusal Diyabetik Nöropati Sempozyumu*, (s. 143-153). Mersin.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brownlee, M. (1992). Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes care*, 15(12), 1835-1843.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813-820.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Bukan, N., Sancak, B., Bilgihan, A., Kosova, F., Buğdaycı, G., & Altan, N. (2004). The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26(7), 519-522.
- Cameron, N., & Cotter, M. (1996). Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular complications of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism*, 45, 1147–1152.
- Chappey, O., Dosquet, C., Wautier, M., & Wautier, J. (1997). Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur. J. Clin. Invest.*, 27, 97-108.

- Chibber, R., Chibber, S., & Kohner, E. (2007). 21st Century treatment of diabetic retinopathy. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 2(5), 623–631.
- Coegniet, E., & Elek, E. (1987). Immunomodulation with *Viscum album* and Echinacea Purpurea Extracts. *Onkologie*, 10, 27-33.
- Davidson, J. (1991). Clinical Diabetes Mellitus, Diabetic Eye Disease. *Thime Medical Puplishers*, 427-444.
- Dietrich, J., Ribereau-Gayon, G., & Jung, M. (1992). Identity of the N-terminal Sequences of the Three A Chains of Mistletoe (*Viscum album* L.) Lectins: Homology with Ricin-like Plant Toxins and Single-chain Ribosome-inhibiting Proteins. *Anticancer Drugs*, 3, 507-511.
- Dinçer, Y., Akçay, T., Alademir, Z., & İlkova, H. (2002). Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 51(10), 1360-1362.
- Donkin, S., Bertics, S., & Armentano, L. (1997). Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. *J. Anim Sci.*, 75(11), 3082-7.
- Dunlop, M. (2000). Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58(77), 3-12.
- Ergün, F. (2001). *Lonicera iberica* M. Bieb.: Investigation Antioxidant Activity and Bioactive Chemicals. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(6), 1124-1128.
- Fernandez, M., Caballero, J., Helguera, A., Castro, E., & Gonzalez, M. (2005). Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 3269-3277.
- Ferrannini, E., Buzzigoli, G., Bonadonna, R., Giorico, M., Oleggini, M., Graziadei, L., . . . Bevilacqua, S. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 317(6), 350-7.
- Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., & Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *In Molecules*, 20(7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- Fiallo-Scharer, R., & Eisenbarth, G. (2004). Patophysiology of Insulin. *Dependent Diabetes*.

- Flynn, T. (1982). Aldehyde reductases: monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential. *Biochem. Pharmacol*, 31, 2705-2712.
- Forsblom, C., Groop, P., Ekstrand, A., Totterman, K., Sane, T., & Saloranta, C. (1998). Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care*, 21, 1932-8.
- Fukunaga, T., Kajikawa, I., Nishiya, K., Watanabe, Y., Słzsk1, N., Takeya, K., & Itokowa, H. (1983). Studies on the constituents of the European mistletoe. *Viscum Album L. il*, *Chem. Pharm. Bull.*, 36(3), 1185-1189.
- Gacche, R., & Dhole, N. (2011). Aldose reductase inhibitory, anti-cataract and antioxidant potential of selected medicinal plants from the Marathwada region, India. *Natural Product Research*, 25(7), 760-763.
- Garcia, S., Virag, L., Jagtap, P., Szabo, E., Mabley, J., Liaudet, L., . . . Szabo, C. (2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.*, 7, 108-113.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H., & Rahmat, A. (2011). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), 1147-1154.
- Gill, L. (1953). Plant Diseases the Yearbook of Agriculture. *U.S Department of Agriculture* (s. 73-77). içinde Washington: D.C.
- Gilligan, J., & Spector, S. (1984). Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*, 6(suppl III), 11144-9.
- Giugliano, D., Paolisso, G., & Ceriello, A. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19(3), 257-267.
- Gleissner, C., Galkina, E., Nadler, J., & Ley, K. (2007). Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(3), 131-140.
- Gonda, R., Tomoda, M., Shimizu, N., & Kanari, M. (1990). Characterization of an Acidic Polysaccharide from the Seeds of *Malva verticillata* Stimulating the Phagocytic Activity of Cells of the RES. *Planta Med*, 56, 6-73.

