

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**METABOLİK HASTALIKLARDA ÖNEMLİ BAZI ENZİMLERİN
İNHİBİSYONUNDA BAZI BİTKİ KÖKENLİ BİLEŞİKLERİN
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AHMED MUFTAH OMAR MENSHAZ

DOKTORA TEZİ

PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

KASIM - 2020

KASTAMONU

TEZ ONAYI

Ahmed Muftah Omar MENSHAZ tarafından hazırlanan “**Metabolik Hastalıklarda Önemli Bazı Enzimlerin İnhibisyonunda Bazı Bitki Kökenli Bileşiklerin Potansiyellerinin Araştırılması**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **24.11.2020** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER	
	Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Talip ÇETER	
	Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Cemil İŞLEK	
	Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Kerem CANLI	
	Dokuz Eylül Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Kerim GÜNEY	
	Kastamonu Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Prof. Dr. İzzet ŞENER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Ahmed Muftah Omar MENSHAZ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

METABOLİK HASTALIKLARDA ÖNEMLİ BAZI ENZİMLERİN İNHİBİSYONUNDA BAZI BİTKİ KÖKENLİ BİLEŞİKLERİN POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

AHMED MUFTAH OMAR MENSHAZ

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Enzimler biyolojik katalizörlerdir, hücrelerdeki kimyasal reaksiyonların normalden binlerce kat daha hızlı tamamlanmasını sağlarlar. Enzimlerin durmaksızın çalışmaları veya normalde katalizlemesi gereken reaksiyonların engellenmesi gibi durumlar, bazı metabolik hastalıklara sebep olmaktadır. Enzimlerin aktivitelerini engelleyen, diğer bir deyişle inhibe edilmesinde rol oynayan birçok bileşik bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda diyabetli kişilerde probleme yol açan α - amilaz ve α - glukozidaz, Alzheimer hastalığına neden olan asetilkolinesteraz ve gut oluşumuna neden olan ksantin oksidaz gibi enzimlerin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, araştırma merkezleri ve ilaç firmaları, bu gibi enzimlerin inhibitör ve aktivatörleri üzerinde yoğun araştırmalar yapmaktadır. Enzimleri aktive veya inhibe edecek yeni moleküllerin keşfinde özellikle bitkisel ekstraktlar ve bitki kökenli bileşikler büyük öneme sahiptir. Yapılan bu tez çalışmasında bitki kökenli bileşiklerden olan floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, kurkumin ve sinnamik asidin; α - amilaz, ksantin oksidaz, asetilkolinesteraz ve α - glukosidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır. Sonuçlar pozitif kontrollerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kuersetin ve umbelliferon yüksek α - amilaz inhibitörü potansiyeline sahipken, floridzin ve sinnamik asidin α - amilaz için aktivatör olarak davrandığı görülmüştür. Öte yandan sonuçlar, umbelliferonun iyi bir asetilkolinesteraz inhibitörü olarak çalıştığını göstermektedir. Ayrıca sonuçlara göre kuersetin ve umbelliferonun α -glukozidaz enzimi inhibitörü olarak kullanılması potansiyeli de bulunmaktadır. Sonuç olarak, inhibitör etkisi gösteren bitki kökenli bileşikler için daha ileri testler yapılarak, bu bileşiklerin kullanım detayları belirlenmelidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Alfa-amilaz, ksantin oksidaz, asetilkolinesteraz, alfa-glukosidaz, floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, kurkumin ve sinnamik asit, enzim, inhibitör

Kasım 2020, 124 Sayfa

ABSTRACT

PH.D THESIS

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF SOME PLANT DERIVED COMPOUNDS IN INHIBITION OF SOME IMPORTANT ENZYMES IN METABOLIC DISEASES

AHMED MUFTAH OMAR MENSHAZ

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Enzymes are biological catalysts, allowing chemical reactions in cells to complete thousands of times faster than normal. Situations such as the continuous work of enzymes or the prevention of reactions that normally need to be catalyzed cause some metabolic diseases. There are many compounds that block, in other words, inhibit the activities of enzymes. Especially in recent years, research centers and pharmaceutical companies have been conducting intensive researches on inhibitors and activators of such enzymes to be used in the treatment of diseases such as α - amylase and α - glycosidase, which cause problems in people with diabetes, acetylcholinesterase that causes Alzheimer's disease and xanthine oxidase that causes gout. Especially herbal extracts and plant derived compounds are of great importance in the discovery of new molecules that will activate or inhibit enzymes. In this thesis study, the inhibition potentials of some plant derived compounds, such as phloridzin, naringenin, quercetin, umbelliferon, curcumin and cinnamic acid on α - amylase, xanthine oxidase, acetylcholinesterase and α - glucosidase enzymes were investigated. Results are compared with positive controls. According to the results obtained, it was seen that quercetin and umbelliferon had high α - amylase inhibition potential, while phloridzine and cinnamic acid act as activators for α - amylase. On the other hand, the results show that umbelliferone works as a good acetylcholinesterase inhibitor. In addition, according to the results, there is a potential for using quercetin and umbelliferone as α - glucosidase enzyme inhibitors. As a result, further tests should be carried out for plant derived compounds showing inhibitory effects and the details of use of these compounds should be determined.

KEYWORDS: Alpha-amylase, xanthine oxidase, acetylcholinesterase, alpha-glucosidase, floridzine, naringenin, quercetin, umbelliferone, curcumin and cinnamic acid, enzyme, inhibitor

November 2020, 124 Page

TEŞEKKÜR

Danışmanım tarafından bana verilen tezi bitirebildiğim için, her şeyden önce Allah'a teşekkür etmek istiyorum. Ayrıca bu şansı bana verdiği için ülkem Libya'ya en içten şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca doktora tez çalışmalarım sırasında rehberliği, yorumları, sabrı ve bütün yardımları için danışmanım Sayın Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e teşekkür ediyorum. Onun rehberliği, bu tezin her aşamasında bana yardımcı oldu.

Son olarak herkesten daha fazla hayatta rol modelim olan rahmetli babam ve anneme, eşime, çocuklarıma, kardeşlerime ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Beni her zaman destekleri ve en iyi dilekleriyle yüreklendirdiler.

Bütün bunlara ek olarak, Kastamonu Üniversitesi'nin tüm mensuplarına teşekkür ediyorum.

Ahmed Muftah Omar MENSHAZ

Kastamonu, 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimlerin Kimyasal Yapısı.....	2
1.2 Enzimlerin Özgüllüğü	3
1.3 Enzimler Nasıl Çalışır?	4
1.4 Enzimlerin Sınıflandırılması	5
1.5 Enzimlerin Aktivitelerini Etkileyen Faktörler	6
1.5.1 Enzim Konsantrasyonu	6
1.5.2 Substrat Konsantrasyonu	7
1.5.3 Sıcaklık	9
1.5.4 pH.....	10
1.6 Enzimler Spesifik Moleküller Tarafından İnhibe Edilebilir.....	10
1.7 İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Geri Dönüşümlü Etkileri	11
1.7.1 Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon	11
1.7.2 Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon	12
1.7.3 Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon	12
1.7.4 Substrat İnhibisyonu	13
1.8 İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	15
1.9 Bu Çalışmada Kullanılan Enzimler	20
1.9.1 Amilaz.....	20
1.9.1.1 α -Amilaz.....	20
1.9.1.2 β -Amilaz.....	22
1.9.1.3 γ -Amilaz	22
1.9.2 α -Glukosidaz	23
1.9.3 Ksantin Oksidaz	24
1.9.4 Asetilkolinesteraz.....	25
1.10 Tıbbi Bitkiler	27
1.11 Bu Çalışmada Kullanılan Pozitif Kontroller	27
1.11.1 Akarboz.....	27
1.11.2 Allopurinol.....	28
1.11.3 Galantamin.....	29
1.12 Bu Çalışmada Kullanılan Bitki Kökenli Bileşenler	30
1.12.1 Florizin.....	30
1.12.2 Naringenin	31
1.12.3 Kuersetin.....	32
1.12.4 Umbelliferon.....	32

1.12.5	Sinamik asit.....	33
2.	KAYNAK TARAMASI	35
3.	MATERYALLER VE YÖNTEMLER.....	45
3.1	Bitki Kökenli Bileşikler.....	45
3.2	α - Amilaz İnhibisyon Testi.....	45
3.2.1	Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	45
3.2.1.1	Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler	45
3.2.1.2	Niştasta çözeltisi.....	45
3.2.1.3	α - Amilaz çözeltisi	45
3.2.1.4	Renk ayırıcı	46
3.2.1.5	Akarboz çözeltisi.....	46
3.2.2	α - Amilaz İnhibisyon Testi	46
3.2.3	Maltoz Standart Eğrisi	48
3.3	Ksantin Oksidaz İnhibisyon Testi	49
3.3.1	Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.3.1.1	Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler	49
3.3.1.2	Allopurinol çözeltisi.....	49
3.3.1.3	Ksantin oksidaz çözeltisi.....	49
3.3.1.4	Substrat çözeltisi	49
3.3.1.5	Fosfat tamponu çözeltisi	49
3.3.1.6	Durdurma çözeltisi	50
3.3.2	Ksantin Oksidaz İnhibisyon Testi.....	50
3.3.3	Ksantin Standart Eğrisi	52
3.4	Asetilkolinesteraz İnhibisyon Testi	52
3.4.1	Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	52
3.4.1.1	Tampon çözeltisi	52
3.4.1.2	Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler	53
3.4.1.3	Asetiltiyokolin iyot (ATCI) çözeltisi	53
3.4.1.4	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi	53
3.4.1.5	Asetilkolinesteraz enzim çözeltisi.....	53
3.4.1.6	Galantamin çözeltisi.....	53
3.4.2	Asetilkolinesteraz İnhibisyon Testi	54
3.4.3	Asetiltiyokolinesteraz İnhibisyon Kinetiği Testi	54
3.5	α - Glukozidaz İnhibisyon Testi	55
3.5.1	Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	55
3.5.1.1	p-Nitrofenil- α -d-glikopiranozid (PNPG) çözeltisi	55
3.5.1.2	α - Glukozidaz çözeltisi.....	55
3.5.1.3	Akarboz çözeltisi.....	55
3.5.1.4	Sodyum karbonat çözeltisi	55
3.5.2	α -Glukozidaz İnhibisyon Testi	58
3.6	α - Glukozidaz İnhibisyon Kinetiği Testi	59
3.7	İstatistiksel Analiz	59
4.	SONUÇLAR.....	63
4.1	α - Amilaz İnhibisyon Analiz Sonuçları.....	63
4.2	Ksantin Oksidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları	68
4.3	Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibisyon ve İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları.....	72
4.3.1	AChE İnhibisyon Analiz Sonuçları	72
4.3.2	AChE İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları	76

4.4	α - Glukozidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları	88
4.4.1	α - Glukozidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları	88
4.4.2	α - Glukozidaz İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları	92
5.	TARTIŞMA	100
5.1	α - Amilaz İnhibisyon Analizi	100
5.2	Ksantin Oksidaz İnhibisyon Analizi.....	102
5.3	Asetilkolinesteraz İnhibisyon Analizi	103
5.3.1	Asetilkolinesteraz Kinetik İnhibisyon Deneyi.....	104
5.4	α - Glukozidaz İnhibisyon Analizi	105
5.4.1	α - Glukozidaz Kinetik İnhibisyon Analizi.....	106
6.	SONUÇ	108
	KAYNAKLAR	110
	EKLER.....	122
	EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI	122
	ÖZGEÇMİŞ.....	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Enzimlerin çalışma mekanizması	4
Şekil 1.2 Substrat konsantrasyonunun reaksiyonun hızına etkisi	7
Şekil 1.3 Enzimin doyumluğa erişmesi ve Vmax	7
Şekil 1.4 Michaelis-Menten sabiti (Km).....	8
Şekil 1.5 Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon.....	11
Şekil 1.6 Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon	12
Şekil 1.7 Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon	13
Şekil 1.8 a. Substrat inhibisyonu, b. Substrat inhibisyonunda Vmax değerinin düşüşü	14
Şekil 1.9 Geri beslemeli (feedback) inhibisyonu süreci	14
Şekil 1.10 Substratların ve enzimlerin analizi için kullanılabilecek Michealis-Menten grafiği	17
Şekil 1.11 Lineweaver-Burk grafiği.....	18
Şekil 1.12 İnhibisyonlar için Lineweaver – Burk grafikleri	20
Şekil 1.13 Amilaz yapısı	21
Şekil 1.14 β -Amilaz yapısı.....	22
Şekil 1.15 α -Glukozidaz.....	24
Şekil 1.16 Katalize edilmiş ksantin oksidaz yolları	24
Şekil 1.17 Ksantin oksidaz için referans inhibitörü olarak allopurinol.....	25
Şekil 1.18 Galantamin.....	27
Şekil 1.19 Akarbozun kimyasal yapısı.....	28
Şekil 1.20 Allopürinolün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 1.21 Galantaminin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.22 Florizinin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.23 Naringinin kimyasal yapısı	31
Şekil 1.24 Kuersetinin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 1.25 Umbelliferonun kimyasal yapısı	33
Şekil 1.26 Synamik asidin kimyasal yapısı.....	33
Şekil 4.1 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu.....	65
Şekil 4.2 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu.....	66
Şekil 4.3 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu.....	67
Şekil 4.4 Maltoz kalibrasyon eğrisi.....	68
Şekil 4.5 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri	69
Şekil 4.6 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri	70
Şekil 4.7 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri	71
Şekil 4.8 Ksantin kalibrasyon eğrisi.....	72
Şekil 4.9 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri	73

Şekil 4.10 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri	74
Şekil 4.11 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri	75
Şekil 4.12 Michealis-Menten grafiği, inhibitörsüz	77
Şekil 4.13 Lineweaver-Burk grafiği, inhibitörsüz	77
Şekil 4.14 Galantamin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği.....	79
Şekil 4.15 Galantamin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 4.16 Floridzin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği.....	80
Şekil 4.17 Floridzin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.18 Naringenin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği.....	82
Şekil 4.19 Naringenin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği.....	82
Şekil 4.20 Kuersetin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği	83
Şekil 4.21 Kuersetin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	84
Şekil 4.22 Umbelliferon kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği	85
Şekil 4.23 Umbelliferon kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	85
Şekil 4.24 Sinnamik asit kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği.....	86
Şekil 4.25 Sinnamik asit kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği.....	87
Şekil 4.26 Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan galantamin için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali	87
Şekil 4.27 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri.....	89
Şekil 4.28 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri.....	90
Şekil 4.29 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri.....	91
Şekil 4.30 Michealis-Menten grafiği, inhibitörsüz	93
Şekil 4.31 Lineweaver-Burk grafiği, inhibitörsüz	94
Şekil 4.32 Akarboz kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği.....	95
Şekil 4.33 Akarboz kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.34 Kuersetin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği	96
Şekil 4.35 Kuersetin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	97
Şekil 4.36 Umbelliferon kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği	98
Şekil 4.37 Umbelliferon kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği	98
Şekil 4.38 Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan akarboz için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali	99

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1 Substrat konsantrasyonuna ilişkin reaksiyon dereceleri	6
Tablo 1.2 Amilazın sınıflandırılması	20
Tablo 3.1 α - Amilaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	47
Tablo 3.2 Maltoz standart eğrisi için maltoz standartlarının hazırlanması	48
Tablo 3.3 Ksantin oksidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	51
Tablo 3.4 Ksantin standart eğrisi için ksantin standartlarının hazırlanması	52
Tablo 3.5 Asetilkolinesteraz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	56
Tablo 3.6 Asetilkolinesteraz inhibisyon kinetiği testi için örnek bir plaka yapısı	57
Tablo 3.7 Asetilkolinesteraz inhibisyon kinetiği testi için örnek bir plaka yapısı	58
Tablo 3.8 α - Glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	60
Tablo 3.9 α - Glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	61
Tablo 3.10 α - glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı	62
Tablo 4.1 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları	63
Tablo 4.2 Bileşiklerin 10 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları	65
Tablo 4.3 Bileşiklerin 15 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları	66
Tablo 4.4 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları	68
Tablo 4.5 Bileşiklerin 10 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları	70
Tablo 4.6 Bileşiklerin 15 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları	71
Tablo 4.7 5 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçları	73
Tablo 4.8 10 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçları	74
Tablo 4.9 15 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçları	75
Tablo 4.10 İnhibitör kullanılmadan gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	76
Tablo 4.11 Galantamin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	78
Tablo 4.12 Floridzin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	80
Tablo 4.13 Naringenin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	81
Tablo 4.14 Kuersetin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	83
Tablo 4.15 Umbelliferon kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri	84

Tablo 4.16 Sinnamik asit kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri.....	86
Tablo 4.17 Asetilkolinesteraz inhibisyon türleri.....	88
Tablo 4.18 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için α - glukozidaz inhibisyon analiz sonuçları.....	89
Tablo 4.19 10 mg/mL bileşik konsantrasyonları için α - glukozidaz inhibisyon analizi sonuçları.....	90
Tablo 4.20 15 mg/mL bileşik konsantrasyonları için α - glukozidaz inhibisyon analizi sonuçları.....	91
Tablo 4.21 İnhibitör kullanılmadan gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri.....	93
Tablo 4.22 Akarboz kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri.....	94
Tablo 4.23 Kuersetin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri.....	96
Tablo 4.24 Umbelliferon kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri.....	97
Tablo 4.25 α - Glukozidaz inhibisyon türleri.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
CO_2	: Karbondioksit
H^+	: Hidrojen
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
OH^-	: Hidroksil
$\text{V}_{\max}$	: Enzimin Doygunluğa Eriştiği Nokta

Kısaltmalar

AChE	: Asetilkolinesteraz
AChEI	: Asetilkolinesteraz İnhibitörü
AH	: Alzheimer Hastalığı
EI	: Enzim-İnhibitör Kompleksi
ES	: Enzim-Substrat Kompleksi
ESI	: Enzim-Substrat-İnhibitör Kompleksi
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
GH	: Glikozit Hidrolaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MSU	: Monosodyum Urat
OX	: Ksantin Oksidaz
P	: Ürün
RNA	: Ribonükleik Asit

1. GİRİŞ

Tipik bir hücrenin yaklaşık olarak 3000 farklı türde enzim molekülü içerdiği bilinmektedir. Bu enzimlerin bazıları tarafından katalize edilen biyokimyasal reaksiyonlar, hücre çoğalmasının, hücre sel enerji için biyomoleküllerin dönüştürülmesinin ve hücre içinde kullanılabilen veya hücre dışı reaksiyonlar için salgılanan belirli bileşiklerin sentezinin temelidir. Hücre içinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar, oldukça sınırlı sıcaklık ve pH aralığında gerçekleşir. Bu reaksiyonların gerçekleşebilmesinin sebebi; hücrede bulunan enzimlerin, katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjilerini çeşitli mekanizmalar yoluyla düşürebilmesidir. Maya hücrelerinden elde edilen enzimlerin katalitik aktiviteleri uzun zamandan beri biliniyor ve yüzyıllardır çeşitli amaçlarla kullanılıyor olsa da ilk enzim saf kristal formunda 1926 yılına kadar izole edilememiştir. Enzimlerin kristalize olabileceğini ilk olarak James B. Sumner keşfetmiş ve *Canavalia ensiformis* (Jack fasulyesi) bitkisinden kristal halde üreaz enzimini elde ettiği için 1946 yılında Nobel Ödülü'nü almıştır (Holum, 1968; Balasubramanian ve Ponnuraj, 2009).

Enzimler biyolojik katalizörler olarak kabul edilir, dolayısıyla canlılar tarafından üretilir ve bu sebeple canlılardan izole edilebilir. Katalizör, kimyasal reaksiyonların hızını arttırabilen ve hızlandırdığı kimyasal reaksiyon sonucunda değişmeden kalan yapılardır (Castagnetto vd., 2002).

Enzimlerin yanı sıra, mikroorganizma, hayvan ve bitki gibi canlılar çeşitli sebeplerle, kendileri veya başka canlılar tarafından üretilmiş olan enzimlerin aktivitesini düzenlemek için çok sayıda enzim inhibitörü veya aktivatörü üretirler. Enzim inhibitörleri bir enzime bağlanan ve bu enzimin biyoaktivitesini yavaşlatan veya tamamen durduran bileşiklerdir. Bir enzimin aktivitesini yavaşlatmak veya tamamen durdurmak canlıyı öldürebilir veya enzimin sürekli çalışması sebebiyle ortaya çıkabilecek metabolik dengesizliği düzeltebilir. Enzim aktivatörleri ise inhibitörlerin tersine, enzimlerin aktivitelerini hızlandırarak enzimlerin katalizlediği reaksiyonların verimini artırır (Lopina, 2017).

Özellikle hayati süreçlerin bazılarında, bazı spesifik enzimlerin aktive veya inhibe edilmesine bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik problemler bilim insanları ve ilaç şirketlerinin ilgisini çekmektedir (Berg vd., 2002).

Yapılmakta olan bilimsel çalışmalar çoğunlukla bu gibi enzimlerin aktivatör veya inhibitörlerini bulmaya ve bu sayede probleme yol açan enzimlerin aktivitelerini kontrol etmeye odaklanmıştır. Tıbbi bitkilerin, ilaçların üretiminde kullanılan birçok kimyasal bileşik açısından zengin kaynaklar olduğu; bu sebeple bitki kökenli bileşiklerin, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek aktivatör veya inhibitörler içerdiği uzun zamandan beri bilinmektedir (Atanasov, 2015).

Son zamanlarda yapılmakta olan araştırmaların çoğu, enzimatik bozuklukların tedavisinde, tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktların veya bitki kökenli bileşiklerin potansiyeline, başka bir deyişle bu ekstrakt/bitki kökenli bileşiklerin bazı ilaçlara alternatif olarak nasıl kullanacağına odaklanmıştır (Calixto, 2019).

Özellikle son yıllarda diyabetli kişilerde probleme yol açan α -amilaz ve α -glukozidaz, Alzheimer hastalığına neden olan asetilkolinesteraz ve gut oluşumuna neden olan ksantin oksidaz gibi enzimlerin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere, araştırma merkezleri ve ilaç firmaları, bu gibi enzimlerin inhibitör ve aktivatörleri üzerinde yoğun araştırmalar yapmaktadır (Rengasamy vd., 2013).

Bitkilerin aktivatör veya inhibitör içerme potansiyeli göz önüne alınarak, bu tez çalışmasında floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, kurkumin ve sinamik asit gibi bazı bitki kökenli sekonder metabolitlerin, α -amilaz, ksantin oksidaz, asetilkolinesteraz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve sonuçların pozitif kontrollerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

1.1 Enzimlerin Kimyasal Yapısı

Enzimler, temelde peptit bağlarıyla birbirine bağlanan amino asit zincirlerinden oluşan ve yüksek moleküler ağırlığa sahip biyokatalizörlerdir. Moleküler ağırlıkları 10.000 ile 2000000 dalton arasında değişkenlik göstermektedir (Ibers ve Holm, 1980).

Bazı katalitik RNA'lar hariç tüm enzimler protein tabiatlıdır ve tüm proteinler enzim değildir, bu yüzden protein doğasındaki enzimler 2 gruba ayrılabilir (Nelson vd., 2008):

- Sadece üreaz, amilaz ve benzeri gibi proteinden oluşan basit protein enzimler.
- Protein kısmı ve protein olmayan kısımdan oluşan kompleks (konjuge) protein enzimler. Bu enzimlerin protein yapısındaki kısma apoenzim adı verilirken, protein yapısında olmayan kısım bir kofaktör, koenzim veya prostetik grup olabilir.

1.2 Enzimlerin Özgüllüğü

Enzimleri tanı ve araştırma araçları olarak önemli kılan özelliklerinden biri, katalize ettikleri reaksiyonlara göre sergiledikleri özgüllüktür.

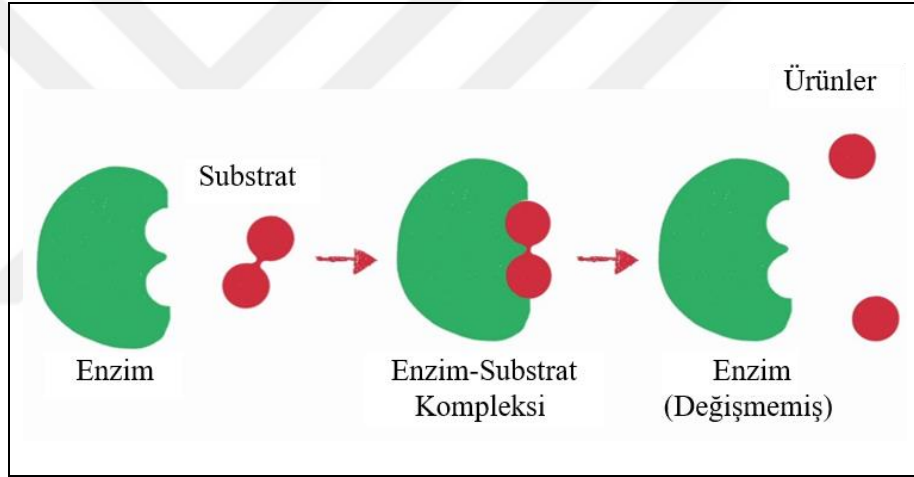
Bazı enzimler mutlak özgüllük gösterir; yani, sadece belirli bir reaksiyonu katalize ederler. Diğer enzimler, belirli bir kimyasal bağ veya işlevsel gruba özgü reaksiyonları katalizleyebilirler. Genel olarak, dört farklı özgüllük türü vardır (Robinson, 2015).

1. Mutlak özgüllük: Bu şekildeki bir özgüllük gösteren enzimler sadece tek bir reaksiyonu katalize ederler.
2. Grup özgüllüğü: Bu şekildeki bir özgüllük gösteren enzimler sadece amino, fosfat ve metil grupları gibi spesifik fonksiyonel gruplara sahip moleküller üzerinde etki gösterirler.
3. Bağ özgüllüğü: Bu şekildeki bir özgüllük gösteren enzimler, moleküler yapının geri kalanına bakılmaksızın belirli bir kimyasal bağ üzerinde etki ederler.
4. Stereokimyasal özgüllük: Bu şekildeki bir özgüllük gösteren enzimler belirli bir sterik veya optik izomer üzerinde etki gösterirler (Holum, 1968; Parvathy, 2018).

1.3 Enzimler Nasıl Çalışır?

İki molekülün reaksiyona girmesi için birbirleriyle çarpışmaları gerekir. Reaksiyon için doğru yönde (oryantasyon) ve yeterli enerjiyle çarpışmalıdırlar. Yeterli enerji, reaksiyonu başlatabilmek için, aktivasyon enerjisi olarak adlandırılan enerji bariyerini aşabilecek düzeyde enerjiye sahip oldukları anlamında kullanılmaktadır (Peker ve Helvacı, 2008).

Enzimlerin katalizlediği bir reaksiyonda enzim substratla birleşerek geçici bir enzim-substrat kompleksi oluşturur. Daha sonra oluşan ürün enzimden ayrılırken, enzim değişmeden kalır (Şekil 1.1) (National Research Council, 2003).



Şekil 1.1 Enzimlerin çalışma mekanizması

Enzimin çalışma mekanizması ile ilgili iki farklı model ortaya atılmıştır.

Anahtar - Kilit Modeli: Bu modele göre enzimin aktif bölgesinin (katalitik bölge) şekli ile substratın şekli birbirini tamamlayıcı niteliktedir. Substrat, bu katalitik bölgeye, anahtarın kilide uyumuna benzer bir şekilde oturur. Anahtar sadece kendi kilidine uyum sağlar (Tripathi ve Bankaitis, 2017).

İndüklenmiş Uyum: Enzimin katalitik bölgesinin substrat ile tam olarak uyum göstermediği, anahtar - kilit modeline göre daha esnek bir modeldir. Bu modelde enzimin katalitik bölgesi, anahtar - kilit modeli gibi substrat ile birbirini tamamlayıcı bir yapıda değildir. Substratın enzim ile etkileşimi, katalitik bölgenin şeklinde bazı

değişikliklere sebep olur, böylece katalitik bölge substratın bağlanması için daha uygun bir hale gelir (Bennett ve Frieden, 1969; Johnson, 2008).

1.4 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler altı ana sınıfa ayrılır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon ve redüksiyon (yükseltgenme ve indirgenme) tepkimelerinde görev alırlar. Bu grup enzimlere, oksidazlar, dehidrojenazlar, oksijenazlar ve peroksidazlar örnek olarak verilebilir.
2. Transferazlar: Amino veya fosfat grupları gibi fonksiyonel grupların aktarılmasında rol oynarlar. Bu grup enzimlere, aminotransferazlar örnek olarak verilebilir.
3. Hidrolazlar: Bu enzimler substratın hidrolizini katalizlerler. Bu grup enzimlere, lipazlar, maltaz ve proteazlar örnek olarak verilebilir.
4. Liyazlar: Bu enzimler su, amonyak veya CO₂ 'nin elementlerini ekleyerek veya çıkararak çift bağlar oluştururlar. Bu grup enzimlere, dekarboksilazlar örnek olarak verilebilir.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki atomların yeniden düzenlemelerini katalize ederek, bu molekülün izomerini oluştururlar. Bu grup enzimlere, glikoz-6-fosfatı, fruktoz-6-fosfata dönüştüren glikoz-6-fosfat izomeraz enzimi örnek olarak verilebilir.
6. Ligazlar: Bu enzimler iki molekülü birleştirilmesi reaksiyonlarını katalizlerler. Bu grup enzimlere, karboksilazlar ve sentetazlar örnek olarak verilebilir (Holum, 1968; Parvathy, 2018).

1.5 Enzimlerin Aktivitelerini Etkileyen Faktörler

Aslında temel enzim kinetik teorisi hem temel enzimatik mekanizmayı anlamak hem de enzim analizi için bir yöntem seçmek için önemlidir. Bir enzimin inhibe edici aktivitesini ölçmek için seçilen koşullar, substratının konsantrasyonunu ölçmek için seçilenlerle aynı olmaz. Sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve herhangi bir inhibitör veya aktivatör varlığı gibi çeşitli faktörler enzimatik reaksiyonların ilerleme hızını etkiler (Henson ve Chedrese, 2004).

1.5.1 Enzim Konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızı üzerindeki etkisini incelemek için, substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan oldukça yüksek miktarda bulunmalıdır; yani reaksiyon, substrat konsantrasyonundan bağımsız olmalıdır. Bu şekilde belirli bir süre boyunca oluşan ürün miktarındaki herhangi bir değişiklik, mevcut enzim seviyesine bağlı olacaktır.

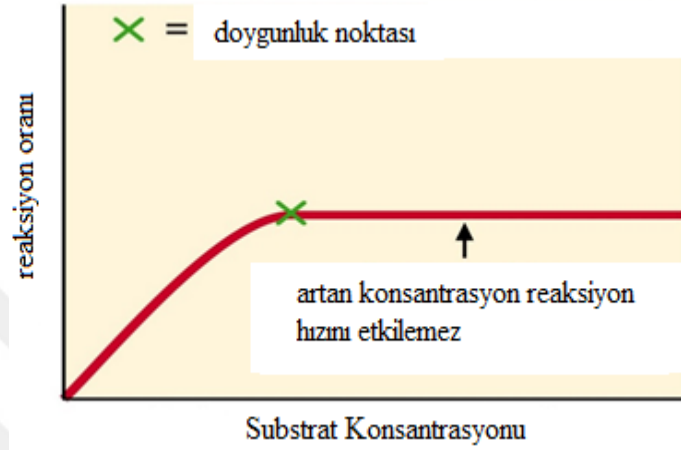
Bir reaksiyonda bulunan enzim miktarı, katalize ettiği aktivite ile ölçülür. Aktivite ve konsantrasyon arasındaki ilişki sıcaklık, pH vb. gibi birçok faktörden etkilenir. Enzimler ile yapılacak bir çalışmada, gözlenen aktivitenin enzim konsantrasyonunun tek sınırlayıcı faktör olması için mevcut enzim miktarı ile orantılı olacak şekilde tasarlanır. Reaksiyon sıfırıncı dereceden olmalıdır (Martinek, 1969).

Tablo 1.1 Substrat konsantrasyonuna ilişkin reaksiyon dereceleri

Derece	Oran Denklemi	Yorumlar
sıfırıncı	$\text{oran} = k$	oran substrat konsantrasyonundan bağımsızdır
birinci	$\text{oran} = k [S]$	oran, substrat konsantrasyonunun birinci kuvveti ile orantılıdır
ikinci	$\text{oran} = k [S] [S] = k [S]^2$	oran substrat konsantrasyonunun karesiyle orantılıdır
ikinci	$\text{oran} = k [S1] [S2]$	oran, iki reaktanın da birinci kuvveti ile orantılıdır

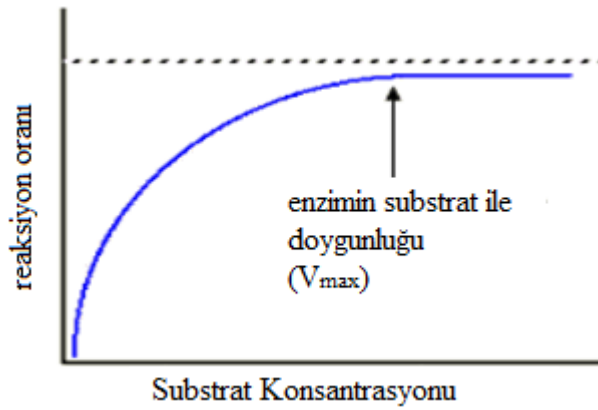
1.5.2 Substrat Konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonu, reaksiyon hızını maksimum bir doyum noktasına ulaşana kadar artırır. Bu noktadan sonra, substrat konsantrasyonundaki artış, reaksiyonun hızını artırmaz (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Substrat konsantrasyonunun reaksiyonun hızına etkisi

Teorik olarak, bu maksimum hıza ulaşıldığında, mevcut enzimin tümü enzim substrat kompleksi olan ES'ye dönüşür. Şekil 1.3 'de enzimin doyumluğa eriştiği bu nokta V_{max} olarak adlandırılır (Bennett ve Frieden, 1969).



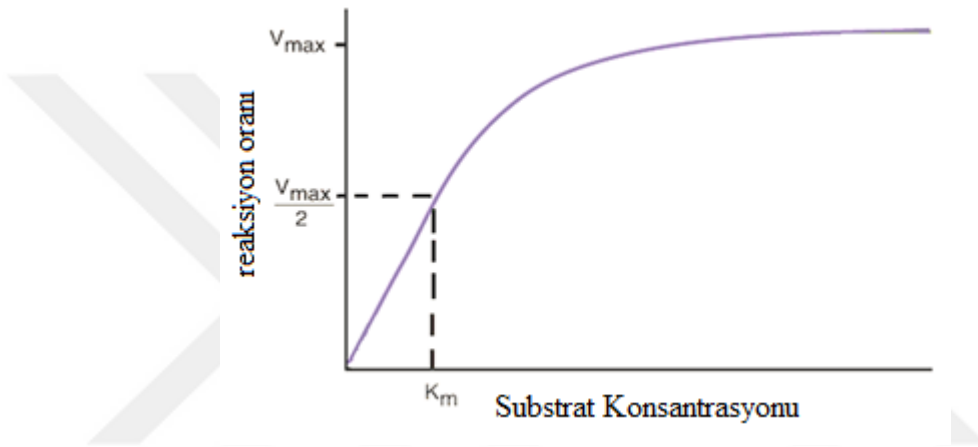
Şekil 1.3 Enzimin doyumluğa erişmesi ve V_{max}

Enzim ile substrat arasındaki ilişki aşağıda verilmiş olan reaksiyonda gösterildiği şekilde gerçekleşmektedir.



Bu reaksiyonda enzim (E) substrat (S) ile birleşir ve önce geçici bir enzim-substrat kompleksi (ES) oluşur. Daha sonra oluşan ürün (P) enzimden ayrılır (Segel, 1975).

Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılan K_m değeri, V_{max} değerinin yarısına denk gelen substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Michaelis-Menten sabiti (K_m)

K_m sabiti şu şekilde tanımlanabilir:

$$K_m = \frac{K_{+1} + K_{+2}}{K_{-1}} = [S] \frac{V_{max}}{2} \quad (1.2)$$

K_{+1} , K_{-1} ve K_2 yukarıda verilmiş olan enzim substrat ilişkisini gösteren reaksiyondaki hız sabitleridir.

Michaelis-Menten, reaksiyon hızı için bu sabit ve substrat konsantrasyonu ile ilgili aşağıdaki ifadeyi geliştirmiştir.

$$V_1 = V_{max} [S] / K_m + [S] \quad (1.3)$$

Burada,

V_1 = herhangi bir zamandaki reaksiyonun hızı,

$[S]$ = bu zamandaki substrat konsantrasyonu,

V_{max} = bu deney koşulları altında en yüksek hız,

K_m = Araştırılan belirli enzim için Michaelis-Menten sabitidir.

Michaelis-Menten sabitleri, yaygın olarak kullanılan enzimlerin çoğu için belirlenmiştir. K_m , enzimden enzime değişir ve farklı enzimlerin tanımlanmasında kullanılır. Daha küçük bir K_m değeri, enzimin substratı için daha yüksek afinite (ilgi) gösterdiğini belirtir (Bennett ve Frieden, 1969; Robinson, 2015). K_m değerleri enzimler hakkında değişik yorumlar yapabilmemizi sağlar.

1. Düşük K_m , enzimin doymuş hale gelmesi için sadece az miktarda substrat gerektirdiğini gösterir. Böylece, maksimum hıza nispeten düşük substrat konsantrasyonlarında ulaşılmaktadır.
2. Yüksek K_m , maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için yüksek substrat konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğunu gösterir.
3. Enzimin üzerinde katalizör görevi gördüğü en düşük K_m değerine sahip substratın sıklıkla enzimin doğal substratı olduğu varsayılır, ancak bu tüm enzimler için geçerli değildir (Berg vd., 2002).

1.5.3 Sıcaklık

Maksimum reaksiyon hızının meydana geldiği sıcaklığa enzimin optimum sıcaklığı denir. Bu, farklı enzimler için değişkenlik gösterir. İnsan vücudundaki çoğu enzimin optimum sıcaklığı yaklaşık 37 °C'dir.

Sıcaklıktaki değişiklik, enzimin aktif bölgesinde değişikliğe yol açar. Böylece substratın şeklini daha az tamamlayıcı hale gelir ve böylece reaksiyonu katalizleme olasılığı daha az olur. Sonunda, daha yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olur ve artık çalışmaz (Holum, 1968; Parvathy, 2018).

1.5.4 pH

Farklı enzimler farklı optimum pH değerlerine sahiptir. Optimum pH, H^+ ve OH^- iyonlarının miktarına bağlı olarak enzimin aktif bölgesi ile substratı arasındaki bağların, dolayısıyla aktif bölgelerinin şeklinin, substratlarının şeklini en tamamlayıcı hale getirecek şekilde etkilendiği pH değeridir. Optimum pH, deneyde kullanılan tamponun türü ve iyonik kuvvetinden etkilenir. Optimum pH değerinde, reaksiyon hızı en ideal seviyededir (Nelson vd., 2008).

Optimumun üstünde veya altındaki pH değerleri, reaksiyon hızında hızlı bir düşüşe neden olur (Holum, 1968; Parvathy, 2018).

1.6 Enzimler Spesifik Moleküller Tarafından İnhibe Edilebilir

Birçok enzimin aktivitesi, inhibitörler olarak bilinen spesifik moleküllerin ve iyonların bağlanmasıyla inhibe edilebilir. İnhibitörler biyolojik sistemlerde enzim aktivitesi için önemli bir kontrol mekanizması olarak görev yapar. Allosterik enzimlerin düzenlenmesi bu kontrol türünü belirler. Ek olarak, birçok ilaç, bitkilerden elde edilen ekstraktlar veya bitki kökenli bileşikler de inhibitör görevi görmektedir. Belirli kimyasalların sebep olacağı inhibisyon, enzimin etki mekanizmasını açıklayabilmek için kullanılabilir (Jeremy vd., 2002).

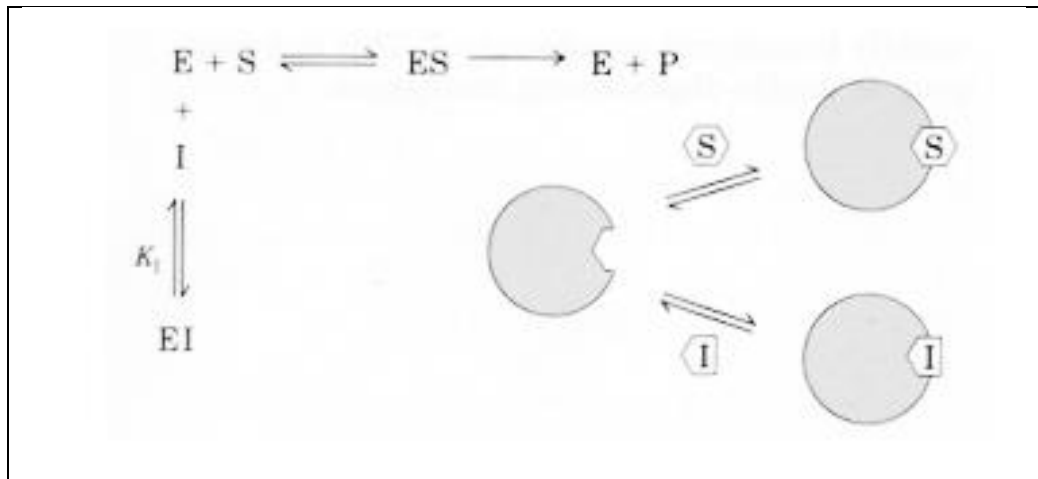
Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Geri dönüşümsüz bir şekilde enzime bağlanan inhibitör, hedef enziminden çok yavaş ayrılır, çünkü bağlantı yaygın olarak kovalent etkileşimlerle gerçekleşir. Bazı geri dönüşümsüz inhibitörler enzim inhibisyonunda ilaç olarak kullanılırlar. Penisilin, transpeptidaz enzimini kovalent olarak modifiye ederek etki eder, böylece bakteri hücre duvarlarının sentezini önler ve bakterileri öldürür. Aspirin, siklooksijenaz enzimini kovalent bir şekilde değiştirerek, enflamatuar sinyallerin sentezini azaltarak etki eder. Geri dönüşümlü inhibisyon, geri dönüşümsüz inhibisyonun aksine, enzim-inhibitör kompleksinin hızlı bir şekilde ayrılması ile karakterize edilir (Berg vd., 2002; Ramsay ve Tipton, 2017).

1.7 İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Geri Dönüşümlü Etkileri

Enzim inhibitörleri, enzimin katalitik etkisini değiştiren ve sonuç olarak katalizi yavaşlatan veya bazı durumlarda durduran maddelerdir. Geri dönüşümlü enzim inhibisyonları yarışmalı inhibisyon (kompetitif), yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif) ve yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif) olarak gerçekleşebilir. Bunların dışında substrat inhibisyonu ve geri beslemeli (feedback) inhibisyonu gibi inhibisyon tipleri de bulunmaktadır (Tainer vd., 1992).

1.7.1 Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon

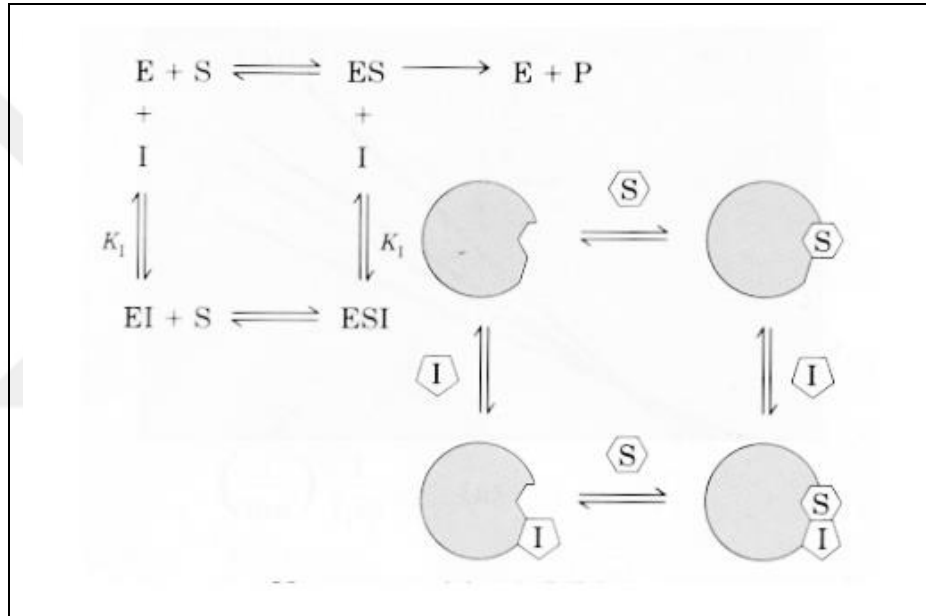
Substrat (S) ve substrata benzer bir inhibitör (I), enzimin aktif bölgesine bağlanmak için rekabet ettiğinde yarışmalı inhibisyon tipi görülür. Enzimin aktif bölgesine substrata benzeyen bir inhibitör bağlandığında, enzim-inhibitör kompleksi (EI) oluşur, bu sebeple aktif bölgeye substrat bağlanamayacağı için reaksiyon gerçekleşmez ve ürün (P) oluşamaz (Şekil 1.5). Yarışmalı inhibisyonda inhibitör enzimin substrata karşı olan ilgisini azaltır, bu sebeple K_m değeri yükselir. Yarışmalı inhibisyonda, ortama daha fazla substrat eklendiğinde ilgi yeniden substrat lehine dönebilir, çünkü artan substrat konsantrasyonu inhibitörün enzime bağlanabilme ihtimalini düşürür (Jeremy vd., 2002).



Şekil 1.5 Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

1.7.2 Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon

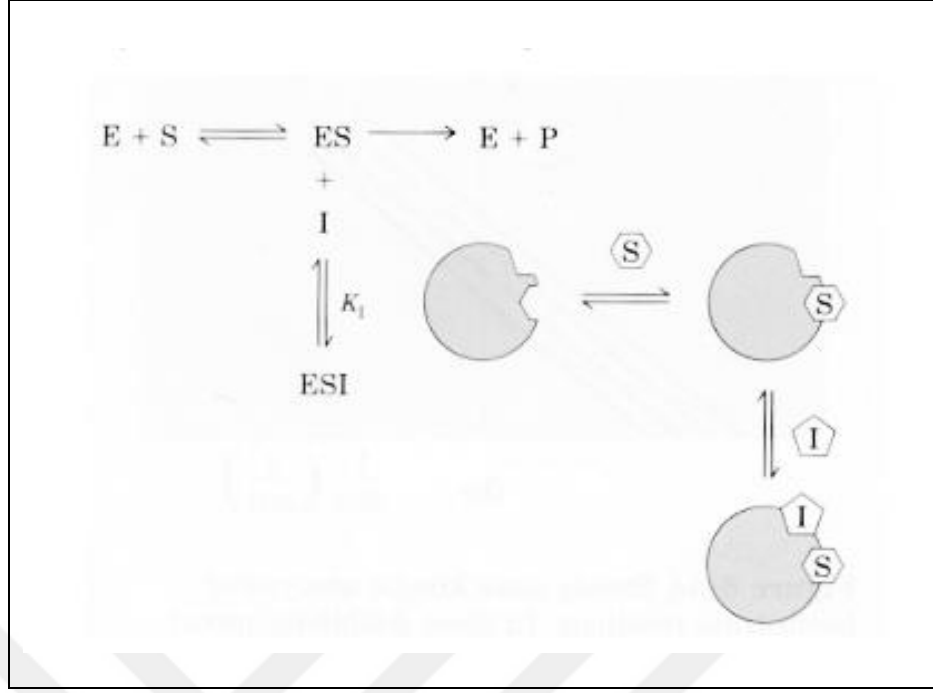
Yarışmasız inhibitörler enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile rekabet etmez, fakat substrat enzime bağlanmadan önce veya bağlandıktan sonra substratın enzime bağlandığı noktanın dışındaki noktalardan bağlanarak enzimi inhibe eder. Yarışmasız inhibitör yapı olarak substrata benzemez. Oluşan enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi, ES kompleksinden daha yavaş ürüne dönüşüp, enzimden ayrıldığı için reaksiyonun hızı yavaşlar (Şekil 1.6). Bu sebeple reaksiyonun V_{max} değeri düşerken, K_m değerinde bir değişiklik olmaz (Jeremy vd., 2002).