- Goodarzi, M., Zal, F., Malakooti, M., Safari, M., & Sadeghian, S. (2005). Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Medica Iranica*, 44(1), 42-45.
- Grandhee, S., & Monnier, V. (1991). Mechanism of formation of the Maillard protein crosslink pentosidine. *Glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. J.Biol. Chem.*, 266, 11649-11653.
- Gray, A., & Flatt, P. (1999). Insulin-secreting Activity of the Traditional Antidiabetic Plant *Viscum album* (mistletoe). *J Endocrinol*, 160, 14-409.
- Greene, D., Lattimer, S., & Sima, A. (1987). Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.*, 316(10), 599-606.
- Grossarth-Maticek, R., Kiene, H., Baumgartne, R., & Ziegler, R. (2001). Use of Iscador, an Extract of European Mistletoe (*Viscum album*), in Cancer Treatment: Prospective Nonrandomized and Randomized Matched-pair Studies Nested within a Cohort study. *Altern Ther Health Med.*, 7, 57-66, 68-72.
- Guzman, A., & Guerrero, R. (2005). of aldose reductase by herbs extracts and natural substances and their role in prevention of cataracts. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2005(10), 3-4.
- Gürdöl, F., & Ademoğlu, E. (2010). *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Habeck, M. (2003). Mistletoe Compound Enters Clinical Trials. *DDT Vol. 8, No: 2*, 52-53.
- Haller, M., Atkinson, M., & Schatz, D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr. Clin. North Am.*(52), 1553-78.
- Hamada, Y., Araki, N., Horiuchi, S., & Hotta, N. (1996). Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrol. Dial. Transplant*, 11 Suppl 5, 95.
- Hamada, Y., Nakamura, J., Naruse, K., Komori, T., Kato, K., Kasuya, Y., . . . Hotta, N. (2000). Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care.*, 23, 1539-1544.
- Harvey, R., Champe, P., & Ferrier, D. (2007). *Biyokimya*. Bursa: Nobel Tıp Kitabevleri.

- Hasselbaink, D., Glatz, J., Luiken, J., Roemen, T., & Vusse, G. (2003). Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem. J.*, *371*(3), 753-760.
- Hers, H. (1956). The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta*, *22*(1), 202-3.
- Hollenbeck, C., & Reaven, G. (1987). Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *64*, 1169-73.
- Hoogwerf, B., Sferra, J., & Donley, B. (2006). Diabetes mellitus-Overview. *Foot Ankle Clinic*, *11*, 703-715.
- Hsueh, W., & Law, R. (1998). Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am. J. Med.*, *105*, 4-14.
- Humphrey, L., Ballard, D., Frohnert, P., Chu, C., O'fallon, W., & Palumbo, P. (1989). Chronic renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A population-based study in Rochester, Minnesota. *Ann. Intern. Med.*, *111*, 788-796.
- Hwang, Y., Sato, S., Tsai, J., Yan, S., Bakr, S., Zhan, H., . . . Ramasamy, R. (2002). Aldose reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *Faseb. J.*, *16*, 243-245.
- Hyndman, D., Bauman, D., Heredia, V., & Penning, T. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-biological interactions*, *143*, 621-631.
- Iwata, K., Nishinaka, T., Matsuno, K., Matsuno, T., Katsuyama, M., Ibi, M., & Yabe-Nishimura, C. (2007). The activity of aldose reductase is elevated in diabetic mouse heart. *Journal Pharmacological Sciences*, *103*, 408-416.
- Jakuš, V., & Rietbrock, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res.*, *53*, 131-142.
- Jez, J., Bennet, M., Schlegel, B., Lewis, M., & Penning, T. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.*, *326*, 625-636.
- Jiang, Z., Lin, Y., Clemont, A., Feener, E., Hein, D., Igarashi, M., . . . King, G. (1999). Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest*, *104*, 447-457.