Şekil 1.6 Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon

1.7.3 Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon

Yarı yarışmalı inhibitörler enzimin aktif bölgesinin dışındaki bir yere bağlanır. Ancak, bu tip inhibisyonda inhibitör, sadece substrat enzime bağlandıktan ve ES kompleksi oluşuktan sonra, ES kompleksine bağlanır. Yarı yarışmalı inhibitörler ES kompleksi konsantrasyonunda düşmeye sebep olur (Şekil 1.7). Bu tip inhibisyonda hem V_{max} , hem de K_m değerleri değişir. Sonuç olarak hem V_{max} , hem de K_m değeri düşer (Jeremy vd., 2002).



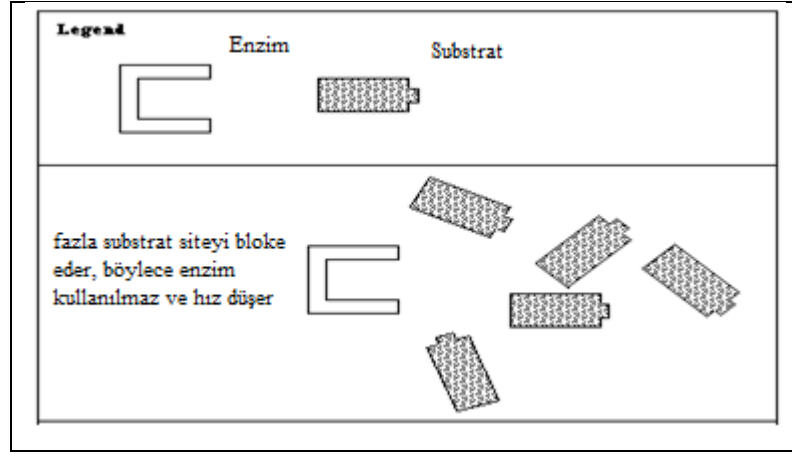
Şekil 1.7 Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

1.7.4 Substrat İnhibisyonu

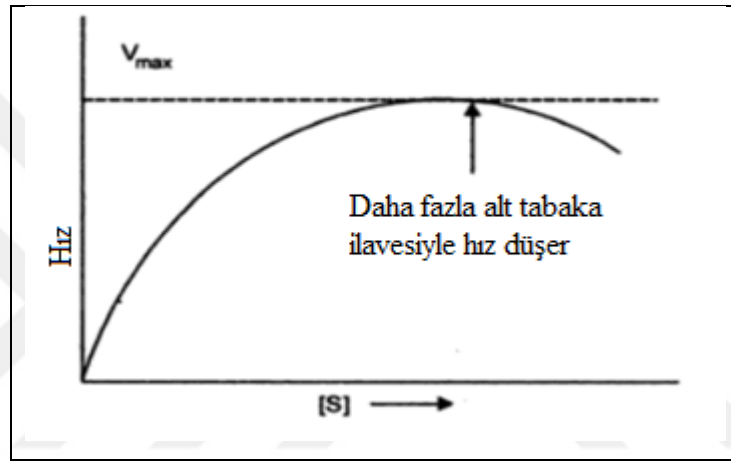
Enzim - substrat reaksiyonun gerçekleşeceği ortamda, aşırı miktarda substratın bulunduğu durumlarda da bazen enzimin inhibisyonu görülür. Bu durum substrat inhibisyonu olarak adlandırılır (Şekil 1.8a) (Reed vd., 2010).

Bu inhibisyon tipinde V_{max} noktasına ulaştıktan sonra artan substrat konsantrasyonuna bağlı olarak V_{max} değerinde bir düşüş meydana gelir (Şekil 1.8b).

Bazı enzimler bu şekilde kontrol edilir ve bu enzimin katalizlediği reaksiyon genellikle uzun bir biyokimyasal yolağın başlangıcındadır. Genellikle yolağın substratı tarafından aktive edilirken, ürünü tarafından inhibe edilirler. Böylece, sadece gerektiğinde yolak çalışmış olur. Bu süreç geri beslemeli (feedback) inhibisyonu olarak adlandırılır (Bisswanger, 2002).

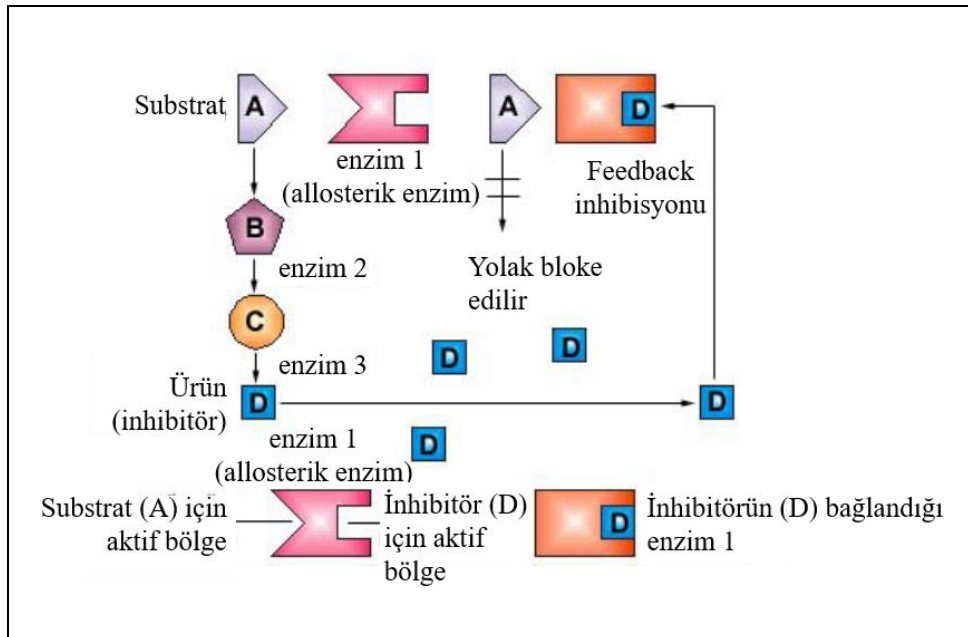


(a)



(b)

Şekil 1.8 a. Substrat inhibisyonu, b. Substrat inhibisyonunda V_{max} değerinin düşüşü



Şekil 1.9 Geri beslemeli (feedback) inhibisyonu süreci

1.8 İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimler biyokimyasal reaksiyonlar için oldukça spesifik katalizörlerdir, her enzim kendine uygun substrat için yüksek seçicilik gösterir. Örneğin, asetilkolinesteraz enzimi, nörotransmitter asetilkolinin, kolin ve asetik aside ayrışmasını katalize eder. Daha önce de bahsedildiği gibi, birçok enzim-substrat reaksiyonu, bir enzim-substrat kompleksinin oluştuğu, daha sonra oluşan ürünün ayrılmasıyla serbest kalan enzimin tekrar reaksiyona girdiği bir mekanizmayı takip eder.



Burada k_1, k_{-1}, k_2 , ve k_{-2} hız sabitleridir. Ürünün (P) üretilmesi için ilerleyen bir reaksiyonun hızı

$$oran = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] \quad (1.5)$$

Denklemin türetilmesi için 2 varsayımda bulunulmuştur.

1. Denklemden P'nin S'ye dönüştüğü ters reaksiyon dikkate alınmaz, çünkü denklem, ürün konsantrasyonu ([P]) sıfıra yaklaştığında başlangıç oranlarını ifade etmektedir.

$$oran = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

2. ES kompleksi bir ara üründür, yani ES konsantrasyonu ([ES]) aynı oranda üretildiği ve parçalandığı için nispeten sabit kalır.

ES'nin üretim hızı şu şekilde ifade edilebilir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad (1.6)$$

ES'nin yıkım hızı ise şu şekilde ifade edilmektedir.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] = k_1([E]_0 - [ES])[S] \quad (1.7)$$

Burada, $[E]_0$ enzimin orijinal konsantrasyonudur.

ES aynı anda üretilip parçalandığı için ve nispeten sabit kaldığı için bu iki eşitlik birbirine eşit olmalıdır. Bu denklem ES kompleksinin konsantrasyonu için çözülürse denklem aşağıdaki şekilde olur.

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}+[S]} = \frac{[E]_0[S]}{K_m+[S]} \quad (1.8)$$

Burada, $K_m \left(\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \right)$ Michaelis-Menten sabiti olarak ifade edilir.

Sonuç olarak denklem aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m+[S]} \quad (1.8)$$

K_m , substrat veya enzim konsantrasyonundan bağımsız olarak belirli bir enzim - substrat çifti için sabittir. Daha önce de belirtildiği gibi K_m , bir substratın bir enzime olan ilgisinin oransal ölçüsüdür. Düşük K_m , sıkı bağlanma, yüksek K_m zayıf bağlanma anlamına gelmektedir.

Bu denklemde zamana bağlı olarak ürün konsantrasyonundaki değişim ($d[P]/dt$) reaksiyonun belli bir andaki hızını vermektedir.

Yüksek substrat konsantrasyonlarında ($[S] \gg K_m$) K_m değeri ihmal edilecek düzeyde kalır. Bu sebeple, $k_2[E]_0$ değeri $d[P]/dt$ 'ye dolayısıyla, hıza (V) eşit olur. $[S] \gg K_m$ olduğu durumdaki hız, V_{max} 'dır.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m+[S]} \approx \frac{k_2[E]_0[S]}{[S]} = k_2[E]_0 = V_{max} \quad (1.9)$$

Aynı reaksiyon için çok düşük substrat konsantrasyonlarında ($[S] \gg K_m$), denklemin paydasında bulunan $[S]$ ihmal edilecek düzeyde kalır. Bu durumdaki hız aşağıda verilen değere eşit olur.

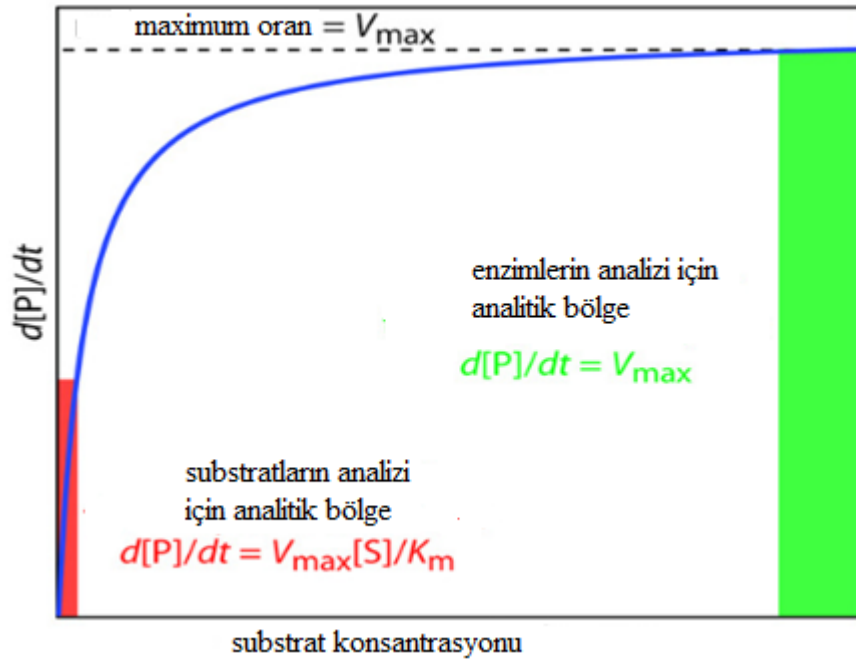
$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]} \approx \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m} = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \quad (1.10)$$

Sonuç olarak, denklemde $k_2[E]_0$ değeri yerine V_{max} , $d[P]/dt$ değeri yerine V yazılırsa aşağıda verilmiş olan ve Michaelis-Menten denklemi olarak bilinen denklem elde edilir.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.11)$$

Burada, V , reaksiyonun belli bir andaki hızı; K_m , Michaelis-Menten sabiti; V_{max} , maksimum reaksiyon hızıdır ve $[S]$ substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir (Segel, 1975).

Şekil 1.10, deneysel olarak elde edilebilecek ve Michaelis-Menten denklemi ile uyumlu olan Michaelis-Menten grafiğini göstermektedir.



Şekil 1.10 Substratların ve enzimlerin analizi için kullanılabilecek Michaelis-Menten grafiği

Bu reaksiyonda V 'nin, $V_{max}/2$ olduğu durumda Michealis-Menten denklemi aşağıdaki gibi olur.

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.12)$$

Bu denklem çözüldüğünde $K_m = [S]$ olarak bulunur. Dolayısıyla K_m değeri V_{max} 'ın yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonudur.

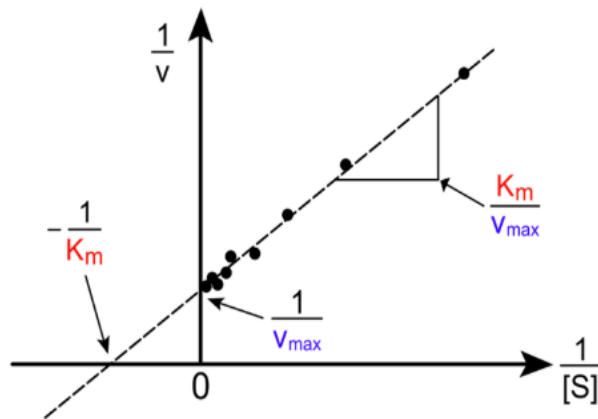
Enzim kinetiğinin incelenmesinde, Michealis-Menten grafiğine alternatif olarak kullanılan diğer bir grafik de Lineweaver-Burk grafiğidir.

Lineweaver-Burk grafiği (çift ters grafiği), 1934 'te Hans Lineweaver ve Dean Burk tarafından tanımlanmıştır. Bu yaklaşımda Michealis-Menten denkleminin her iki tarafının da tersi alınarak aşağıdaki denklem elde edilir.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.13)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.14)$$

Burada $1/V$ değerine karşılık $1/[S]$ grafiği çizildiğinde, eğimi K_m/V_{max} olan ve denklemi $y = mx + n$ denklemine benzeyen bir doğru denklemi elde edilir. Çizilen grafik ise Şekil 1.11'de verildiği gibi olacaktır (Segel, 1975).



Şekil 1.11 Lineweaver-Burk grafiği

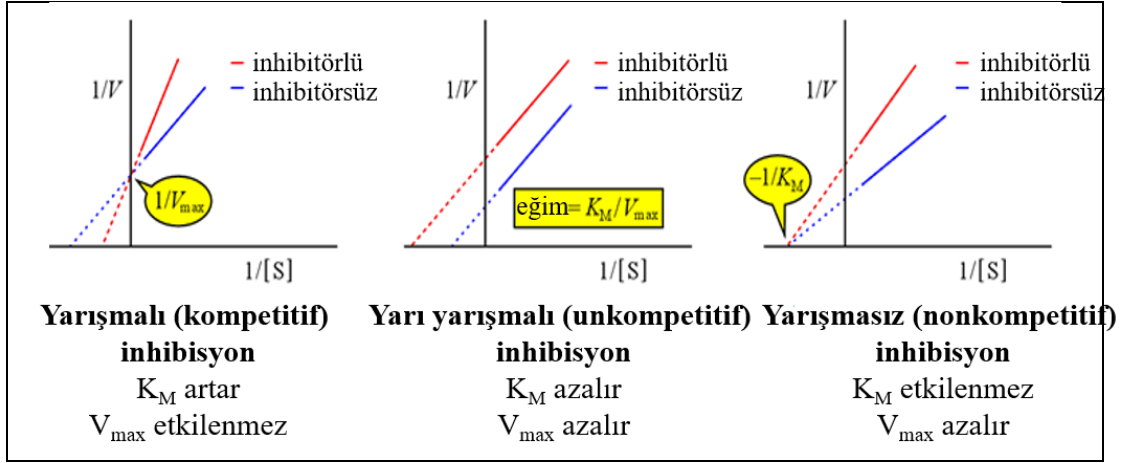
Lineweaver-Burk grafiğinde elde edilen doğrunun eğimi K_m/V_{max} iken, doğrunun y eksenini kestiği nokta $1/V_{max}$, x eksenini kestiği nokta ise $-1/K_m$ değerini vermektedir.

Lineweaver-Burk grafiği, güçlü bilgisayarların ve doğrusal olmayan regresyon yazılımlarının yaygın olmadığı dönemlerde K_m ve V_{max} gibi enzim kinetiğindeki önemli terimleri belirlemek için yaygın olarak kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, farklı enzim inhibisyon tipleri için hızlı ve görsel bir sonuç verdiği için bugün de özellikle enzim inhibisyon çalışmalarında Lineweaver-Burk grafiği kullanılmaktadır (Lineweaver ve Burk, 1934).

Lineweaver-Burk grafiği enzim inhibisyonunun türünü belirlemek için kullanıldığında, yarışmalı inhibisyon (kompetitif), yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif) ve yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif) kolaylıkla ayırt edebilir. Yarışmalı inhibisyonda (kompetitif), V_{max} değişmediği için çizilecek Lineweaver-Burk grafiğinde doğrunun y eksenini kestiği nokta, inhibe edilmemiş enzimle aynıdır. Öte yandan elde edilen doğruların eğimleri ve x eksenini kestiği noktalar birbirinden farklıdır (Şekil 1.12).

Yarışmasız inhibisyonda (nonkompetitif), K_m değeri etkilenmediği inhibitör kullanılmış ve kullanılmamış enzimler için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinde iki doğrunun x eksenini kesen noktalar aynı iken, y eksenini kesen nokta ve doğruların eğimleri farklıdır (Şekil 1.12).

Son olarak, yarı yarışmalı inhibisyonda (unkompetitif) ise her iki doğrunun hem x eksenini, hem de y eksenini kestiği noktalar birbirinden farklı olmasına rağmen, doğruların eğimleri birbirine eşittir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 İnhibisyonlar için Lineweaver – Burk grafikleri

1.9 Bu Çalışmada Kullanılan Enzimler

1.9.1 Amilaz

Amilaz, 1883'te Anselme Payen tarafından keşfedilip izole edilen ilk enzimdir. Nişastanın şekerlere hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Amilaz insanların ve bazı diğer hayvanların tükürüğünde bulunur (Hill ve Needham, 1970; Boehlke vd., 2015). Bitkiler ve bazı bakteriler de amilaz üretir. Amilaz, α -amilaz, β -amilaz ve γ -amilaz olmak üzere üç çeşittir (Tablo 1.2).

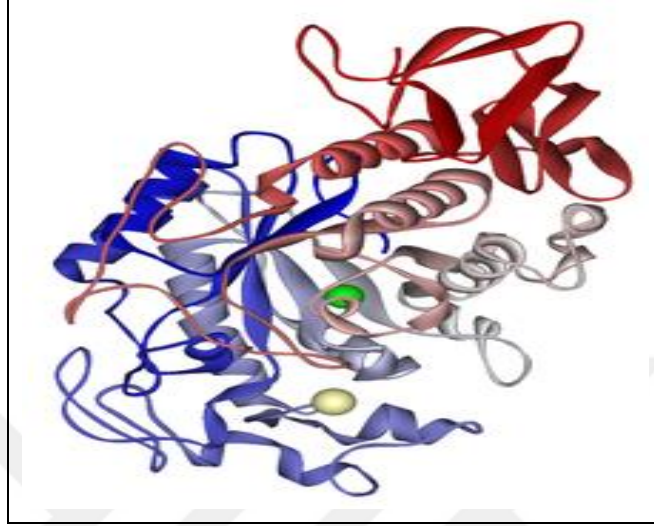
Tablo 1.2 Amilazın sınıflandırılması

	α -Amilaz	β - Amilaz	γ - Amilaz
Kaynak	Hayvanlar, bitkiler, mikroorganizmalar	Bitkiler, mikroorganizmalar	Hayvanlar, mikroorganizmalar
Doku	Tükürük, pankreas	Tohumlar, meyveler	İnce bağırsak
Kesme bölgesi	Gelişigüzel α -1,4 glikozidik bağı	İkinci α -1,4 glikozidik bağı	Son α -1,4 glikozidik bağı
Reaksiyon ürünleri	Maltoz, dekstrin, vb.	Maltoz	Glukoz
Optimum pH	6,7 - 7,0	4,0 - 5,0	3,0
Mayalamada optimum sıcaklık	63 - 70 C	55 - 65 C	

1.9.1.1 α -Amilaz

α -Amilaz (EC 3.2.1.1), nişasta ve glikojen gibi büyük, α -1,4 glikozit bağları bulunduran polisakaritlerin α -1,4 bağlarını hidrolize ederek glikoz ve maltoz açığa çıkartır. İnsanlarda ve diğer memelilerde bulunan ana amilaz formudur.

α -Amilaz, büyük çözünmeyen nişasta moleküllerini emilebilir moleküllere ayıran pankreas öz suyu ve tükürükte bulunan önemli bir enzimdir (Şekil 1.13) (Thomas ve Gillham, 1989).



Şekil 1.13 Amilaz yapısı

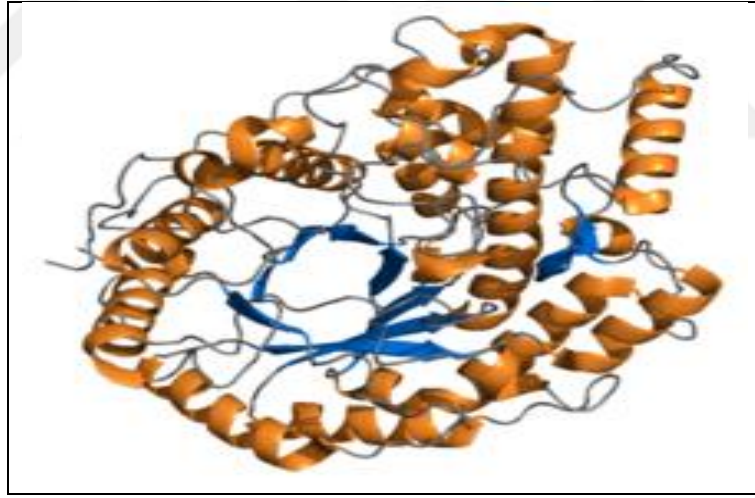
Nişasta ve glikojenin sindiriminde rol oynayan enzim olan α -amilazın inhibisyonu, diyabet ve obezite gibi karbonhidratların sindirilerek emilmesinin problem oluşturabileceği hastalıkların yanı sıra, diş çürüğü ve periodontal bazı problemlerin tedavisi için bir strateji olarak kabul edilir (Mahmood, 2016).

Bitkiler, α -amilaz inhibisyon potansiyeline sahip bileşikler içeren önemli bir kaynaktır ve bu sebeple terapötik veya fonksiyonel gıda olarak kullanılabilirler. α -amilaz inhibitörleri, hem ağızda, hem de ince bağırsakta karbonhidratların parçalanmasını geciktirir ve bu sayede yemek sonrası kanda glukoz konsantrasyonundaki ani yükselme engellenmiş olur. Diyabet, basitçe çeşitli sebeplere bağlı olarak, kandaki yüksek glikoz seviyesi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. α -Amilaz gibi karbonhidratların hidrolizinden sorumlu enzimlerin inhibisyonu, diyabet hastalarında yemek sonrasında kandaki glukoz konsantrasyonu yükselmesinin kontrolü için önemli bir stratejiye sahip olabilir. Tıbbi bitkiler, amilazı önleme potansiyeline sahip olan ve bu nedenle muhtemelen diyabetik kişilerde kullanılabilecek çeşitli kimyasal bileşenler içerir. Tıbbi bitkilerden elde edilecek bazı aktif bileşenlerin, yeni α -amilaz inhibitörü olma potansiyeli bulunmaktadır (Hanefeld ve Schaper, 2007).

Akarboz, pankreatik α -amilaz ve bağırsak çeperine bağlı α -glukozit hidrolazlar için yarışmalı, geri dönüşümlü inhibitör olarak işlev gören bir oligosakarittir. Akarboz, karbonhidratların sindirimini geciktirerek glikoz emilimini yavaşlatır ve bu durum yemek sonrası kandaki glikoz konantrasyonunun ani bir şekilde artmasını engeller. Bu sebeple, α -amilaz ve α -glukozidaz gibi enzimlerin inhibisyonu çalışmalarında referans inhibitör olarak kullanılır (Ramasubbu vd., 1996).

1.9.1.2 β -Amilaz

β -Amilaz (EC 3.2.1.2), bir polisakarit zincirinin indirgeyici olmayan ucundan başlayarak α -1,4 glikozit bağlarının hidrolizi ile maltoz birimleri açığa çıkaran bir eksoenzimdir (Şekil 1.14). β -Amilaz'ın, sistematik adı 4- α -D-glukan maltohidrolazdır. Esas olarak yüksek bitki tohumlarında, bakteriler ve mantarlarda bulunur (Pandey vd., 2016).



Şekil 1.14 β -Amilaz yapısı

1.9.1.3 γ -Amilaz

γ -Amilaz (EC 3.2.1.3) için glukan 1,4- α -glukosidaz; amiloglukosidaz; ekzo-1,4- α -glukosidaz; glukoamilaz; lizozomal α -glukosidaz ve 14- α D-glukan glukohidrolaz gibi alternatif isimler kullanılmaktadır. Bu enzim ince bağırsağın fırçamsı kenarında bulunur ve sistematik adı 4- α -D-glukan glukohidrolazdır. Bu enzim, zincirlerin indirgeyici olmayan uçlarında (1,4) bağı ile bağlanmış olarak bulunan α -D-glukoz

birimlerinin β -D-glikoz olarak serbest kalmasını sağlarlar. En aktif olduğu pH 3.0 değeri ile tüm amilazların içinde en asidik optimum pH 'ta çalışan amilaz olarak bilinir (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), 2019).

Bu enzimin çoğu formu, zincirin sekansındaki bir sonraki bağı 1,4 olduğu durumda, 1,6-alfa-D-glukosidik bağları hızla bir şekilde hidrolize eder. Mantarlarda, insan bağırsağı ve bakterilerde çeşitli formlarda olan glikozit hidrolaz (GH) ailesine aittirler (Ara vd., 2020).

1.9.2 α -Glukosidaz

α -Glukosidaz (EC 3.2.1.20) indirgeyici olmayan uçtaki 1,4 bağı hidrolize ederek bu bağ ile bağı α -glikoz molekülünü serbest bırakır (Larner vd., 1960). Glukoz birimleri, fonksiyonel olarak α -glukosidaz enzimine benzer bir enzim olan glukoamilaz tarafından da serbest bırakılabilir. α -Glukozidazın substrat afinitesi, substratın enzimin aktif bölgesine ilgisinden kaynaklanır (Chiba, 1997). Bir α -glukosidaz inhibitörü olan akarboz, bağırsaklardaki α -glukosidazı yarışmalı ve geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Bu inhibisyon, gecikmiş karbonhidrat sindirimi ve uzatılmış sindirim süresi ile glikoz emilim oranını düşürür. Akarbozun diyabet ile ilişkili semptomların gelişimini önleyebildiği bildirilmektedir (Bischoff, 1995). Bu nedenle, akarboz gibi α -glukosidaz inhibitörleri, diğer anti-diyabetik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılır.

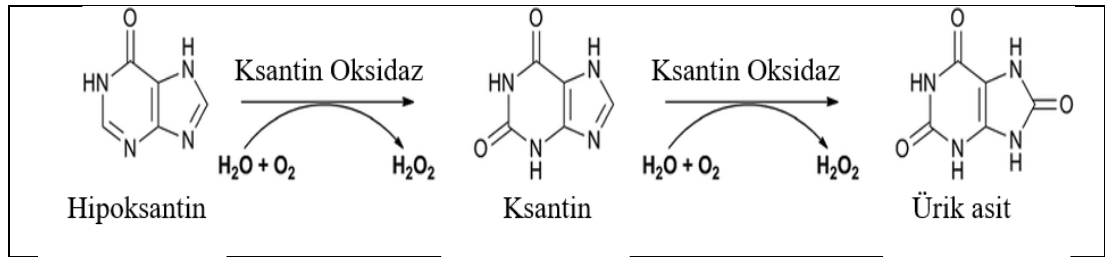
α -Glukozidaz (Şekil 1.15) ve α -amilaz, karbonhidratların sindiriminde rol oynayan önemli enzimlerdir. α -Amilaz, uzun zincirli karbonhidratların parçalanmasında rol oynarken, α -glukozidaz, nişastayı ve disakkaritleri glikoza ayırır (Spotti ve Campanella, 2020).



Şekil 1.15 α -Glukozidaz

1.9.3 Ksantin Oksidaz

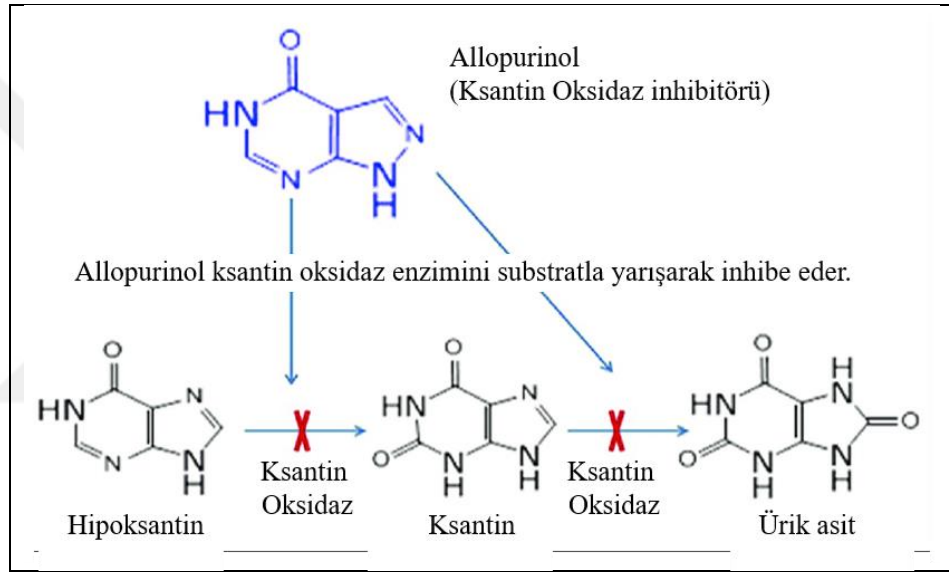
Ksantin oksidaz (OX) (EC 1.17.3.2), reaktif oksijen türleri üreten bir tür enzim olan ksantin oksidoredüktaz formudur (Ardan vd., 2004). OX, hipoksantin'in ksantine oksidasyonunu katalize eder ve ayrıca ksantinün ürik aside oksidasyonunu katalizinde rol oynar (Şekil 1.16). Bu enzimlerin, insanlar dahil bazı canlılarda pürinlerin katabolizmasında önemli görevleri bulunmaktadır (Hille vd., 2014). Schardinger (1902), sütün aldehytleri asitlere oksitleyebilen bir enzim içerdiğini ve buna metilen mavisinin indirgenmesinin eşlik ettiğini göstermiştir; bu enzime daha sonra "Schardinger enzimi" adı verildi. Morgan vd. (1922), sütün ksantin ve hipoksantini oksitleyebilen bir enzim içerdiğini ve buna O_2 'nin H_2O_2 'ye indirgemenin eşlik ettiğini ispat ettiler ve bu enzime XO adı verildi.



Şekil 1.16 Katalize edilmiş ksantin oksidaz yolları

Ksantin oksidaz, normalde serumda ve akciğerlerde bulunan süperoksit üreten bir enzimdir (Umamaheswari vd., 2007). Ksantin oksidaz ürik asit oluşumunun sağlandığı metabolik bir yolda görev aldığından, bir OX inhibitörü olan allopurinol gut tedavisinde kullanılmaktadır.

Ksantin oksidaz inhibitörleri diğer birçok hastalığın tedavisinde faydalı olabilir (Higgins vd., 2011). Bilinen birçok XO inhibitörü arasında, allopurinol (Şekil 1.17), oksipurinol ve febuxostat, hiperürisemi ve gut tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ngoc vd., 2012). XO inhibitörleri, ya allopurinol (Hille ve Massey, 1981; Hawkes vd., 1984) gibi pürin bağlanma bölgesinde veya benzimidazol gibi FAD kofaktör bağlanma bölgesine bağlanabilirler (Skibo, 1986). XO inhibitörleri, ürik asidin vücuttaki pürinlerden biyosentezini bloke ederek etki eder (Unno vd., 2004) ve ürik asit atılımının artırılmasının veya ürik asit üretiminin azaltılmasının gut riskini azaltmaya yardımcı olduğu ileri sürülmektedir (Umamaheswari vd., 2009).



Şekil 1.17 Ksantin oksidaz için referans inhibitörü olarak allopurinol

Gut metabolik bir hastalıktır. Hiperürisemi ile birlikte vücutta urat birikiminin artması nedeniyle oluşur. Gut, sinoviyal sıvıda monosodyum urat (MSU) kristallerinin birikmesiyle ilişkili eklemlerde serum asidi seviyelerini, tekrarlayan akut inflamasyon ataklarını arttıran heterojen klinik semptomlara sahiptir. MSU kristali, bazı dokularda veya eklemlerin çevresinde oluşur, böbrek bozukluklarına neden olur ve böbrek dokularında ürik asit geliştirerek böbrek taşlarını oluşturur (Ernst vd., 2008).

1.9.4 Asetilkolinesteraz

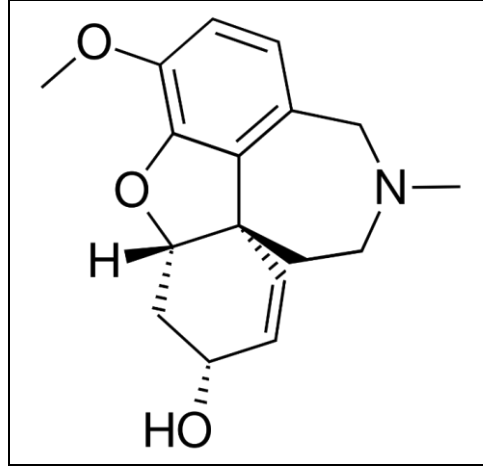
Asetilhidrolaz (AChE; EC 3.1.1.7) olarak da bilinen asetilkolinesteraz (AChE), vücuttaki primer kolinesterazdır. Asetilkolinin ve nörotransmitterler olarak işlev gören

diğer bazı kolinesterlerinin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. AChE esas olarak nöromüsküler bağlantılarda ve aktivitesinin sinaptik iletimini sonlandırmaya hizmet ettiği kolijernik türdeki kimyasal sinapslarda bulunur. Karboksilesteraz enzim ailesine mensuptur (Massoulié vd., 1993).

AChE, sinir ve kas, merkezi ve periferel dokular, motor ve duyu lifleri ve kolinerjik ve kolinerjik olmayan lifler gibi birçok iletken doku tipinde bulunur: AChE'nin aktivitesi, motor nöronlarda duyu nöronlarından daha yüksektir (Koelle, 1954; Chacko ve Cerf, 1960). Asetilkolinesteraz ayrıca alyuvar membranlarında bulunur ve burada Yt kan grup antijenlerini meydana getiren farklı formlar oluştururlar. Asetilkolinesteraz, benzer katalitik özelliklere sahip çoklu moleküler formlarda var olur, ancak bunlar oligomerik birleşme ve hücre yüzeyine tutunma yöntemi açısından farklılık gösterir (Bartels vd., 1993).

AChE'in, Alzheimer hastalığında (AH) semptomatik iyileşme için en uygun terapötik hedef olduğu kanıtlanmıştır, çünkü kolinerjik eksiklik AH'de tutarlı ve erken bir bulgudur. AH hafızayı ve günlük aktiviteleri yapmayı ve düşünme, öğrenme, iletişim kurma ve işleme yeteneğini yavaş yavaş yok eden bir beyin hastalığıdır.

Bununla birlikte, merkezi sinir sisteminde (MSS) AChE'nin seçici inhibisyonunun başlangıçta çok zor olduğu görülmüştür. Takrin kimyasalından önce fizostigmin, klasik AChE inhibitörü (AChEI), olarak AH tedavisinde kullanım potansiyeli açısından ele alınmıştır. Ancak fizostigmin kullanımı daha sonra düşük toleransı sebebiyle terk edilmiştir. AH tedavisinde kullanılan galantamin, rivastigmin, donepezil ve memantin olmak üzere dört adet ilaç mevcuttur. Bu ilaçlardan ilk üçü AChEI iken, memantin bir AChEI değildir. Bu tez çalışmasında da AChE inhibitörü özelliğinden dolayı pozitif kontrol olarak galantamin kullanılmıştır (Şekil 1.18).



Şekil 1.18 Galantamin

1.10 Tıbbi Bitkiler

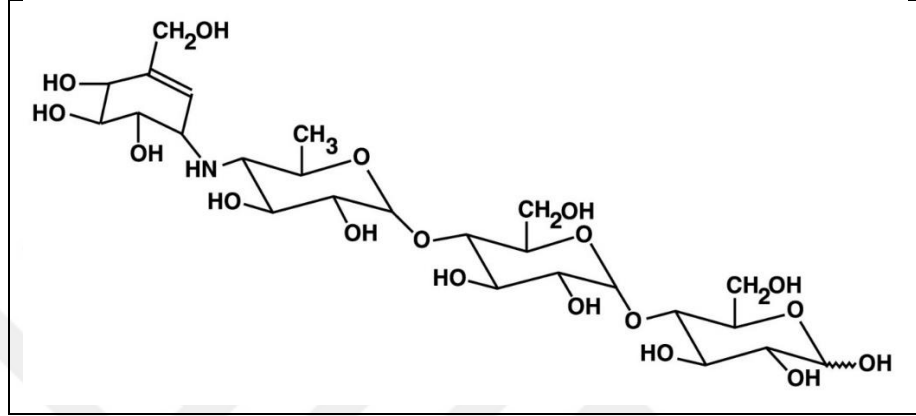
Antik çağlardan beri, bitkiler, mineraller, hayvanlar, mantarlar gibi doğal ürünler birçok hastalığı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Tıbbi bitkiler ve mikroorganizmalar yüzyıllar boyunca başlıca ilaç kaynağı olmuştur. Birçok önemli hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve/veya bitkilerden izole edilen bileşikler uzun yıllardır bilim insanlarının ilgisini çekmiştir (Cowan, 1999). Tıbbi bitkiler, antik çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisi için iyi bilinen doğal kaynaklardır. Tıbbi bitkiler, geleneksel yöntemlerle insanları tedavi eden kişiler ve bitki uzmanları tarafından sinir sistemi hastalıkları, nevroz, romatizma, arteriyel hipertansiyon, zihinsel bozukluk, anti-tümör, gut, cilt kanseri ve iltihaplanma gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde giderek daha fazla kullanılmaktadır (Saganuwan, 2010).

1.11 Bu Çalışmada Kullanılan Pozitif Kontroller

1.11.1 Akarboz

Akarboz ($C_{25}H_{43}NO_{18}$, moleküler ağırlık: 645,6048 g/mol), diyabetli hastalarda kullanılan bir bileşiktir. Nişasta sindirim blokörü olup, karbonhidratları sindirmek için gereken (glikozid hidrolazlar), özellikle ince bağırsakların fırçamsı kenarında bulunan α -glukosidaz ve pankreatik α -amilaz enzimlerini inhibe eder. Pankreatik α -amilaz, kompleks nişastaları ince bağırsakta oligosakkaritlere hidrolize ederken, membrana

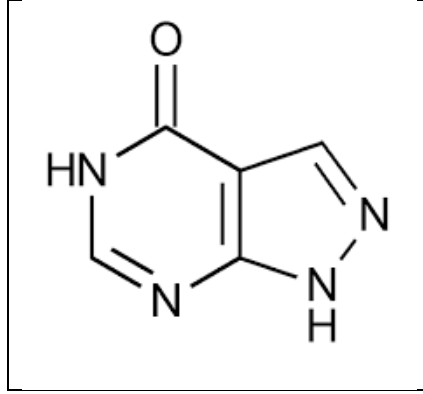
bağlı bağırsak α -glukozidazlar oligosakkaritleri, trisakkaritleri ve disakkaritleri ince bağırsakta hidrolize eder. Bu enzim sistemlerinin inhibisyonu, kompleks karbonhidratların sindirim oranını azaltır. Bu sayede daha az glikoz molekülü açığa çıktığı için, daha az glikoz emilir. Akarboz, indirgen ucunda maltoz bulunan bir akarviosin kısmından oluşur (Scheen vd., 1998).



Şekil 1.19 Akarbozun kimyasal yapısı

1.11.2 Allopurinol

Allopurinol ($C_{15}H_{14}N_4O$, moleküler ağırlık: 136,112 g/mol), Zyloprim markası altında satılan, yüksek kan ürik asit seviyelerini azaltmak için kullanılan bir ilaçtır (Pacher vd., 2006). Özellikle gut, belirli tiplerde böbrek taşı ve kemoterapi sonucunda oluşabilecek yüksek ürik asit seviyelerini önlemek için kullanılır (World Health Organization, 2009). Allopurinol bir purin türevidir; vücutta doğal olarak meydana gelen bir purin olan hiposantinin yapısal bir izomeridir ve ksantin oksidaz enziminin inhibitörüdür (Pacher vd., 2006). Ksantin oksidaz, insan purin metabolizmasının bir ürünü olan ürik asidin, hipoksantin ve ksantin ardışık oksidasyonu ile üretilmesini sağlar. Ksantin oksidazın inhibisyonu ürik asit üretimini bloke ederken, hipoksantin ve ksantin miktarında bir artışa sebep olur (Pacher vd., 2006). Ksantin, purinlere dönüştürülemezken; hipoksantin, adenozin ve guanozin monofosfatları oluşturabilir. Bu moleküllerin artan seviyeleri, purin biyosentezinin ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan amidofosforibosil transferazın geri beslemeli (feedback) inhibisyonuna sebep olabilir. Bu sebeple Allopurinol, ürik asit oluşumunu azaltır ve ayrıca purin sentezini de inhibe edebilir (Elion, 1978; Chen vd., 2016).



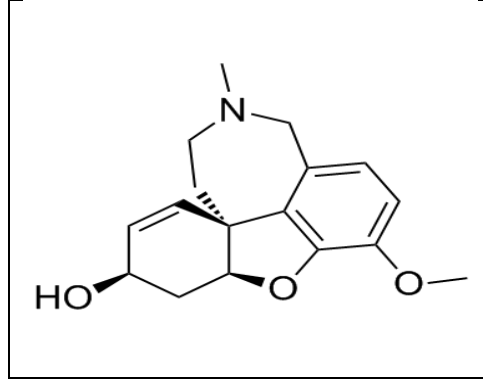
Şekil 1.20 Allopürinolün kimyasal yapısı

1.11.3 Galantamin

Galantamin ($C_{17}H_{21}NO_3$, moleküler ağırlık: 287,354 g/mol), Razadyne markası altında satılan, hafif ile orta dereceli Alzheimer hastalığı ve diğer çeşitli hafıza bozukluklarında bilişsel düşüşün tedavisi için kullanılır (Seltzer, 2010).

Galantamin kimyasal yapısı tersiyer bir amin içerir. Nötr bir pH 'da bu tersiyer amin genellikle bir hidrojene bağlanır ve çoğunlukla bir amonyum iyonu oluşturur (Birks, 2006).

Galantamin ayrıca vücudun tüm bölgelerinde zayıf bir rekabetçi ve geri dönüşümlü kolinesteraz inhibitörü olarak çalışır. Asetilkolinesterazı inhibe ederek, beynin belirli kısımlarındaki asetilkolinin konsantrasyonunu ve böylece etkisini artırır. Galantaminin nikotinik asetilkolin reseptörleri ve tamamlayıcı asetilkolinesteraz inhibisyonu üzerindeki etkileri çift bir etki mekanizması oluşturur. Bu eylemin Alzheimer hastalığının bazı semptomlarını hafifletebileceği varsayılmaktadır (Giacobini, 2003).

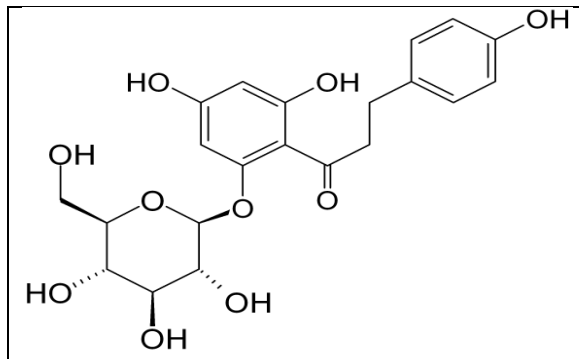


Şekil 1.21 Galantaminin kimyasal yapısı

1.12 Bu Çalışmada Kullanılan Bitki Kökenli Bileşenler

1.12.1 Florizin

Florizin ($C_{21}H_{24}O_{10}$, moleküler ağırlık: 436,413 g/mol), öncelikle olgunlaşmamış elmada, (Makarova vd., 2015) elma kökünün kabuğunda (Alam vd., 2014) ve eser miktarlarda çilekte bulunur. Florizin, polifenol sınıfına ait bir fitokimyasaldır. Doğal kaynaklarda, kuersetin, kateşin, epikateşin, prosiyanidinler ve rutin gibi diğer polifenollerle beraber bulunabilirler. Florizin, erime noktası 106-109 °C olan, beyaz sarı arası renkte kristali olan bir katıdır. Tatlıdır ve kristal formda dört adet su molekülü içerir. 200 °C'nin üstünde parçalanır. Eter ve soğuk suda az çözünür, ancak etanol ve sıcak suda iyi çözünür. Sulu çözeltilere uzun süre maruz kaldığında florizin, floretin ve glikoza hidrolize olur.

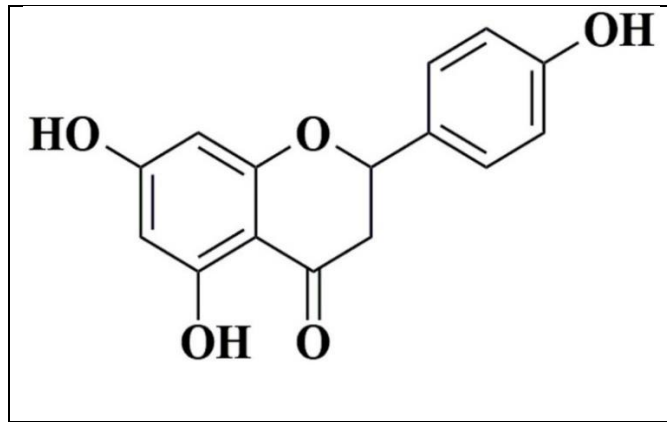


Şekil 1.22 Florizinin kimyasal yapısı

1.12.2 Naringenin

Naringin ($C_{15}H_{12}O_5$, moleküler ağırlık 272,256 g/mol), flavanon naringenin ve bir disakkarid olan neohesperidoz arasında bir flavanon-7-O-glikozittir. Bir flavonoid olan naringin, narenciye meyvelerinde, özellikle naringenin meyvenin acı tadından sorumlu olduğu greyfurtta doğal olarak bulunur. Ticari greyfurt suyu üretiminde, naringinaz enzimi naringin tarafından oluşturulan acıyı gidermek için kullanılır. İnsanlarda naringin, bağırsakta bulunan naringinaz tarafından acı olmayan aglikon naringenine metabolize edilir (Alam vd., 2014).

Naringin flavonoid ailesine aittir. Flavonoidler 15 karbon atomundan oluşan 3 halkadan meydana gelir ve bu 3 halkadan 2 tanesi 3 karbonlu zincir ile birbirine bağlanmış benzen halkalarıdır. Naringin, 7. karbon pozisyonunda naringenin adı verilen aglikon kısmına bağlı iki ramnoz ünitesi ile birlikte temel flavonoid yapıyı içerir. İki ramnoz birimi tarafından oluşturulan sterik engel, naringini aglikon benzeri olan naringeninden daha güçsüz kılar (Alam vd., 2014). İnsanlarda, naringinaz karaciğerde bulunur ve naringini naringenine hızla metabolize eder. Bu olay iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak, naringin, naringinazın α -L-ramnosidaz aktivitesi ile ramnoz ve prunine hidrolize edilir. Oluşan prunin daha sonra naringinazın β -d-glukosidaz aktivitesi ile naringenin ve glukozu hidrolize edilir. Naringinaz, doğada yaygın olarak bitkiler, mayalar ve mantarlarda bulunabilen bir enzimdir. Acılık giderme özellikleri nedeniyle ticari olarak kullanılmaktadır (Ribeiro, 2011).