- Kao, Y., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., & Silink, M. (1999). An aldose reductase intragenic polymorphism associated with diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 46, 155-160.
- Karasu, Ç., Öztürk, Y., Altan, N., Yıldızoğlu, N., İkizler, C., & Altan, V. (1990). Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *General Pharmacology*, 21(5), 735-740.
- Keha, E., & Küfrevioğlu, Ö. (2009). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Khivaja, T., Dias, C., & Pentecost, S. (1986). Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum Album L*) and its alkaloids. *Oncology*, 13(1), 42-50.
- Khwaja, T., Dias, C., & Pentecost, S. (1986). Recent Studies on the Anticancer Activities of Mistletoe (*Viscum album L.*) and Its Alkaloids. *Oncology*, 43(1), 42-50.
- Kikkawa, R., Koya, D., & Haneda, M. (2003). Progression of diabetic nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, 41(3), 19-21.
- Kilo, S., Berghoff, M., & Hilz, M. (2000). Endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. *Neurology*, 54, 1246-48.
- Kimmelstiel, P., & Wilson, C. (1936). Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. *American Journal of Pathology*, 12, 83-97.
- King, K., Jones, J., & Warthen, J. (2005). Microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 69(5), 1-10.
- Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A., & Ortiz, P. (1994). Regulation of expression of glucose transporters by glucose: A review of studies in vivo and in cell cultures. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 8, 43-53.
- Kubo, E., Urakami, T., Fatma, N., Akagi, Y., & Singh, D. (2004). Polyol pathway dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: Role of AOP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, 1050-1056.
- Kumar, P., & Reddy, G. (2007). Focus on molecules: Aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 739-740.
- Kurowska, E. (2002). Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des.*, 8, 155-66.

- Kurt, M., Atmaca, A., & Gürlek, A. (2004). Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 12-17.
- Kyselova, Z., Stefek, M., & Bauer, V. (2004). Pharmacological prevention of diabetic cataract. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18, 129-140.
- Lal, S., Szwegold, B., Taylor, A., Randall, W., Kappler, F., & Brown, T. (1995). Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 36, 969-973.
- Lee, A., & Chung, S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB. J.*, 13, 23-30.
- Lehmann, R., & Schleicher, E. (2000). Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta*, 297, 135–144.
- Lehninger, A. (2005). *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers Inc.
- Lim, S., Jung, S., Ji, J., Shin, K., & Keum, S. (2001). Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 653-668.
- Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15, 203-210.
- Lopez-Lazaro, M. (2002). Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2(6), 691-714.
- Luther , P., Sehart, I., Bergmann, K., & Reutgen, H. (1987). Allergy and Lectins: Action Between IgE-mediated Histamine Release and Glycoproteins from *Viscum album L.* (mistletoe). *Acta Biol Med Ger.*, 37, 1623-1628.
- Luther, P., Sehart, I., Bergmann, K., & REUTGEN, H. (1978). Allergy and Lectins: Action Between IgE-mediated Histamine Release and Glycoproteins from *Viscum album L.* (mistletoe). *Acta Biol Med Ger.*, 37, 1623-1628.
- Maritim, A., Sanders, R., & Watkins, I. (2003). Diabetes, oxidative stress and antioxidants. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(1), 4-38.
- Mithieux, G., Vidal, H., Zitoun, C., Bruni, N., Daniele, N., & Minassian, C. (1996). Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes*, 45(7), 891-896.