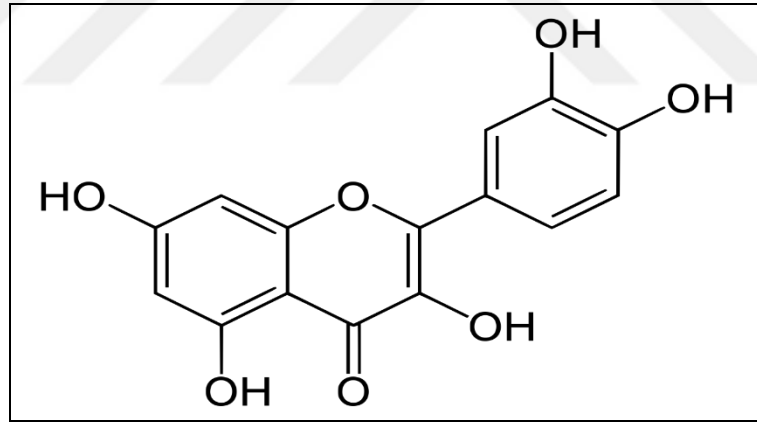


Şekil 1.23 Naringenin kimyasal yapısı

1.12.3 Kuersetin

Kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$, moleküler ağırlık: 302,236 g/mol), polifenollerin flavonoid grubundan bir bitki flavonolüdür. Birçok meyve, sebze, yaprak, tohum ve tahılda bulunur; kırmızı soğan ve süs lahanası gibi yaygın gıdaların çoğunda kayda değer miktarda kuersetin vardır. Kuersetin acı bir lezzete sahiptir ve diyet takviyeleri, içecekler ve yiyeceklerde bir içerik maddesi olarak kullanılır. Kuersetin, farklı bitki kaynaklarından gelen çeşitli bal türlerinde de bulunur (Petrus vd., 2011).

Kuersetinin diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe ettiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ve bu sebeple bir antioksidan olarak sınıflandırılmıştır. Oksidatif zincir reaksiyonlarından sorumlu serbest radikalleri tutucu olarak işlev görerek oksidasyonu durduran bir polifenolik kimyasal alt yapı içerir. Kuersetin ayrıca bir dizi proteinin aktivitesini aktive veya inhibe eder. Örneğin, kuersetin, non-spesifik protein kinaz enzim inhibitörüdür (Murakami vd., 2008; Russo vd., 2014).

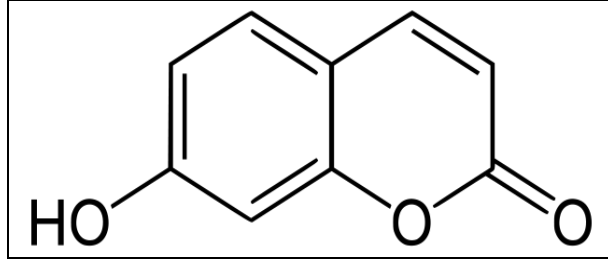


Şekil 1.24 Kuersetinin kimyasal yapısı

1.12.4 Umbelliferon

Umbelliferonun ($C_9H_6O_3$, moleküler ağırlık: 162,14 g/mol) ismi bitki olan Umbelliferae familyasından gelmektedir ve bu bitki familyasının adı da şemsiye şeklindeki çiçek yapısından dolayı verilmiştir. Umbelliferon, havuç, kişniş gibi iyi bilinen Apiaceae (Umbelliferae) familyası üyelerinin yanı sıra *Hieracium pilosella* (Asteraceae) ve *Hydrangea macrophylla* (Hydrangeaceae) gibi familyadaki diğer türlerde de bulunmaktadır. Ayrıca *Ferula communis* ve *Justicia pectoralis*

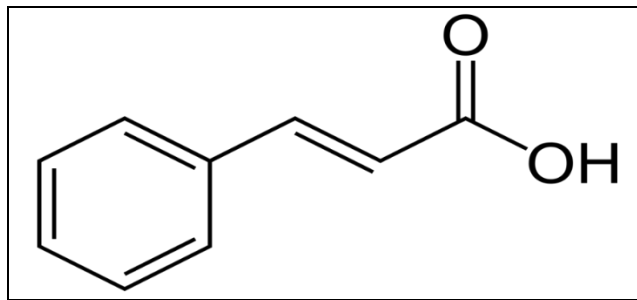
(Acanthaceae) bitkilerinde de bulunmaktadır (Lino vd., 1997; Leal vd., 2000). Umbelliferon, çok sayıda doğal ürün için ana bileşiktir.



Şekil 1.25 Umbelliferonun kimyasal yapısı

1.12.5 Sinnamik asit

Sinamik asit ($C_9H_8O_2$, moleküler ağırlık: 148,161 g/mol) suda az çözünen, ancak birçok organik çözücü içinde serbestçe çözünen beyaz kristal yapıda bir bileşiktir (Budavari vd., 1996). Doymamış karboksilik asit olarak sınıflandırılır ve birkaç bitkide doğal olarak hem cis hem bir trans izomer olarak bulunur (Garbe, 2012). Tarçın yağından ya da bazı bitkilerin balzamlarından elde edilir. Ayrıca shea bitkisinin yağında bulunur. Sinamik asidin balbenzeri kokusu vardır (Satyanarayana vd., 1985). Sinamik asit, tatlandırıcılarda, sentetik çivit ve bazı farmasötiklerde kullanılır. Ana kullanım şekli, parfüm endüstrisinde kullanılmak üzere metil sinamat, etil sinamat ve benzil sinamat üretmek için öncü bileşik olmasıdır (Budavari vd., 1996; Garbe, 2012).



Şekil 1.26 Sinamik asidin kimyasal yapısı

Bu doktora tezinde floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, kurkumin ve sinamik asit gibi bazı bitki kökenli sekonder metabolitlerin, α -amilaz, ksantin

oksidaz, asetilkolinesteraz ve α -glukozidaz enziminin aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmış ve sonuçlar pozitif kontrollerle karşılaştırılmıştır.



2. KAYNAK TARAMASI

Literatürde α -amilaz, ksantin oksidaz, asetilkolinesteraz ve α -glukozidaz enzimlerinin bitki ekstraktları ve bitki kökenli metabolitler ile inhibe edilmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak çalışmaların büyük bir bölümü saflaştırılmış bitki kökenli sekonder metabolitler yerine bitkisel ekstraktların doğrudan kullanılması şeklindedir.

Oboh vd. (2015), yapmış oldukları çalışmalarda kuersetinin α -amilazın aktivitesi üzerine etkisini incelemiş ve kuersetin için IC_{50} değerinin $507,61 \pm 10,8 \mu\text{g/L}$ olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer bir deyişle yaklaşık 1 mg/L kuersetin α -amilaz aktivitesinin %100 inhibe edilmesi için yeterli olduğu bulunmuştur.

Martinez-Gonzalez (2019) ise kuersetinin α -amilaz üzerinde IC_{50} değeri olarak $12,70 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ile inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu ve kuersetin ile α -amilaz arasındaki etkileşimlerin Leu165, Trp59 (van der Waals), Trp59 (hidrofobik etkileşimler) ve Gln63, Arg195 ve Asp197 (hidrojen bağı) ile olduğunu öngörmüştür.

Nickavar ve Amin (2011), doğal kaynaklardan antidiyabetik bileşikler üzerinde yaptıkları çalışmada, *Vaccinium arctostaphylos* yapraklarının metanol ekstraktının pankreas α -amilaz aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibitör aktivitesi sergilediğini ($IC_{50} = 0,53 \text{ mg/mL}$) bulmuştur. Ekstraktan elde edilen fraksiyonda, ekstrakta bulunan aktif α -amilaz inhibitörünün kuersetin olduğu gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca kuersetinin, α -amilaz aktivitesini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği de gösterilmiştir. Sonuç olarak, kuersetin ve pozitif kontrol olarak akarbozun α -amilaz inhibisyonlarının IC_{50} değerleri sırasıyla 0,17 mM ve 0,033 mM olarak bulunmuştur.

Mohos vd. (2019), kuersetinin ksantin oksidaz enzimi ile etkileşimini araştırmıştır. Çalışmada beş konjugat ve 23 mikrobiyal metabolitin inhibe edici etkileri, pozitif kontrol olarak allopurinol kullanılarak 6-merkaptopürin ve ksantin substratı (her ikisi de $5 \mu\text{M}$ 'de) kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak kuersetin-3'-sülfat, izorhamnetin, tamariksetin ve pirogallolün güçlü ksantin oksidaz inhibitörleri olduklarını gösterilmiştir. Sülfat ve metil konjugatları, hem 6-merkaptopürin, hem de

ksantin için benzer şekilde güçlü inhibitörler olarak bulunmuş ($IC_{50} = 0,2 - 0,7 \mu M$); bununla birlikte, pirogallolün ksantin oksidasyonunu ($IC_{50} = 1,8 \mu M$) güçlü şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. Sülfat ve metil konjugatları allopurinole göre ($IC_{50} = 7,0 \mu M$) yaklaşık on kat daha güçlü şekilde inhibisyon göstermişlerdir ($IC_{50} = 0,2 - 0,6 \mu M$) ve kuersetin ile kıyaslandığında ($IC_{50} = 1,4 \mu M$) daha güçlü bir inhibisyon oluşturmuşlardır.

Adisakwattana vd. (2009), sinnamik asit türevlerini ve bunların bağırsak α -glukozidaz üzerindeki inhibitör aktivitelerini incelenmiştir. 11 sinnamik asit türevinden kafeik asit, ferulik asit ve izoferulik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla $0,74 \pm 0,01$; $0,79 \pm 0,04$ ve $0,76 \pm 0,03$ mM ile α -glukozidaz için en güçlü inhibitörler olurken, ferulik asit ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,01$ mM) ve izoferulik asit ($IC_{50} = 0,45 \pm 0,01$ mM) etkili bağırsak sükras inhibitörleri olmuşlardır. Bununla birlikte, tüm sinnamik asit türevlerinin, pankreas α -amilaz inhibisyonunda inaktif olduğu bulunmuştur.

Nessa vd. (2010), *Blumea balsamifera* yaprak ekstraktları ve flavonoidlerinin ksantin oksidaz (XO) inhibitör aktivitelerini incelemişlerdir. Sonuçlara göre metanol ekstraktı ($IC_{50} = 0,111$ mg/mL), kloroform ($0,138$ mg/mL) ve petrol eteri ekstraktlarından ($0,516$ mg/mL) daha yüksek XO inhibe edici aktivite göstermiştir. İzole edilmiş flavonoidlerin ve test edilen referans bileşiklerin XO inhibitör aktivitesi ise allopurinol > luteolin > kuersetin > tamariksetin > 5,7,3',5'-tetrahidroksiflavanon > ramnetin > luteolin-7-metileter > blumeatin > dihidrokuersetin-4'-metil eter > dihidrokuersetin-7,4'-dimetil eter > l-askorbik asit şeklinde azalma göstermiştir.

Dastjerdi vd. (2015), *Teucrium* cinsine ait bazı türlerden elde ettiği alkol ekstraktlarının α -amilaz üzerine inhibitör etkilerini incelemişlerdir. *T. polium*, *T. orientale* ve *T. oliverianum*'dan elde edilen ekstraktların inhibisyon aktiviteleri gözlemek için α -amilaz enzimi üzerine IC_{50} değerlerini hesaplamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda bu üç bitkiye ait ekstraktın da α -amilaz inhibisyonu gösterdiği ortaya konmuştur. *T. polium*'un IC_{50} değeri $3,63$ mg/mL olarak gözlenmişken, *T. oliverianum* ve *T. orientale*'nin IC_{50} değeri sırasıyla $3,86$ ile $13,93$ mg/mL olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz için IC_{50} değeri $0,037$ mg/mL şeklinde gözlenmiştir.

Nair vd. (2013), *Cinnamomum zeylanicum*, *Artocarpus altilis*, *Piper betel* ve *Artocarpus heterophyllus* bitkilerinden elde edilen ekstraktların α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitör aktivitesini incelemişler ve sonuç olarak IC_{50} değerlerini α -amilaz inhibisyon testinde *Cinnamomum zeylanicum* için 130,55 $\mu\text{g/mL}$, *Artocarpus altilis* için 118,88 $\mu\text{g/mL}$, *Piper betel* için 84,63 $\mu\text{g/mL}$ ve *Artocarpus heterophyllus* için 70,58 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca *A. altilis*, *A. heterophyllus*, *C. zeylanicum* ve *P. betel* ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyon testinde ise IC_{50} değerlerini sırasıyla $129,85 \pm 10,29$; $76,90 \pm 9,55$; $140,01 \pm 10,08$ ve $96,56 \pm 12,93$ $\mu\text{g/mL}$ olarak gözlemlemişlerdir.

Abu Soud vd. (2004), 13 bitkiye ait ekstraktın α -amilaz inhibitör aktivitesini incelemiştir. Sonuç olarak, taranan bitkilerden ikisinin, %80'den daha fazla gibi belirgin bir α -amilaz inhibitör aktivitesi ortaya koyduğu gözlenmiştir. Bu bitkilerin IC_{50} değerinin, kurutulmuş ham ekstraktları baz alınarak hesaplandığında, *Aloe vera* ve *Paronychia argentea* için sırasıyla $0,081 \pm 0,003$ ve $0,20 \pm 0,02$ mg/mL olduğu bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bitki ekstraktlarının pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozdan ($IC_{50} = 0,004 \pm 0,0003$ mg/mL) yaklaşık 20 kat daha düşük aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tamil vd. (2010), yaptıkları çalışmada bir Hint tıbbi bitkisi olan *Phyllanthus amarus*'un α -amilaz inhibitör aktivitesini incelemiştir. Ekstraktlar hazırlanırken etanol, kloroform ve hekzan çözücülerini kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 60, 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) test örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kloroform ekstraktının, α -amilaz aktivitesini inhibe edemediğini göstermiştir. Bununla birlikte, akarbozun aktivitesi (IC_{50} değeri $83,33 \pm 0,34$ $\mu\text{g/mL}$) ile kıyaslandığında, *P. amarus* bitkisinden elde edilen etanol ve hekzan ekstraktlarının sırasıyla $36,05 \pm 4,01$ $\mu\text{g/mL}$ ve $48,92 \pm 3,43$ $\mu\text{g/mL}$ 'lık IC_{50} değerleriyle kayda değer bir α -amilaz inhibe edici aktivite sergilediği de görülmüştür.

Bhutkar ve Bhise (2012), antidiyabetik aktivitesi olduğu bilinen bazı bitkilerin farklı kısımlarının su ekstraktları çıkartmış ve α -amilaz aktivitesini inhibe etme potansiyellerini araştırmıştır. Sonuçlar, *Tamarindus indica* yapraklarından elde edilen

ekstraktın 9 mg/mL'lik konsantrasyonda, %71,93 ile en yüksek α -amilaz inhibisyonuna sebep olduğunu, bu değeri sırasıyla %68,02 ve %55,19 inhibisyonla *Catharanthus roseus* ve *Caesalpinia bonducella*'nın izlediğini göstermiştir. Gövdeden elde edilen ekstraktlarda ise *C. roseus* gövde ekstraktının 9 mg/mL'lik konsantrasyonu %74,88 ile en yüksek inhibisyonu göstermiş, bu değeri %70,22 ve %63,54'lik inhibisyon ile sırasıyla *C. bonducella* ve *T. indica* izlemiştir. Tohum ekstraktlarında *C. bonducella* 9 mg/mL'lik konsantrasyonda en yüksek inhibisyon değerini (%87,26) gösterirken, benzer konsantrasyonda *T. indica* ve *C. roseus*'a ait ekstraktlar sırasıyla %69,72 ve %62,85 inhibe edici aktivite sergilemiştir. Seçilen bitki türlerinin kök örneklerinin sulu ekstraktları incelendiğinde, 9 mg/mL'lik konsantrasyonda *C. bonducella*, %85,93 inhibisyon ile maksimum inhibitör aktiviteyi, ardından *C. roseus* ve *T. indica* sırasıyla %70,44 ve %59,17 inhibisyon göstermiştir.

Nickavar ve Amin (2011), *Vaccinium arctostaphylos* yapraklarından metanol ile elde edilen ekstraktın ve bu bitkiden elde ettikleri kuersetinin α -amilaz inhibisyon etkisini incelemiştir. *V. arctostaphylos* yaprak ekstraktı pankreas α -amilaz aktivitesi üzerinde güçlü inhibe edici aktivite ($IC_{50} = 0,53$ (0,53 - 0,54) mg/mL) göstermiştir. Ekstraktan kuersetin izole edilmiş ve izole edilen kuersetin, IC_{50} değeri 0,17 (0,16 – 0,17) mM ile doza bağlı bir inhibitör etkisi göstermiştir.

Khacheba vd. (2014), altı adet tıbbi bitkinin su ve alkol ekstraktlarının α -amilaz inhibitör etkisini incelemiştir. Ekstraktların, konsantrasyona bağlı bir şekilde *Aspergillus oryzae* α -amilazının enzimatik aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. İnhibisyon sabitlerinin değerleri (K_i) Dixon ve Lineweaver-Burk yöntemlerine göre belirlenmiştir. Sonuçlar K_i değerlerinin tüm ekstraktlar için 55 ppm'den az olduğunu göstermiştir. *Salvia officinalis* ekstraktında ise değeri 8 ppm olan güçlü bir inhibisyon tespit edilmiştir.

Telagari ve Hullatti (2015), *Adiantum caudatum* ve *Celosia argentea*'nın alkol ekstraktının ve dört fraksiyonunun, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerini incelemiştir. *A. caudatum* ekstraktından (0,5 mg/mL'lik konsantrasyonda) 4 adet fraksiyon elde edilmiş ve bu fraksiyonların α -amilaz inhibitör aktiviteleri sırasıyla %32,42; %46,25; %61,45; %20,12 ve %26,04 şeklinde

gözlendiğinde, α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri ise yine sırasıyla %36,42; %47,25; %63,45; %29,22 ve %32,34 şeklinde bulunmuştur. Öte yandan, *C. argentea* ekstraktından elde edilen 4 adet fraksiyonda α -amilaz inhibitör aktiviteleri sırasıyla %22,42; %21,04; %29,04; %30,12 ve %59,45 olarak, α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri ise yine sırasıyla %37,62; %31,04; %37,24; %29,34 ve %61,45 şeklinde bulunmuştur. Bunlara ek olarak, akarboz, 0,108 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeri ile α -amilaz inhibisyon aktivitesi ve 0,083 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeri ile α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi gösteren pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bütün fraksiyonlar içinde, *A. caudatum*'un 2 nolu fraksiyonu ve *C. argentea*'nın 4 nolu fraksiyonu, 0,241 ve 0,211 (α -amilaz ve α -glukozidaz) ile 0,294 ve 0,249 mg/mL'lik (α -amilaz ve α -glukozidaz) IC₅₀ değerleriyle en iyi enzim inhibitör aktivitesini göstermiştir.

Qaisar vd. (2014), *Croton bonplandianum* bitkisinin metanol ekstraktında bir aktivite görünmezken, diklorometan ekstraktında α -glukozidaz enzimi inhibisyonu için IC₅₀ konsantrasyonunun 14,93 mg/mL olduğunu ve kullanılan ekstraktın ise α -glukozidaz enzimi aktivitesi %97,89 oranında inhibe ettiğini tespit etmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun ise %92,23 inhibisyona sebep olduğu ve enzim inhibisyonu için IC₅₀ konsantrasyonunun 38,25 mg/mL olduğunu bulmuşlardır.

Elya vd. (2012), Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae ve Rubiaceae'ye ait bazı bitkilerin α -glukozidaz inhibitör aktivitelerini incelemiştir. Çalışma sonucunda seçilen bitkilerin yaprak ve dallarından %80 etanol ile elde edilen ekstraktların α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi tespit edilmiştir. Kullanılan 45 örneğin 37'si 2,33 - 112,02 μ g/mL arasındaki IC₅₀ değeriyle güçlü α -glukozidaz inhibitörü olarak etki etmiştir. Sonuçlar, pozitif kontrol olan akarboz (IC₅₀ = 117,20 μ g/mL) ile karşılaştırılmıştır.

Dej-Adisai ve Pitakbut (2015), Fabaceae familyasından on dokuz bitkinin α -glukozidaz inhibitör aktivitesini incelemiştir. Bu bitkilerden *Caesalpinia pulcherrima* yaprakları IC₅₀ konsantrasyonu olarak 436,97 $\pm$ 9,44 μ g/mL değeriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca, *Bauhinia malabarica* yaprakları IC₅₀ konsantrasyonu olarak 745,08 $\pm$ 11,15 μ g/mL değeriyle orta derecede aktivite ortaya koymuştur. Bununla birlikte, diğer bitkilerin bazıları hafif dereceli bir aktivite gösterirken, bazılarının hiçbir inhibitör etkisine sahip olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada da

pozitif kontrol olarak akarboz kullanılmış ve IC₅₀ değeri 331 ± 4,73 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Hamza vd. (2015), Asya ve Akdeniz bölgelerindeki anti-diyabetik bitkileri inceleyerek, bu bitkileri potansiyel α-glukozidaz inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirmiştir. Değerlendirilen bu bitkilerden 10 tanesi, pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozdan çok daha yüksek bir inhibisyon etkisi göstermiştir. *Punica granatum* 3,59 ± 0,11 µg/mL olan bir IC₅₀ değeri ile en yüksek inhibitör aktivitesini gösterirken, bunu 8,08 ± 0,10 µg/mL IC₅₀ değeri ile *Psidium guajava* ve 9,87 ± 0,14 µg/mL IC₅₀ değeri ile *Cinnamomum zeylanicum* izlemiştir. Ayrıca tüm bitkilerin α-glukozidaz inhibisyonu ile toplam fenolik içeriği arasında yüksek bir korelasyon (r = 0,65, p <0,001) gözlenmiştir.

Rouzbehan vd. (2017), üç tür Labiatae ekstraktının farklı fraksiyonlarının α-glukozidaz inhibisyonu kinetiğini incelemiştir. Sonuçlar, *Zataria multiflora* bitkisinden elde edilmiş etil asetat fraksiyonu (IC₅₀= 0,35 ± 0,01 mg/mL) ve *Salvia mirzayanii* (IC₅₀= 0,4 ± 0,11 mg/mL) bitkisinden elde edilmiş petrol eteri fraksiyonlarının diğer örnekler ve pozitif kontrol olan akarboz (IC₅₀= 7 ± 0,19 mg/mL) ile karşılaştırıldığında en yüksek α-glukozidaz inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Kullanılan ekstraktların hepsi ya yarışmasız ya da yarı yarışmalı inhibisyon sergilemiştir.

Kong vd. (2000) bazı Çin tıbbi bitkilerinde ksantin oksidazın inhibe edici aktivitesini incelemiştir. Çalışmada toplamda 122 geleneksel Çin tıbbi bitkisi seçilmiş, bu türlerden elde edilen metanol ekstraktları arasından 69'unun 100 mg/mL'de inhibe edici olduğu ve 29'unun ise %50'den fazla inhibisyona sahip olduğu gösterilmiştir. 100 mg/mL su ekstraktlarında ise, 40'nın aktif olduğu ve 13'ünün %50'den fazla inhibisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. 50 mg/mL'de, 58 metanol ve 24 su ekstraktında inhibe edici aktivite görülmüştür. Ekstraktlardan en aktif olanı, *Cinnamomum cassia* (Lauraceae) dalından metanol ile elde edilmiş ekstrakt iken (IC₅₀ = 18 mg/mL), bunu *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae) (IC₅₀, 22 mg/mL) çiçeği ve *Lycopus europaeus* (Lamiatae) yapraklarından elde edilen ekstraktlar (IC₅₀ = 26 mg/mL) izlemiştir. Su ekstraktları arasından ise enzimin en güçlü inhibisyonu

Polygonum cuspidatum (Polygonaceae) ($IC_{50} = 38 \text{ mg/mL}$) kökünden elde edilmiş olan ekstraktta görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan allopurinolün IC_{50} değeri ise $1,06 \text{ mg/mL}$ olarak bulunmuştur.

Boumerfeg vd. (2018), *Teucrium polium* L. ekstraktlarının ksantin oksidaz inhibitör aktivitelerin ve antioksidan özelliklerini incelemiştir. Çalışmada *T. polium* ekstraktları metanol (CE), kloroform (CHE) ve etil asetat (EAE) kullanılarak elde edilmiş olup, tüm ekstraktların, ksantin oksidaz üzerinde IC_{50} değerleri $0,80 \pm 0,07$ ila $11,76 \pm 0,50 \text{ } \mu\text{M}$ /kuersetin eşdeğeri arasında değişen inhibe edici özellik gösterdiği bulunmuştur.

Gholamhoseinian vd. (2017), potansiyel ksantin oksidaz inhibitör aktiviteleri bakımından altmış bitkinin %70'lik metanol ekstraktlarını incelemiştir. Çalışılan ekstraktlar arasında *Quercus infectoria* ve *Mentha longifolia*, ksantin oksidaz üzerinde %70 'den fazla inhibe edici etki göstermiştir. Lineweaver-Burk grafiği ile elde edilen sonuçlar, *M. longifolia* ekstraktının yarışmacı inhibisyon, *Q. infectoria*'nın sınırlı yarışmacı inhibisyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışmada ksantin oksidaz için K_m değeri $1,81 \text{ mM}$ ve V_{max} değeri $2,01 \text{ mM.min}^{-1}$ olarak gözlenmiştir.

Azmi vd. (2012), ksantin oksidaz inhibitör potansiyeline sahip bazı bitki ekstraktlarının aktivitesini incelemiştir. Çalışmada *Averrhoa carambola*, *Carica papaya*, *Dimocarpus longan malesianus*, *Manilkara zapota* ve *Salacca zalacca* olmak üzere beş bitki türünün, farklı kısımlarından ksantin oksidaz inhibitörlerini (XOI) ekstrakte etmek için distile su, %70 metanol ve saf etanol kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, *C. papaya* olgun yapraklarının su ekstraktları ksantin oksidaz aktivitesini $75,68 \pm 0,1$ oranında inhibe ederek umut verici bir aktivite göstermiştir. Elde edilen bu değer, pozitif kontrol olarak kullanılmış olan allopurinolün inhibitör etkisinden ($93,69 \pm 0,2$) sadece %6,76 düşük olarak gözlenmiştir. Öte yandan, IC_{50} değerleri bakımından incelendiğinde, allopurinolün *C. papaya* olgun yapraklarının su ekstraktına kıyasla ($4,33 \text{ } \mu\text{g/mL}$) daha düşük bir IC_{50} değeri ($3,74 \text{ } \mu\text{g/mL}$) gösterdiği bulunmuştur.

Hendriani vd. (2016), Endonezya'da gut tedavisi için kullanılan 12 tıbbi bitkinin ksantin oksidaz inhibitör aktivitesi incelemiştir. Kullanılan bitkilerden *S. rhombifolia*

köklerinden elde edilen etanol ekstraktı IC_{50} 21,43 $\mu\text{g/mL}$ ile en yüksek ksantin oksidaz inhibisyonu gösterirken, bunu IC_{50} 23,64 $\mu\text{g/mL}$ 'lik bir değerle *S. arvensis* yaprakları izlemiştir.

Bustanji vd. (2011), 23 adet tıbbi bitkinin metanolik ekstraktlarının ksantin oksidaz inhibitör aktivitesini incelemiştir. Bu bitkilerden 6 tanesinin %39'dan fazla inhibisyon etkisi ile iyi inhibitör aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Bu ekstraktlar, *Salvia spinosa* L. (IC_{50} = 53,7 $\mu\text{g/mL}$), *Anthemis palestina* Boiss. (IC_{50} = 168,0 $\mu\text{g/mL}$), *Chrysanthemum coronarium* L. (IC_{50} = 199,5 $\mu\text{g/mL}$), *Achillea biebersteinii* Afansiev (IC_{50} = 360,0 $\mu\text{g/mL}$), *Rosmarinus officinalis* L. (IC_{50} = 650,0 $\mu\text{g/mL}$) ve *Ginkgo biloba* L. (IC_{50} = 595,8 $\mu\text{g/mL}$) bitkilerinden elde edilen ekstraktlardır. Ayrıca, dört bitki de *Lavandula angustifolia* Mill. (%28,7 inhibisyon), *Helianthemum ledifolium* (L.) Mill. (%28,4), *Majorana syriaca* (L.) Kostel. (%25,1) ve *Mentha spicata* L. (%22,5), %22-30 aralığında ksantin oksidaz inhibe edici aktivite göstermiştir.

Crowch ve Okello (2009), *Acacia nilotica* (Leguminosae) ve *Rhamnus prinoides* (Rhamnaceae) bitkilerinin asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon potansiyellerini incelemiştir. *A. nilotica* ve *R. prinoides*'in sonikasyonla elde edilmiş su ekstraktları, 0,1 mg/mL nihai deney konsantrasyonunda 5 dakikalık inkübasyondan sonra sırasıyla yaklaşık %56 ve %53 oranında belirgin bir AChE inhibisyonu göstermiştir. İnhibisyon kinetiği, her iki bitki ekstraktının da karışık tipte (sınırlı yarışmalı ve yarışmasız tipte) inhibitörler olduğunu göstermiştir. Çalışmada galantamin pozitif bir kontrol olarak kullanılmış ve çok güçlü bir karışık tip (yarışmalı, sınırlı yarışmalı) inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Galantaminin 0,0004 mg/mL'lik IC_{50} değerine karşılık, *A. nilotica* için 0,079 mg/mL ve *R. prinoides* için 0,201 mg/mL IC_{50} değerine sahip oldukları gösterilmiştir.

Nour vd. (2014), *Centella asiatica*, *Mimosa pudica*, *Crotalaria pumila* ve *Lantana camara* bitkilerinden elde edilen etanol ekstraktlarının AChE inhibisyon aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Test edilen tüm örnekler arasında, *M. pudica* yapraklarının etanol ekstraktı en yüksek AChE inhibisyon aktivitesini (IC_{50} = 0,0114 mg/mL) göstermiştir. Düşük IC_{50} değeri enzimin iyi inhibe edildiğini göstermektedir. *M. pudica* yapraklarının etanolik ekstraktları en düşük IC_{50} değerine sahipken, bu

bitkinin kökünden elde edilen ekstraktları için IC₅₀ değeri 0,0168 mg/mL olarak bulunmuştur.

Shahat vd. (2015), *Citrullus colocynthis*, *Emex spinosa*, *Rhazya stricta*, *Scrophularia hypericifolia* ve *Caylusea hexagyna* bitkilerinden metanol ile elde edilmiş ekstraktların AChE inhibisyon aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, *C. colocynthis* ve *E. spinosa*, 400 µg/mL'de AChE enzimini %83,54 ve %81,92 oranlarında inhibe etmiştir.

Gholamhoseinian vd. (2009), AChE enzimi üzerinde inhibe edici özelliklerini değerlendirmek için 100 farklı bitki ekstraktını incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Bergeris integrima*, *Levisticum officinale* ve *Rheum ribes* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar sırasıyla %80; %97,6 ve %72,4 inhibisyon yüzdeleriyle enzim aktivitesi üzerinde güçlü inhibisyon göstermiştir. Bunlara ek olarak, *Alhagi camelorum*, *Marrubium anisodon*, *Vaccinium arcto-staphilus*, *Peganum harmala*, *Rosa damascene*, *Valeriana hispida*, *Myrtus communis*, *Nepta saccharata* ve *Quercus infectoria* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar ise %20-50 arasında inhibitör etkisi göstermiştir. Çalışmada kullanılan diğer bitkiler ise %20'den daha az inhibe edici etki göstermiş veya enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkiye sahip olmamıştır. Bu ekstraktlardan en iyi etkiyi gösterenler için inhibisyon kinetiği Lineweaver-Burk grafik analizi ile incelenmiştir. Bu sonuçlara göre *L. officinale* ve *B. integrima* ekstraktları sınırlı yarışmalı bir şekilde AChE aktivitesini inhibe ederken, *R. ribes* ekstraktı enzimi yarışmalı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Kontrollü koşullar altında, enzim için Km ve Vmax enzim değerleri sırasıyla 9,4 mM ve 0,238 mM/dk olarak bulunmuştur. Enzim kinetiği çalışması sonrasında elde edilen sonuçlara göre, *L. officinale*, *B. integrima* ve *R. ribes* ekstraktlarına ait Vmax değerleri sırasıyla 0,192; 0,074 ve 0,238 mM/dk olduğu görülmüştür. *R. ribes* ekstraktının enzimin üzerindeki yarışmalı inhibisyonu sebebiyle, Km değeri 21,2 mM olarak bulunmuştur. %50 enzim inhibisyonu için gerekli konsantrasyon (IC₅₀ değeri), *L. officinale*, *B. integrima* ve *R. ribes* ekstraktları için sırasıyla 0,5; 0,9 ve 0,95 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan eserin için IC₅₀ değeri 0,8 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Wetwitayaklung vd. (2007), *Quisqualis indica* Linn bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstraktın AChE enzim inhibisyonunu ve inhibisyon kinetiğini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Q. indica* çiçeğinden metanol ile elde edilen ekstraktın inhibitör etkisi sergilediğini göstermiştir. Ekstraktın AChE enzimi inhibisyonu için IC₅₀ değeri doza bağlı olarak 0,77 µg/mL olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada enzimin Km değeri 0,034 mM, Vmax ise 0,017 µM/dak/µg protein olarak bulunmuşken; ekstrakt kullanıldığında Km değerinin önce azaldığı, ardından %60-88,9 arasında arttığı, Vmax değerinin ise %2,8-52,3 arasında azaldığı görülmüştür. Buna ek olarak, tahmini KI değeri 1,41 mM olarak gözlemlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği ve Dixon grafiği ekstraktın karışık ve kısmen sınırlı yarışmalı inhibisyon kombinasyonunu gösterdiğini ortaya koymuştur.

Niño vd. (2006), Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Rubiaceae ve Solanaceae familyasına ait bazı türlerden metanol kullanarak ekstrakt elde etmiş ve bunların AChE enzim inhibitör aktivitelerini taramıştır. Bu çalışmadaki en iyi inhibe edici aktiviteyi gösteren bitki ekstraktlarının, her ikisi de Solanaceae familyasına ait olan *Solanum leucocarpum* Dunal (IC₅₀ = 204,59 mg/L) ve *Witheringia coccoloboides* (Damm) (IC₅₀ = 220,68 mg/L) bitkilerine ait ekstraktlar olduğu gösterilmiştir.

3. MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1 Bitki Kökenli Bileşikler

Bu çalışmanın amacı, bitkilerden elde edilen bazı sekonder metabolitlerin çeşitli enzimler üzerindeki inhibitör aktivitesini belirlemektir. Bu amaçla, floridzin (Sigma-Aldrich P3449), naringenin (Sigma-Aldrich N5893), kuersetin (Sigma-Aldrich Q4951), umbelliferon (Sigma-Aldrich H24003), kurkumin (Sigma-Aldrich C1386) ve sinamik asit (Sigma-Aldrich 8,00235) kullanılmış ve bitki kökenli bileşiklerin hepsi Sigma Aldrich, Almanya'dan alınmıştır. Bunlardan ışığa hassas olanlar tüm çalışma boyunca alüminyum folyo ile sarılarak veya amber şişelerde tutularak kullanılmıştır.

3.2 α - Amilaz İnhibisyon Testi

3.2.1 Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1.1 Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler

Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler 5, 10 ve 15 mg/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda DMSO (dimetil sülfoksit) (Merck, Almanya) içerisinde çözülerek elde edilmiştir (Giancarlo vd., 2006).

3.2.1.2 Nişasta çözeltisi

Nişasta çözeltisi (%1 w/v) 1 g patates nişastasının (Merck, Almanya) 100 mL sodyum fosfat tamponu (pH=6,9) (Merck, Almanya) içinde 30 dakika karıştırılarak kaynatılmasıyla elde edilmiştir (Giancarlo vd., 2006).

3.2.1.3 α - Amilaz çözeltisi

α - Amilaz çözeltisi (50 U/mL), 0,0006 mM NaCl (Merck, Almanya) içeren 10 mL sodyum fosfat tamponu (pH = 6,9) (Merck, Almanya) ile hazırlanmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.2.1.4 Renk ayıracı

Çalışmada kullanılacak renk ayıracı, 0,1 g 3,5-dinitrosalisilik asit (Sigma-Aldrich, Almanya), 2,99 g sodyum potasyum tartarat (Merck, Almanya) ve 0,16 g sodyum hidroksidin (Merck, Almanya) 10 mL sodyum fosfat tamponu (pH = 6,9) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.2.1.5 Akarboz çözeltisi

Akarboz çözeltisi 5, 10, 15 mg/mL konsantrasyonlarda elde edilmek üzere, akarbozun (Sigma-Aldrich, Almanya) DMSO (Merck, Almanya) içinde çözülmesi ile hazırlanmış ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.2.2 α - Amilaz İnhibisyon Testi

Bitki kökenli bileşiklerin α - amilaz inhibisyon aktivitesi, daha önce Giancarlo vd. (2006) tarafından açıklandığı gibi belirlenmiştir. Bu yöntemle göre, her bitki kökenli bileşik çözeltisinden 50 μ L, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarına aktarılmıştır. Daha sonra bütün kuyucuklara 150 μ L nişasta çözeltisi ilave edilmiştir. Okumalarda kör olarak kullanılacak kuyucuklara 10 μ L sodyum fosfat tamponu (pH = 6,9) eklenirken, inhibisyon aktivitesinin test edileceği kuyucuklara tampon yerine 10 μ L enzim çözeltisi pipetle transfer edilmiştir. Anlatılan prosedür pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz için de tekrarlanmıştır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.1’de verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Hazırlanan plakalar önce 30 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bütün kuyucuklara 20 μ L, 2M sodyum hidroksit ve ardından 20 μ L renk ayıracı eklenmiştir. Daha sonra plakalar 100 °C su banyosunda 20 dakika tutulmuştur. İnkübasyondan sonra, her kuyucuğun absorbansı, bir plaka okuyucu (BIO-TEK) ile 540 nm’de okunmuştur.

Tablo 3.1 α - Amilaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	5 mg/mL		10 mg/mL		15 mg/mL	
A	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Akarboz 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
B	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Floridzin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
C	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Naringenin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
D	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kuersetin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
E	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Umbelliferon 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
F	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Kurkumin 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
G	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L enzim	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L Sinnamik asit 100 μ L nişasta 10 μ L enzim
H	50 μ L DMSO 100 μ L nişasta 10 μ L tampon	50 μ L DMSO 100 μ L nişasta 10 μ L enzim				

α -Amilazın inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$I_{\alpha\text{-amilaz}} \% = 100 \times (\Delta A_{\text{kontrol}} - \Delta A_{\text{örnek}}) / \Delta A_{\text{kontrol}} \quad (3.1)$$

$$\Delta A_{\text{kontrol}} = A_{\text{kontrol}} - A_{\text{kör}} \quad (3.2)$$

$$\Delta A_{\text{örnek}} = A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}} \quad (3.3)$$

Burada;

- A_{kontrol} kontrol bileşiği (akarboz) kuyucuğunun absorbansı,
- $A_{\text{örnek}}$ test edilen bitki kökenli bileşiğe ait kuyucuğunun absorbansı,
- $A_{\text{kör}}$ kök kuyucuğun absorbansı,
- $\Delta A_{\text{kontrol}}$ kontrol bileşiğinin (akarboz) net absorbansı,
- $\Delta A_{\text{örnek}}$ test edilen bitki kökenli bileşiğin net absorbansıdır.

3.2.3 Maltoz Standart Eğrisi

Yapılan çalışmada reaksiyon sonucu ortaya çıkan maltoz konsantrasyonunu belirlemek için bir maltoz standart (kalibrasyon) eğrisi çizilmiştir. Maltoz standart eğrisinin çizilmesinde kullanılan maltoz standartları Tablo 3.2’de verilen prosedüre göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.2 Maltoz standart eğrisi için maltoz standartlarının hazırlanması

		Standart						
	Kör	1	2	3	4	5	6	7
% 0,2 (w/v) maltoz standartı	-	10 μ L	20 μ L	40 μ L	60 μ L	80 μ L	100 μ L	200 μ L
Su (ultra pure)	200 μ L	190 μ L	180 μ L	160 μ L	140 μ L	120 μ L	100 μ L	-
Renk ayırıcı	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L

Maltoz standart çözeltileri hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonda maltoz çözeltisi içeren kuyucuklara 20 μ L, 2M sodyum hidroksit ve 20 μ L renk ayırıcı eklendikten sonra 20 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Plaka, kaynar sudan

çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve ardından bütün maltoz standart kuyucuklarının absorbansı 540 nm’de okunmuştur.

3.3 Ksantin Oksidaz İnhibisyon Testi

3.3.1 Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1.1 Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler

Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler 5, 10 ve 15 mg/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda DMSO (dimetil sülfoksit) (Merck, Almanya) içerisinde çözülerek elde edilmiştir (Giancarlo vd., 2006).

3.3.1.2 Allopurinol çözeltisi

Allopurinol çözeltisi 5, 10, 15 mg/mL konsantrasyonlarda elde edilmek üzere, allopurinolün (Sigma-Aldrich, Almanya) DMSO (Merck, Almanya) içinde çözülmesi ile hazırlanmış ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.3.1.3 Ksantin oksidaz çözeltisi

Ksantin oksidaz çözeltisi 0,01 U/mL’lik olacak şekilde ksantin oksidazın (Sigma-Aldrich, Almanya) ultra saf su (25 °C’de $\geq 18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ direnç) (Merck, Almanya) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır (Noro vd., 1983).

3.3.1.4 Substrat çözeltisi

Substrat çözeltisi, konsantrasyon 150 μM olacak şekilde 0,0023 g ksantin (Sigma-Aldrich, Almanya), 100 mL fosfat tamponunda (pH = 7,5) (Merck, Almanya) çözülerek hazırlanmıştır (Noro vd., 1983).

3.3.1.5 Fosfat tamponu çözeltisi

Fosfat tamponu çözeltisi (70 mM, pH = 7,5), 0,1 M fosfat tamponunun (pH = 7,5) (Merck, Almanya) seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Bunun için 45 mL fosfat

tamponuna (0,1 M, pH = 7,5) 105 mL saf su eklenmiş ve çözeltinin pH'ı asit ve baz kullanılarak 7,5'e ayarlanmıştır.

3.3.1.6 Durdurma çözeltisi

1N durdurma çözeltisi hazırlanırken önce bir mezüre 300 mL saf su konduktan sonra, üzerine 85,9 mL HCL (Merck, Almanya) eklenmiş, daha sonra hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.2 Ksantin Oksidaz İnhibisyon Testi

Ksantin oksidaz (XO) inhibisyon testi, Noro vd. (1983) tarafından bildirilen prosedüre göre 96 kuyucuklu plakalarda, aerobik koşullar altında spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Kuyucuklara test edilecek bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan allopurinolden 50 µL konulduktan sonra üzerine, 35 µL 70 mM fosfat tamponu (pH = 7,5) ve 30 µL enzim çözeltisinden (70 mM fosfat tamponu içinde 0,01 U/mL, pH = 7,5) eklenmiştir. 25 °C'de 15 dakika süreyle ön inkübasyondan sonra, reaksiyon 60 µL substrat çözeltisi (150 µM ksantin) ilavesiyle başlatılmıştır. Kör kuyucuklarda enzim yerine ultra saf su kullanılmıştır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.3 'de verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. Reaksiyon süresince plaka 30 dakika 25 °C'de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında reaksiyon, 25 µL 1 N HCl eklenerek durdurulmuş ve kuyucukların absorbensları 290 nm'de ölçülmüştür.

XO inhibitör aktivitesi, XO inhibisyon yüzdesi olarak ifade edilip,

$$(1 - B / A) \times 100 \quad (3.4)$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada;

- A, test edilen çözelti olmadan alınan absorbens ve
- B, test edilen çözelti kullanıldığında alınan absorbensdır.

Tablo 3.3 Ksantin oksidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	(5 mg/mL)		(10 mg/mL)		(15 mg/mL)	
A	50 µL Allopurinol	50 µL Allopurinol	50 µL Allopurinol	50 µL Allopurinol	50 µL Allopurinol	50 µL Allopurinol
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
B	50 µL Floridzin	50 µL Floridzin	50 µL Floridzin	50 µL Floridzin	50 µL Floridzin	50 µL Floridzin
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
C	50 µL Naringenin	50 µL Naringenin	50 µL Naringenin	50 µL Naringenin	50 µL Naringenin	50 µL Naringenin
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
D	50 µL Kuersetin	50 µL Kuersetin	50 µL Kuersetin	50 µL Kuersetin	50 µL Kuersetin	50 µL Kuersetin
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
E	50 µL Umbelliferon	50 µL Umbelliferon	50 µL Umbelliferon	50 µL Umbelliferon	50 µL Umbelliferon	50 µL Umbelliferon
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
F	50 µL Sinnamik asit	50 µL Sinnamik asit	50 µL Sinnamik asit	50 µL Sinnamik asit	50 µL Sinnamik asit	50 µL Sinnamik asit
	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon
	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat	60 µL substrat
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim	30 µL ultra saf su	30 µL enzim
G	35 µL fosfat tampon	35 µL fosfat tampon				
	60 µL substrat	60 µL substrat				
	30 µL ultra saf su	30 µL enzim				

3.3.3 Ksantin Standart Eğrisi

Yapılan çalışmada reaksiyon sonucu kalan ksantin konsantrasyonunu belirlemek için bir ksantin standart (kalibrasyon) eğrisi çizilmiştir. Ksantin standart eğrisinin çizilmesinde kullanılan ksantin standartları Tablo 3.4 'de verilen prosedüre göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.4 Ksantin standart eğrisi için ksantin standartlarının hazırlanması

		Standart						
	Kör	1	2	3	4	5	6	7
Fosfat	-	20 µL	40 µL	60 µL	80 µL	100 µL	120 µL	200 µL
tamponu								
Ksantin	200 µL	180 µL	160 µL	140 µL	120 µL	100 µL	80 µL	-

Ksantin standart çözeltileri hazırlandıktan sonra, kuyucuklarında farklı konsantrasyonda ksantin çözeltisi içeren plaka, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bütün standartların absorbansı 290 nm'de ölçülmüştür.

3.4 Asetilkolinesteraz İnhibisyon Testi

3.4.1 Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1.1 Tampon çözeltisi

Asetilkolinesteraz testi için Tampon A, Tampon B ve Tampon C olmak üzere üç ayrı tampon hazırlanmıştır (Ingkaninan vd., 2003).

Tampon A, 50mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Almanya) pH = 8,0 tamponu olarak hazırlanmıştır.

Tampon B, 0,1 g sığır serum albümini (BSA) (Sigma-Aldrich, Almanya) 10 mL 50 mM Tris-HCl (pH = 8,0) (Sigma-Aldrich, Almanya) içinde çözülerek (%0 - 1 arası BSA içermesi için) hazırlanmıştır.

Tampon C, 20 mL 50mM Tris-HCl (pH = 8,0) tamponu içinde 0,1168 gr NaCl (Merck, Almanya) ve 0,8132 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck, Almanya) çözülerek hazırlanmıştır.

3.4.1.2 Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler

Bitki kökenli bileşiklere ait çözeltiler 5, 10 ve 15 mg/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda Tampon A içerisinde çözülerek elde edilmiştir (Ingkaninan vd., 2003).

3.4.1.3 Asetiltiyokolin iyot (ATCI) çözeltisi

15mM Asetiltiyokolin iyot (ATCI) (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisi, 0,04337 g ATCI, 10 mL distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır (Ingkaninan vd., 2003).

3.4.1.4 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi

3mM 5,5'- ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisi, 0,01189 g DTNB 10 mL Tampon C'de çözülerek hazırlanmıştır (Ingkaninan vd., 2003).

3.4.1.5 Asetilkolinesteraz enzim çözeltisi

Asetilkolinesteraz (AChE) (Sigma Aldrich, Almanya), 10 mL distile su içinde çözülmüş ve daha sonra enzim çözeltisi 0,25 U/mL'ye seyreltilerek kullanılmıştır (Ingkaninan vd., 2003).

3.4.1.6 Galantamin çözeltisi

Galantamin çözeltisi 5, 10, 15 mg/mL konsantrasyonlarda elde edilmek üzere, galantaminin (Sigma-Aldrich, Almanya) DMSO (Merck, Almanya) içinde çözülmesi ile hazırlanmış ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.4.2 Asetilkolinesteraz İnhibisyon Testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon testi Ingkaninan vd. (2003) tarafından kullanıldığı gibi Ellman yöntemiyle yapılmıştır. Reaksiyon sırasında enzim, substrat olan ATCI'yı hidrolize ettikten sonra tiyokolini oluşturur ve tiyokolin Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB ile reaksiyona girer ve sonuç olarak 2-nitrobenzoat-5-makeptotiyokolin ve 5-tio-2-nitrobenzoat oluşur. Bu değişim 405 nm'de spektrofotometre ile tespit edilir. Bu sebeple AChE inhibisyon testinde 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına distile suda çözünmüş 15 mM ATCI'dan 25 µL, Tampon C içinde çözünmüş 3 mM DTNB'den 125 µL, Tampon B'den 50 µL ve Tampon A'da çözünmüş (5, 10, 15 mg/mL konsantrasyonlardaki) bitki kökenli bileşiklerden veya pozitif kontrolden 25 µL transfer edilmiştir. Absorbans, her 45 saniyede bir olmak üzere 405 nm'de üç kez okunmuştur. 25 µL'lik 0,25 U/mL enzim eklenmeden önce yapılan okuma kaydedilmiş ve enzim eklendikten sonra da üç kez okuma yapılmıştır. Kör kuyucuklarda enzim yerine Tampon A kullanılmıştır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.5'te verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.4.3 Asetiltiyokolinesteraz İnhibisyon Kinetiği Testi

AChE inhibisyon kinetiği testinde kullanılmak üzere Lineweaver-Burk grafiklerini çizebilmek için (Palmer, 1995), inhibitör olarak kullanılan bitki kökenli bileşiklerin asetilkolinesteraz inhibisyon testi sonucu tespit edilen konsantrasyonların (5 - 15 mg/mL) bir seri substrat konsantrasyonuna (6 m; 3 mM; 1,5 mM; 0,75 mM ve 0,375 mM) karşı etkileri denenmiştir. Her inhibitör konsantrasyonu için, V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.6 ve Tablo 3.7'de verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.5 α - Glukozidaz İnhibisyon Testi

3.5.1 Analizde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1.1 p-Nitrofenil- α -d-glikopiranozid (PNPG) çözeltisi

5 mM p-Nitrofenil- α -d-glukopiranosid (PNPG) (Sigma-Aldrich, Almanya) hazırlanırken, 0,015 g PNPG 10 mL 0,1 M fosfat tamponunda (Merck, Almanya) çözülerek hazırlanmıştır.