- Morre, D., Lenaz, G., & Morre, D. (2000). Surface oxidase and oxidative stress propagation imaging. *J. Exp. Biol.*, 203, 1513-1521.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur. J Biochem.*, 219(3), 713-25.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., & Brownlee, M. (2000). The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.*, 58(77), 26-30.
- Nishimura, C. (1998). Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacol. Rev.*, 50, 21.
- O'Keefe, J., Miles, M., Harris, W., Moe, R., & Mc Callister, B. (1999). Improving the adverse cardiovascular prognosis of type 2 diabetes. *Mayo Clin Proc.*, 74, 1171-81.
- Oates, P. (2008). Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr. Drug Targets*, 9, 14.
- O'Hare, J., & Hoyt, L. (1928). Mistletoe in the Treatment of Hypertension. *New Eng J Med*, 199, 13-1207.
- Onay, M. (2008). Investigation for natural extract inhibitors of bovine lens aldose reductase responsible for the formation of diabetes dependent cataract. *Middle East Technical University*.
- Ostenson, C. (2001). The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171, 241-247.
- Ozturk, Y., Altan, V., & Yıldızoğlu-Arı, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.*, 48, 69-112.
- ÖZER, Z., ÖNEN, H., UYGUR, F., & KOCH., W. (1996). *Farklı Kültürlerde Sorun Olan Yabancı Otlar ve Kimyasal Savaşları*. Tokat: Gazi Osman Paşa Ziraat Fakültesi Yayınları No: 15, Kitap Serisi No: 8.
- Patel, M., & Mishra, S. (2012). Isoquinoline alkaloids from *Tinospora cordifolia* inhibit rat lens aldose reductase. *Phytotherapy Research*, 2012, DOI 10.1002/ptr.3721.
- Patricia, I., Kirsti, H., Vesa, O., Kirsi, A., Jukka, K., Olof, S., . . . Pirjo, N. (2003). Insulin-mediated hepatic glucose uptake is impaired in type 2 diabetes: evidence for a relationship with glycemic control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(5), 2055-2060.

- Penning, T. (2004). Introduction and overview of the aldo-keto reductase superfamily. *American Chemical Society, 2004*, 3-20.
- Petitt, D., Saad, M., Bennett, P., Nelson, R., & Knowler, W. (1990). Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia, 33*, 43-438.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *In International Journal of Molecular Sciences, 20*(18), MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- Ramasamy, R., Liu, P., & Oates, S. (1999). Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. *Cardiovasc. Res., 42*, 130-139.
- Rao, A., Veeresham, C., & Asres, K. (2012). In Vitro and In Vivo inhibitory activities of four Indian medicinal plant extracts and their major components on rat aldose reductase and generation of advanced glycation endproducts. *Phytotherapy Research, 2012*, DOI 10.1002/ptr.4786.
- Rhodes, C. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death. *Science, 307*, 4-380.
- Rote, L. (1994). *Editio Cantor*. Aulendorflwürtt: 1994.
- Sacks, D. (2005). Carbohydrates. *In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. Tietz Fundamentals of clinical chemistry*(5), 427-462.
- Schweiker, S., & Levonis, S. (2020). Navigating the intricacies of molecular docking. *In Future Medicinal Chemistry, 12*(6), 469–471. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0355>.
- Segel, I. (1968). Biochemical Calculations: Enzim kinetics. John Wiley and Sons içinde, *Inc* (s. 213). New York.
- Setter, S., Campbell, R., & Cahoon, C. (2003). Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy, 37*, 1858-1866.
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012). Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress. *J Dent Allied Sci., 1*(2), 63-66.
- Srivastava, S., Ramana, K., & Bhatnagar, A. (2005). Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews, 26*(3), 380-392.

- Stein, G., & Berg, P. (1996). Evaluation of the Stimulatory Activity of a Fermented Mistletoe Lectin-1 Free Mistletoe Extract on T-helper Cells and Monocytes in Healthy Individuals in vitro. *Arzneimittelforschung*, 46, 635-639.
- Stevens, M., Obrosova, I., Cao, X., Van Husyen, C., & Grene, D. (2000). Effects of DL- $\alpha$ -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 49, 1006.
- Stirpe, F., Legg, R., & Onyon, L. (1980). Inhibition of Protein Synthesis by a Toxic Lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). *Biochem J.*, 190, 843-845.
- Stoss, M., Van Wely, M., Musielsky, H., & Gorter, R. (1999). Study on Local Inflammatory Reactions and other Parameters During Subcutaneous Mistletoe Application in HIV-positive Patients and HIV-negative Subjects Over a Period of 18 Weeks. *Arzneim Forsch/Drug Res* 49(1), 4, 366-373.
- Swanson-Flatt, S., Day, C., Bailey, C., & Flatt, P. (1989). Evaluation of Traditional Plant Treatments for Diabetes: Studies in streptozotocin-diabetic Mice. *Acta Diabetologica Latina*, 26, 5-51.
- Szwergold, B., Kappler, F., & Brown, T. (1990). Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science*, 247, 451.
- Tanimoto, T., Maekawa, K., Okada, S., & Yabenishimura, C. (1998). Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta*, 365, 285-292.
- Temelkova-Kurktschiev, T., Koehler, C., Henkel, E., Leonhardt, W., Fuecker, K., & Hanefeld, M. (2000). Postchallenge plasma glucose and glycaemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. *Diabetes Care*, 12, 1830-1834.
- Tesfamariam, B. (1994). Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radical Biol. Med.*, 16, 383-391.
- Timoshenko, A., & Gabius, H. (1993). Efficient Induction of Superoxide Release from Human Neutrophils by the Galactoside-specific Lectin from *Viscum album*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 374, 237-243.