3.5.1.2 α - Glukozidaz çözeltisi

α - glukosidaz çözeltisi (1 U/mL) olacak şekilde 5 μ L α - glukozidazın (Sigma-Aldrich, Almanya), 125 μ L fosfat tamponunda (0,1 M, pH = 6,9) (Merck, Almanya) çözülmesiyle hazırlanmıştır (McCue vd., 2005).

3.5.1.3 Akarboz çözeltisi

Akarboz çözeltisi 5, 10, 15 mg/mL konsantrasyonlarda elde edilmek üzere, alloprunolün (Sigma-Aldrich, Almanya) DMSO (Merck, Almanya) içinde çözülmesi ile hazırlanmış ve çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Giancarlo vd., 2006).

3.5.1.4 Sodyum karbonat çözeltisi

0,2 M sodyum karbonat çözeltisi, 0,211 g sodyum karbonat (Merck, Almanya) 10 mL distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır (McCue vd., 2005).

Tablo 3.5 Asetilkolinesteraz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	(5 mg/mL)		(10 mg/mL)		(15 mg/mL)	
A	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
B	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
C	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
D	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
E	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
F	25 µL Sinnamik asit	25 µL Sinnamik asit	25 µL Sinnamik asit	25 µL Sinnamik asit	25 µL Sinnamik asit	25 µL Sinnamik asit
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
G	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI				
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB				
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B				
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim				

Tablo 3.6 Asetilkolinesteraz inhibisyon kinetiği

[illegible]

Tablo 3.7 Asetilkolinesteraz inhibisyon kinetiği testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4
	3 mM Substrat		6 mM Substrat	
A	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin	25 µL Galantamin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3 mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
B	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin	25 µL Floridzin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
C	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin	25 µL Naringenin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
D	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin	25 µL Kuersetin
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
E	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon	25 µL Umbelliferon
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
F	25 µL Sinamik asit	25 µL Sinamik asit	25 µL Sinamik asit	25 µL Sinamik asit
	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim
G	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI	25 µL 15mM ATCI
	125 µL 3mM DTNB	125 µL 3mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB	125 µL 6 mM DTNB
	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B	50 µL Tampon B
	25 µL Tampon A	25 µL Enzim	25 µL Tampon A	25 µL Enzim

3.5.2 α-Glukozidaz İnhibisyon Testi

α-glukozidaz inhibisyon testinde McCue vd. (2005) tarafından daha önce belirtilmiş olan yöntem küçük değişikliklerle kullanılmıştır. Bu testte 96 kuyucuklu mikropolanın kuyucuklarına 20 µL çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 15 mg/mL) bitki kökenli bileşiklerden veya pozitif kontrolden aktarıldıktan sonra, üzerine 130 µL enzim çözeltisi (1 U/mL) (125 µL fosfat tamponunda (0,1 M, pH = 6,9), çözölmüş 5 µL α-glukozidaz) eklendikten sonra plakalar 37 °C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklara substrat olarak kullanılan PNPG çözeltisinden 20 µL aktarılmış ve plakalar 37 °C’de 15 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon her kuyucuğa 80 µL 0,2 M NaCO₃ çözeltisi eklenerek durdurulmuş ve kuyucukların absorbansları 405 nm’de okunmuştur. Kör kuyucuklarda enzim yerine fosfat tamponu kullanılmıştır. Sonuç olarak,

96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.8’de verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrolün inhibitör etkileri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibitör aktivitesi} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (3.5)$$

Burada;

- A_{kontrol} kontrol bileşiği (akarboz) kuyucuğunun absorbansı ve
- $A_{\text{örnek}}$ test edilen bitki kökenli bileşiğe ait kuyucuğunun absorbansıdır.

3.6 α - Glukozidaz İnhibisyon Kinetiği Testi

α - Glukozidaz inhibisyon kinetiği testinde kullanılmak üzere Lineweaver-Burk grafiklerini çizebilmek için (Kim vd., 2005), inhibitör olarak kullanılan bitki kökenli bileşiklerin asetilkolinesteraz inhibisyon testi sonucu tespit edilen konsantrasyonların (5 - 15 mg/mL) bir seri substrat konsantrasyonuna (0,344 mM; 0,6875 mM; 1,375 mM; 2,75 mM; 5,50 mM ve 11 mM) karşı etkileri denenmiştir. Her inhibitör konsantrasyonu için, V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, 96 kuyucuklu bir plakanın kuyucuklarının içeriği Tablo 3.9 ve Tablo 3.10’da verildiği gibidir. Yapılan tüm denemeler üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür.

3.7 İstatistiksel Analiz

Yapılan bütün testler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmış olup, tekrarlar arasındaki farkın istatistiksel değerlendirilmesinde R Studio v4.0.2 programı kullanılmıştır. Verilerin gruplar arasındaki dağılımı ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. p -değeri 0,05’den küçük olduğunda gruplar arasındaki fark anlamlı kabul edilmiştir (Core R Team, 2016).

Tablo 3.8 α- Glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	5 mg/mL		10 mg/mL		15 mg/mL	
	20 µL Akarboz	20 µL Akarboz	20 µL Akarboz	20 µL Akarboz	20 µL Akarboz	20 µL Akarboz
A	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tampon	130µLenzim	130 µL fosfat tampon	130µLenzim
	20 µL Floridzin	50 µL Floridzin	20 µL Floridzin	50 µL Floridzin	20 µL Floridzin	50 µL Floridzin
B	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130µL enzim
	20 µL Naringenin	50 µL Naringenin	20 µL Naringenin	50 µL Naringenin	20 µL Naringenin	50 µL Naringenin
C	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim
	20 µL Kuersetin	20 µL Kuersetin	20 µL Kuersetin	20 µL Kuersetin	20 µL Kuersetin	20 µL Kuersetin
D	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim
	20 µL Umbelliferon	20 µL Umbelliferon	20 µL Umbelliferon	20 µL Umbelliferon	20 µL Umbelliferon	20 µL Umbelliferon
E	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim
	20 µL Sinamik asit	20 µL Sinamik asit	20 µL Sinamik asit	20 µL Sinamik asit	20 µL Sinamik asit	20 µL Sinamik asit
F	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim
	50 µL DMSO	50 µL DMSO				
G	20 µL 11mM PNPG	20 µL 11mM PNPG				
	130 µL fosfat tamponu	130 µL enzim				

Tablo 3.9 α - Glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	0,344 mM Substrat		0,6875 mM Substrat		1,375 mM Substrat	
A	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)	20 μ L Akarboz (10 mg/mL)
	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG
	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu
	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL)
B	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG
	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu
	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL)
	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG
C	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu
	50 μ L DMSO	50 μ L DMSO	50 μ L DMSO	50 μ L DMSO	50 μ L DMSO	50 μ L DMSO
	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,344 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 0,6875 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG	20 μ L 1,375 mM PNPG
	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu	130 μ L fosfat tamponu

Tablo 3.10 α - glukozidaz inhibisyon testi için örnek bir plaka yapısı

	1	2	3	4	5	6
	2,75 mM Substrat		5,5 mM Substrat		11 mM Substrat	
A	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L fosfat tampon	20 μ L Akarboz (10 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L enzim
B	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Kuersetin (15 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L enzim
C	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L enzim	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	20 μ L Umbelliferon (15 mg/mL) 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L enzim
D	50 μ L DMSO 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	50 μ L DMSO 20 μ L 2,75 mM PNPG 130 μ L enzim	50 μ L DMSO 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	50 μ L DMSO 20 μ L 5,5 mM PNPG 130 μ L enzim	50 μ L DMSO 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L fosfat tamponu	50 μ L DMSO 20 μ L 11mM PNPG 130 μ L enzim

4. SONUÇLAR

4.1 α - Amilaz İnhibisyon Analiz Sonuçları

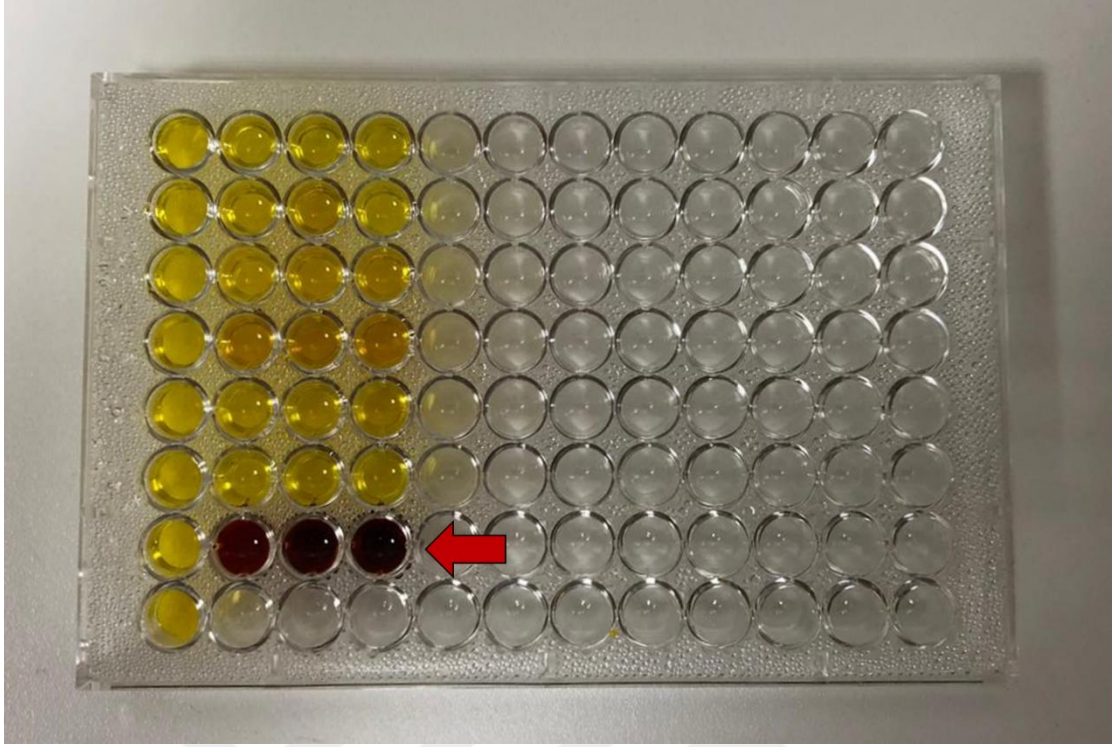
α - Amilaz inhibisyon testinde, floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, kurkumin ve sinnamik asidin üç farklı konsantrasyonunun (5, 10 ve 15 mg/mL) inhibitör aktiviteleri test edilmiş ve bitki kökenli bu bileşiklerin aktiviteleri, ticari olarak kullanılan bir α - amilaz inhibitörü olan akarbozun üç farklı konsantrasyonu (5, 10 ve 15 mg/mL) ile karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL konsantrasyonlarının sonuçları sırasıyla Tablo 4.1., Tablo 4.2. ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.1 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları

	Maltoz Konsantrasyonu (mg/mL)	İnhibisyon (%)
Floridzin	3,243	-226,14
Naringenin	1,233	-17,72
Kuersetin	0,000	100
Umbelliferon	1,471	-42,59
Sinamik asit	2,014	-98,92
Kurkumin	*	*
Akarboz	0,000	100
İnhibitörsüz	1,062	-

* Hesaplanamadı

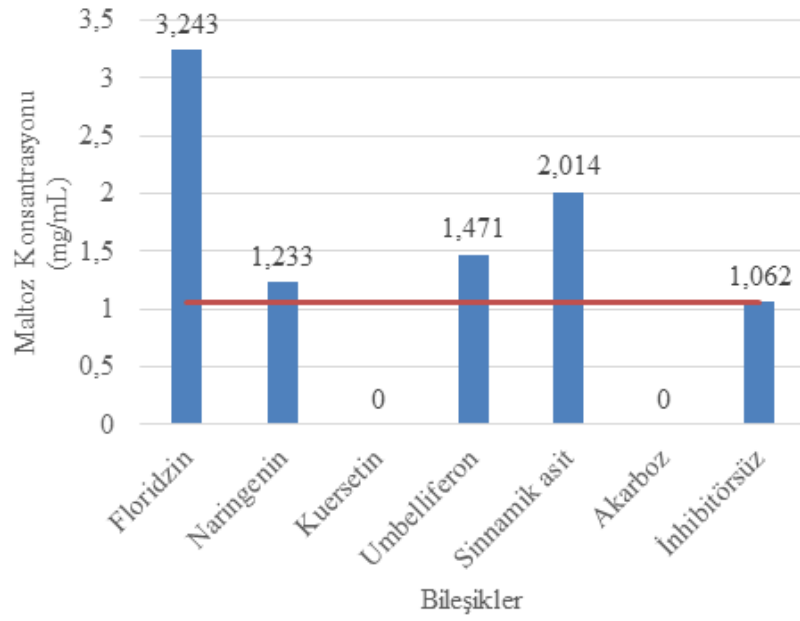
Tablo 4.1 plaka okuyucunun kurkumin haznelerini okuyamadığını göstermektedir. Kurkumin konsantrasyonunda seyreltme yapılarak denenmesine rağmen okumada problemler olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, kurkumin, renk reaktifi ve sodyum hidroksit arasında bir reaksiyonun meydana gelmiş olması olabilir. Çünkü haznelere sodyum hidroksit ilavesini takiben kurkumin içeren haznelerde yoğun bir renk elde edilmiştir (Fotoğraf 4.1). Benzer durum, diğer testler için yapılan ön denemelerde de ortaya çıktığı için, kurkumin yapılacak bütün çalışmalardan çıkarılmıştır.



Fotoğraf 4.1 Kurkumin içeren haznelerde yoğun rengi gösteren fotoğraf

Şekil 4.1’de enzimin inhibe edilmediği kuyucuktaki maltoz konsantrasyonu kırmızı bir yatay çizgi ile gösterilmiştir. Bu seviyenin üzerindeki ve altındaki maltoz konsantrasyonları açıkça gösterilmiştir. Bu çizgiye yakın konsantrasyonlar, bitki kökenli bileşiğin enzimi etkilemediğini ve dolayısıyla enzimin nişastayı hidrolize ettiğini ve hiçbir inhibitörün kullanılmadığı reaksiyonda olduğu gibi maltoz oluşturduğunu göstermektedir. Bu çizginin altındaki konsantrasyon, bitki kökenli bileşiğin enzimi inhibe ettiğini gösterir ve çizginin üzerindeki konsantrasyon ise bitki kökenli bileşiğin enzimi aktive ettiğini göstermektedir.

Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de 5 mg/mL naringenin enzimi çok fazla etkilemediği ve sonuç olarak inhibitörsüz enzim tarafından üretilen maltoza çok yakın bir konsantrasyonda nişastadan maltoz oluşturulduğunu açıkça gösterilmektedir.



Şekil 4.1 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu

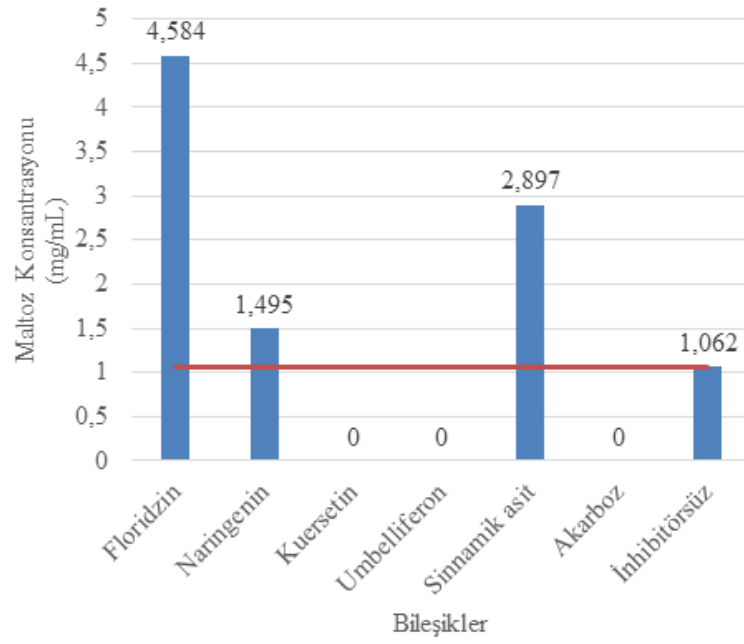
Öte yandan 5 mg/mL umbelliferon, sınnamik asit ve floridzin aktivatör işlevi görmüş ve enzimin inhibitör içermeyen enzime göre daha fazla maltoz üretmesine neden olmuştur.

Ek olarak, 5 mg/mL kuersetin, enzimi akarboz (5 mg/mL) kadar inhibe etmiştir.

Tablo 4.2 Bileşiklerin 10 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları

	Maltoz Konsantrasyonu (mg/mL)	İnhibisyon (%)
Floridzin	4,584	-365,19
Naringenin	1,495	-45,25
Kuersetin	0,000	100
Umbelliferon	0,000	100
Sınnamik asit	2,897	-190,32
Kurkumin	*	*
Akarboz	0,000	100
İnhibitörsüz	1,062	-

* Hesaplanamadı



Şekil 4.2 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu

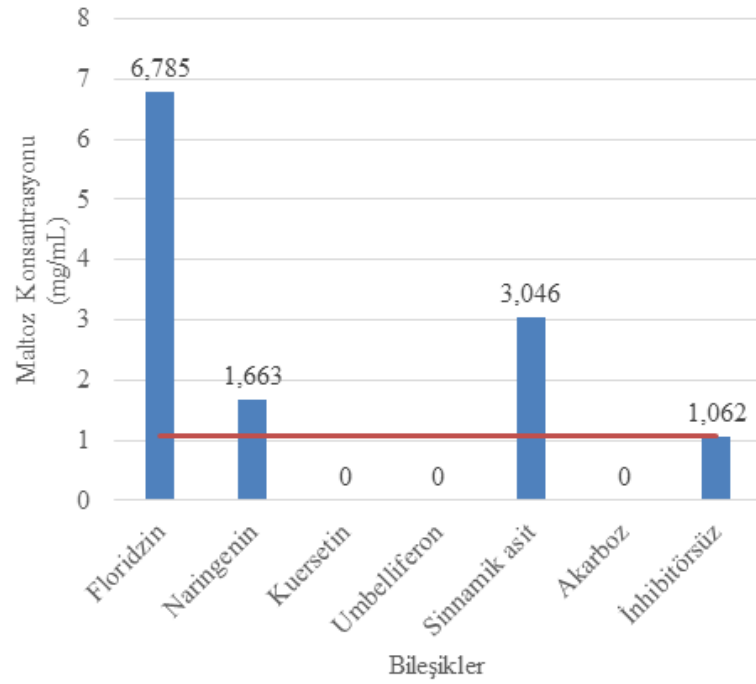
Tablo 4.2 ve Şekil 4.2 'de 10 mg/mL floridzin, naringenin ve sınnamik asit aktivatör işlevi görerek enzimin inhibitör içermeyen enzimden daha fazla maltoz üretmesine neden olmuştur.

Ek olarak, 10 mg/mL kuersetin ve umbelliferon, enzimi akarboz (10 mg/mL) kadar inhibe etmiştir.

Tablo 4.3 Bileşiklerin 15 mg/mL konsantrasyonu için α - amilaz inhibisyon analiz sonuçları

	Maltoz Konsantrasyonu (mg/mL)	İnhibisyon (%)
Floridzin	6,785	-593,35
Naringenin	1,663	-62,34
Kuersetin	0,000	100
Umbelliferon	0,000	100
Sınnamik asit	3,046	-205,70
Kurkumin	*	*
Akarboz	0,000	100
İnhibitörsüz	1,062	-

* Hesaplanamadı

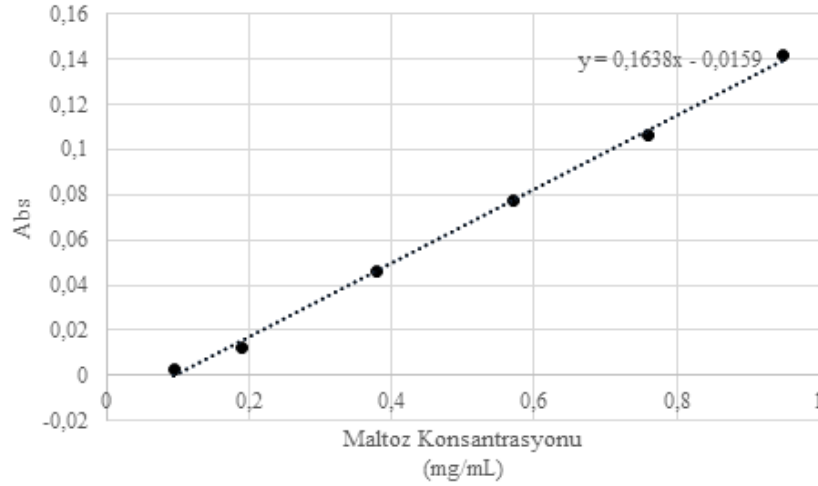


Şekil 4.3 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarboz içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonu

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te 15 mg/mL floridzin, naringenin ve sinamik asit aktivatör işlevi görerek enzimin inhibitör içermeyen enzimden daha fazla maltoz üretmesine neden olmuştur.

Buna ek olarak, 15 mg/mL kuersetin ve umbelliferon, enzimi akarboz (15 mg/mL) kadar inhibe etmiştir.

Çalışmadan elde edilen veriler kullanılarak elde edilen maltoz kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4'te verilmiştir. Çizginin denklemi, bitki kökenli bileşikleri içeren kuyucuklardaki maltoz konsantrasyonunu hesaplamak için kullanılmıştır.



Şekil 4.4 Maltoz kalibrasyon eğrisi

Yapılan istatistiksel analizin detayları Ekler bölümünde verilmiş olup, sonuçlar üç tekerrür çalışmanın aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p = 0,6716$).

4.2 Ksantin Oksidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları

Ksantin oksidaz inhibisyon testinde, floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon ve sinnamik asidin üç farklı konsantrasyonunun (5, 10 ve 15 mg/mL) inhibitör aktiviteleri test edilmiş ve bitki kökenli bu bileşiklerin aktiviteleri, ticari olarak kullanılan bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinolün üç farklı konsantrasyonu (5, 10 ve 15 mg/mL) ile karşılaştırılmıştır.