- Torres, P., Sodero, A., Jofily, P., & Silva-Jr, F. (2019). Key topics in molecular docking for drug design. *In International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>.
- Treben, M. (1997). *Gesundheit aus der Apotheke Gottes. Ennsthaller Verlag* (s. A-4402). içinde Stegr: ISBN : 3-85068-090-8.
- UKPDS Research Group. (1998). Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS). *Lancet*, 352, 837-853.
- URECH, K. (1993). Mistletoe Constituents and Cancer Therapy. *J. Anthroposophical*, 10, 54-63.
- Van Wely, M., Stoss, M., & Gorter, R. (1996). Toxicity of a Standardized Mistletoe Extract in Immunocompromized and in Healthy Individuals. *Am J Therapeutics*, 6(1), 37- 43.
- Vlassara, H. (1992). Receptor-mediated interaction of advanced glycosylation end products with cellular components within diabetic tissues. *Diabetes*, 41(2), 6-52.
- Wagner, H., Feil, B., Seligmann, O., Petricic, L., & Kalogjera, Z. (1986). Phenylpropanes and lignans of *Viscum Album L* cardioactive drugs V. *Planta Med.*(2), 702-704.
- Wagner, H; Feil, B; Seligmann, O; Petricic, I; Kalogjera, Z. (1986). Phenylpropanes and lignans of *Viscum Album L* cardioactive drugs V. *Planta Med.*(2), 702-704.
- WALKER, G. (1983). *The Woman's Encyclopedia of Myths and Secrets. San Francisco: Harper & Row*, 661–3.
- Williams, G., & Pickup, J. (2004). *Handbook of Diabetes. 3.th edition*. Oxford: Blackwell Publishing Company.
- Williamson, J., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K., Ido, Y., Kawamura, T., . . . Tilton, R. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, 801.
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T., Engerman, R., Oates, P., & King, G. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerolprotein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), 1122-29.
- Yabe-Nishimura, C. (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev.*, 50(1), 21-33.

- Yadav, U., Srivastava, S., & Ramana, K. (2010). Understanding the role of aldose reductase in ocular inflammation. *Current Molecular Medicine*, 10(6), 540-549.
- Yamagishi, S., & Takeuchi, M. (2004). Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med. Hypotheses.*, 63, 135-137.
- Yeh, L., & Ashton, M. (1990). The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. *Metabolism*, 39, 619-622.
- Yenigün, M., & Altuntaş, Y. (2001). Her Yönüyle Diabetes Mellitus. *Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati*, 315-375.
- Zarkovic, N., Zarkovic, K., & Grainca, S. (1997). The Viscum album Preparation Isorel Inhibits the Growth of Melanoma B16F10 by Influencing the Rumorhost Relationship. *Anticancer Drugs.*, 8, 17-22.
- Zimmet, P., Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782-787.

## **ÖZ GEÇMİŞ**

2012 yılında Giresun Üniversitesi, Fevzi Kır aç Uygulamalı Bilimler Meslek Yüksek Okulu Gıda Teknolojileri bölümünde başladığı lisans öğretimini 2020 yılında tamamladı.