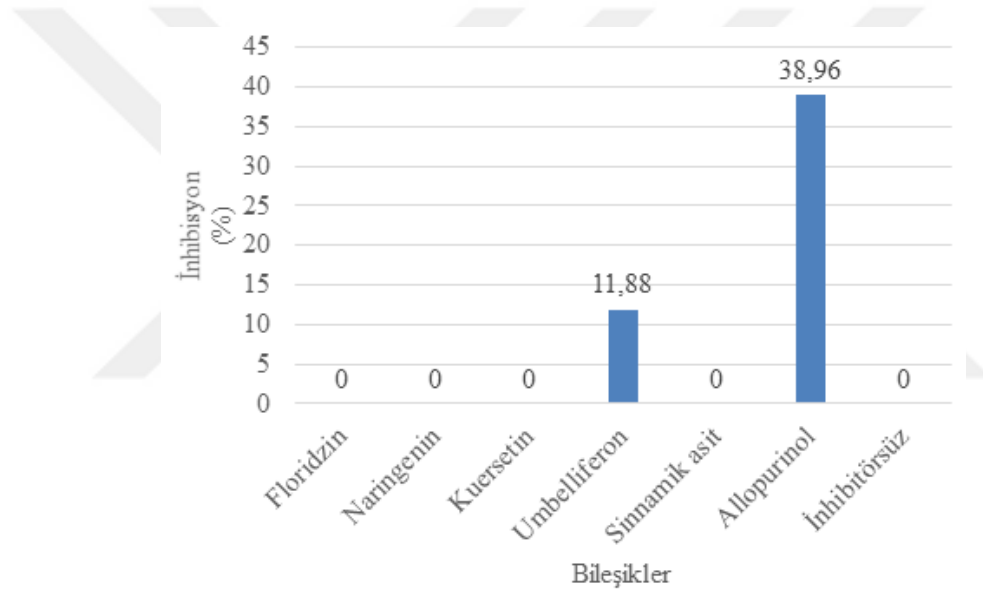
Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan allopurinolün 5 mg/mL, konsantrasyonlarının ksantin oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.4 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları

	İnhibisyon (%)
Floridzin	0
Naringenin	0
Kuersetin	0
Umbelliferon	11,88
Sinamik asit	0
Allopirunol	38,96
İnhibitörsüz	0

Tablo 4.4 ve Şekil 4.5 bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan allopurinolün ksantin oksidaz enzimi üzerine inhibisyon etkilerini % inhibisyon olarak göstermektedir.

Tablo 4.4 ve Şekil 4.5'te verilen sonuçlara göre allopurinol 5 mg/mL konsantrasyonda ksantin oksidaz enziminde %38,96'lık bir inhibisyona sebep olurken, 5 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden sadece umbelliferonun ksantin oksidaz üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin %11,88 gibi bir değerle pozitif kontrol olan allopurinolden daha düşük bir inhibisyon yüzdesiyle ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



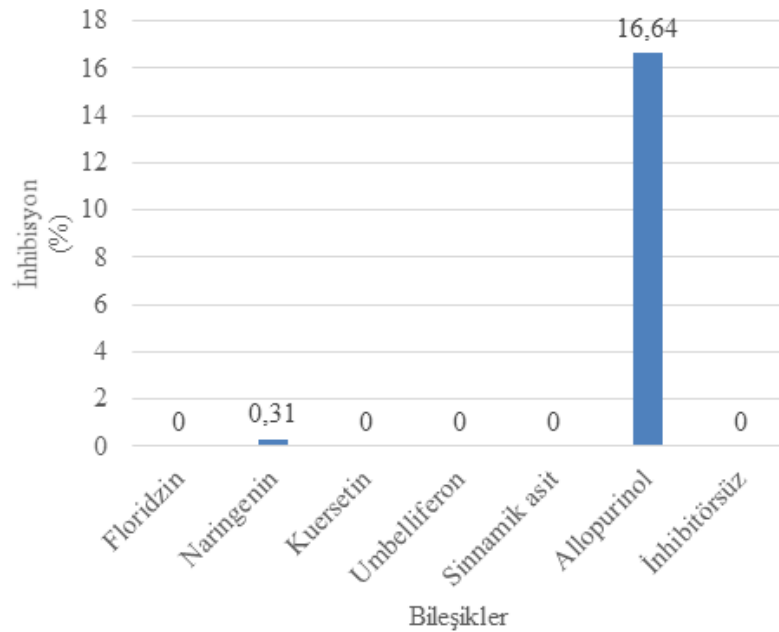
Şekil 4.5 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan allopurinolün 10 mg/mL, konsantrasyonlarının ksantin oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5 Bileşiklerin 10 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları

	İnhibisyon (%)
Floridzin	0
Naringenin	0,31
Kuersetin	0
Umbelliferon	0
Sinamik asit	0
Allopirunol	16,64
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.5 ve Şekil 4.6’da verilen sonuçlara göre allopirunol 10 mg/mL konsantrasyonda ksantin oksidaz enziminde %16,64’lük bir inhibisyona sebep olurken, 10 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden sadece naringenin ksantin oksidaz üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin %0,31 gibi bir değerle pozitif kontrol olan allopirunolden oldukça düşük bir inhibisyon yüzdesiyle ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.6 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopirunolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

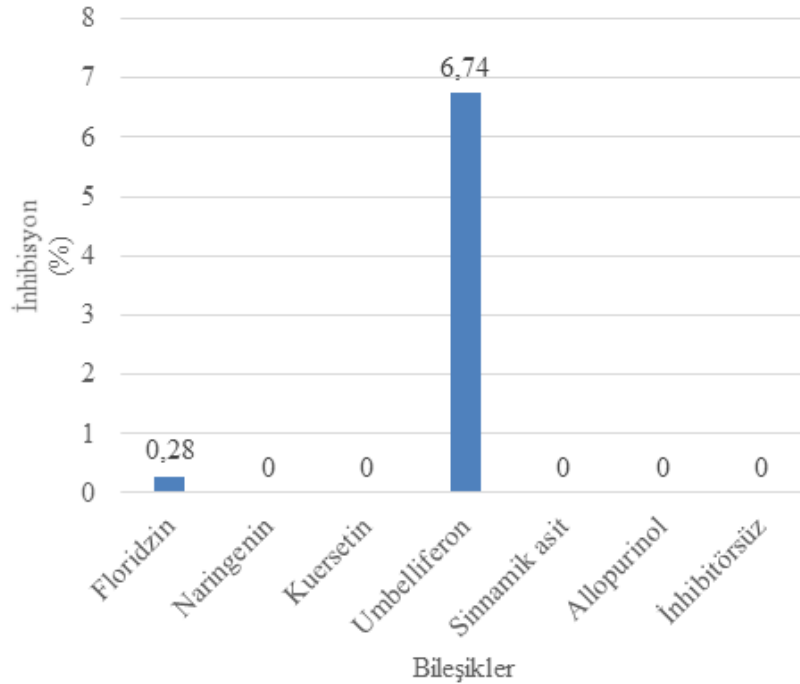
Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan allopirunolün 15 mg/mL, konsantrasyonlarının ksantin oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.6 Bileşiklerin 15 mg/mL konsantrasyonu için ksantin oksidaz inhibisyon yüzde sonuçları

	Inhibisyon (%)
Floridzin	0,28
Naringenin	0
Kuersetin	*
Umbelliferon	6,74
Sinamik asit	0
Allopirunol	0
İnhibitörsüz	-

* Ölçüm yapılamadı

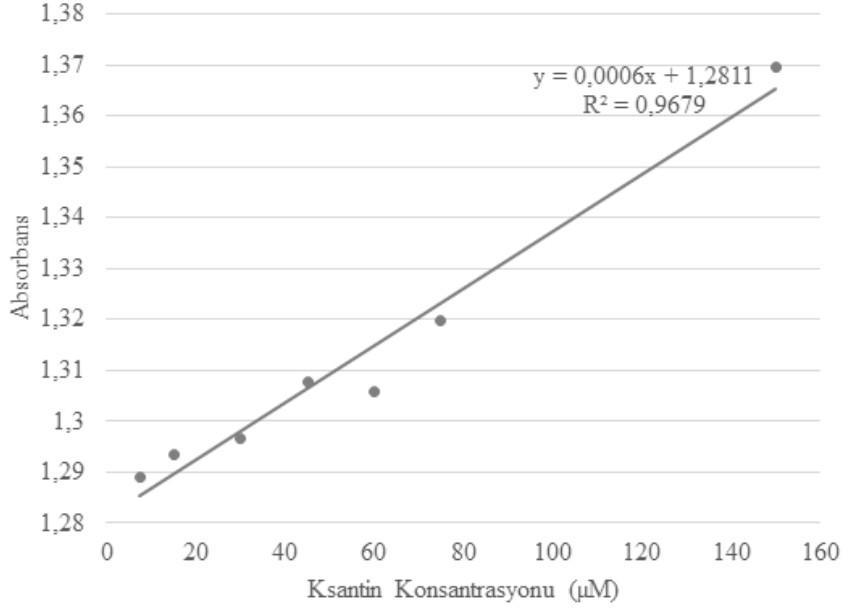
Tablo 4.6 ve Şekil 4.7’de verilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılmış olan allopurinol 15 mg/mL konsantrasyonda ksantin oksidaz enziminde herhangi bir inhibisyona sebep olmazken, 15 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden umbelliferon ve floridzinin ksantin oksidaz üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin sırasıyla %6,74 ve %0,28 gibi bir inhibisyon yüzdesiyle ksantin oksidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.7 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Çalışmadan elde edilen veriler kullanılarak çizilen ksantin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8’de verilmiştir. Elde edilen doğrunun denklemi, bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol

olarak kullanılmış allopurinolün ksantin oksidaz enzimi inhibisyon yüzdelerini hesaplamak için kullanılmıştır.



Şekil 4.8 Ksantin kalibrasyon eğrisi

Yapılan istatistiksel analiz, üç tekrarlı çalışmanın aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p = 0,9918$).

4.3 Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibisyon ve İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları

4.3.1 AChE İnhibisyon Analiz Sonuçları

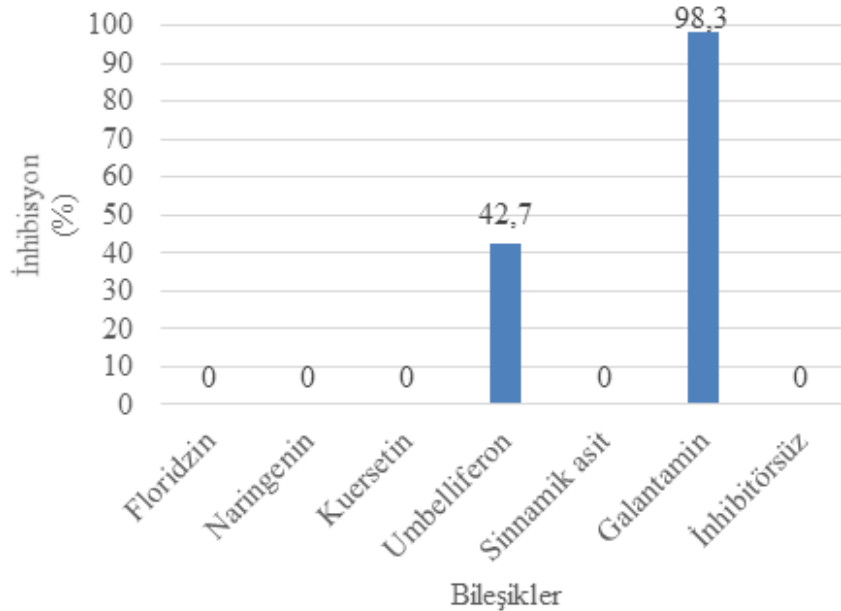
AChE inhibisyon testinde, floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon ve sinnamik asidin üç farklı konsantrasyonunun (5, 10 ve 15 mg/mL) inhibitör aktiviteleri test edilmiş ve bitki kökenli bu bileşiklerin aktiviteleri, ticari olarak kullanılan bir AChE inhibitörü olan galantaminin üç farklı konsantrasyonu (5, 10 ve 15 mg/mL) ile karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL konsantrasyonlarının sonuçları sırasıyla Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.7 5 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçlar

	İnhibisyon (%)
Floridzin	0
Naringenin	0
Kuersetin	0
Umbelliferon	42,70
Sinamik asit	0
Galantamin	98,30
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.7 ve Şekil 4.9 bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantiminin asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerini % inhibisyon olarak göstermektedir.

Tablo 4.7 ve Şekil 4.9’da verilen sonuçlara göre galantiminin 5 mg/mL konsantrasyonda asetilkolinesteraz enziminde %98,3’lük bir inhibisyona sebep olurken, 5 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden sadece umbelliferonun asetilkolinesteraz üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin %42,7 gibi bir değerle pozitif kontrol olan allopurinolden daha düşük bir inhibisyon yüzdesiyle asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



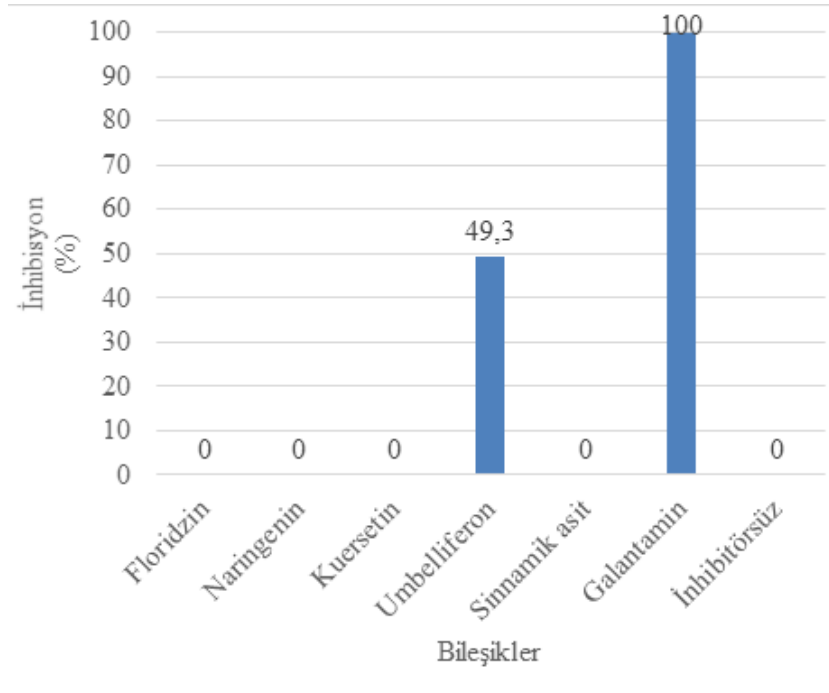
Şekil 4.9 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin 10 mg/mL, konsantrasyonlarının asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.8 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.8 10 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçları

	Inhibisyon (%)
Floridzin	0
Naringenin	0
Kuersetin	0
Umbelliferon	49,30
Sinamik asit	0
Galantamin	100,00
Inhibitörsüz	-

Tablo 4.8 ve Şekil 4.10'da verilen sonuçlara göre galantamin 10 mg/mL konsantrasyonda asetilkolinesteraz enziminde %100'lük bir inhibisyona sebep olurken, 10 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden sadece umbelliferonun asetilkolinesteraz üzerinde etkisi olduğu ve bu etkinin %49,3 gibi bir değerle pozitif kontrol olan galantaminin yaklaşık yarısı seviyesinde asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



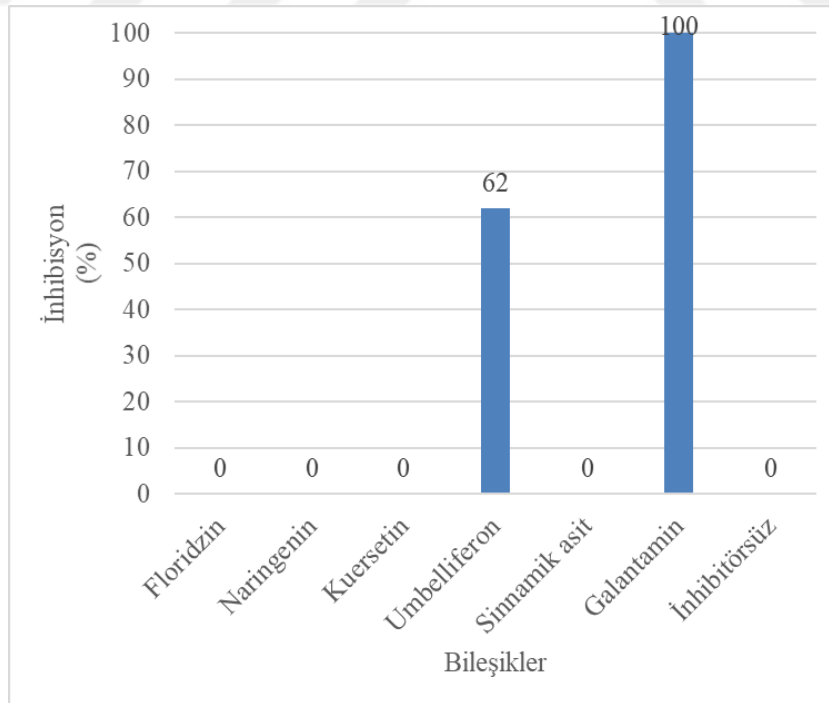
Şekil 4.10 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin 15 mg/mL, konsantrasyonlarının asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.9 ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.9 15 mg/mL bileşik konsantrasyonları için asetilkolinesteraz inhibisyon analizi sonuçları

	Inhibisyon (%)
Floridzin	0
Naringenin	0
Kuersetin	0
Umbelliferon	62,00
Sinamik asit	0
Galantamin	100,00
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.9 ve Şekil 4.11’de verilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılmış olan galantamin 15 mg/mL konsantrasyonda asetilkolinesteraz enziminde %100’lük bir inhibisyona sebep olurken, 15 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden umbelliferonun %62 gibi bir inhibisyon yüzdesiyle asetilkolinesteraz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.11 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve galantiminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Yapılan istatistiksel analiz, üç tekrarlı çalışmanın aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p = 0,9773$).

4.3.2 AChE İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları

AChE enziminin inhibisyon kinetiği analizinde 6; 3; 1,5; 0,75 ve 0,375 mM gibi geniş yelpazede değişen substrat konsantrasyonları kullanılarak bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol için Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmış ve bu değerlere göre sonuçlar yorumlanmıştır.

İnhibitör kullanılmadan yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.10'da verilmiştir.

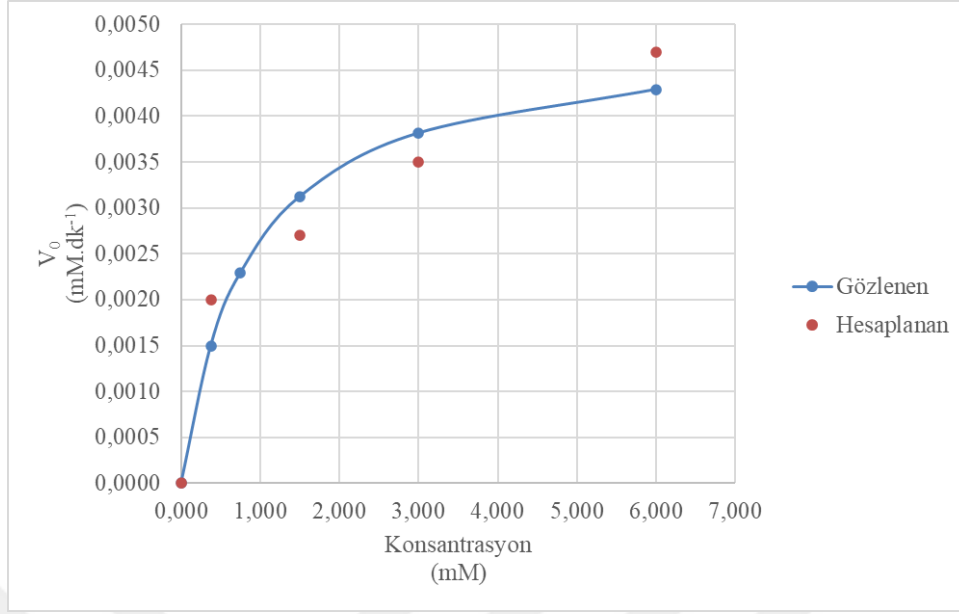
Tablo 4.10 İnhibitör kullanılmadan gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0020	0,0015	0,0005	2,6667	500,000	668,690
0,750	***	0,0023	-0,0023	1,3333	***	436,402
1,500	0,0027	0,0031	-0,0004	0,6667	370,370	320,259
3,000	0,0035	0,0038	-0,0003	0,3333	285,714	262,187
6,000	0,0047	0,0043	0,0004	0,1667	212,766	233,151
K_m :	0,8535					
V_{max} :	0,0049					

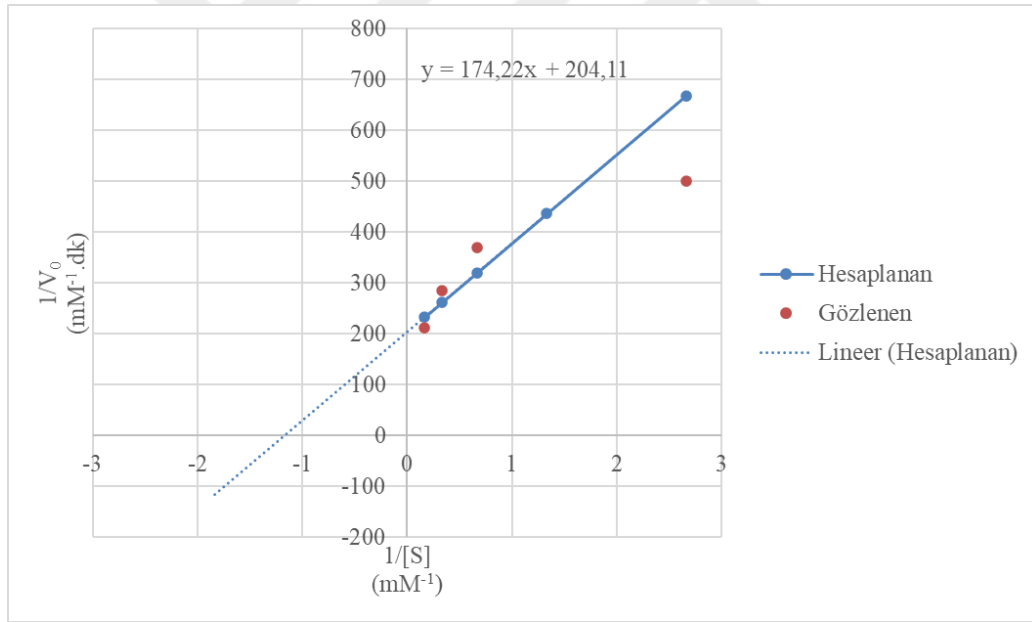
*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan

*** Ölçüm hata oranı yüksek olduğu için hesap dışı bırakılmıştır.



Şekil 4.12 Michealis-Menten grafiği, inhibitörsüz



Şekil 4.13 Lineweaver-Burk grafiği, inhibitörsüz

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.12’de, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.13’te verilmiştir.

Bu grafikler kullanılarak hesaplanmış $V_{\max}$ değeri 0,0049 iken, K_m değeri 0,8535 olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılmış olan galantamin ile yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.11’de verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.14’te, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.15’te verilmiştir.

Bu grafikler kullanılarak hesaplanmış V_{max} değeri 0,0095 iken, K_m değeri 4,5787 olarak bulunmuştur.

Floridzin kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.12’de verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.16’da yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.17’de verilmiştir.

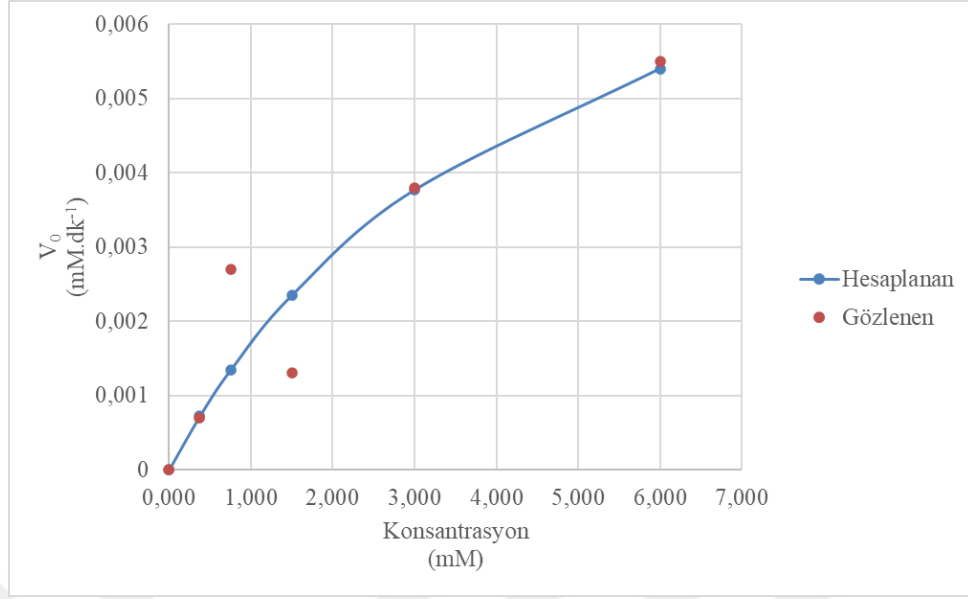
Bu grafikler kullanılarak hesaplanmış V_{max} değeri 0,0134 iken, K_m değeri 1,3418 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.11 Galantamin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

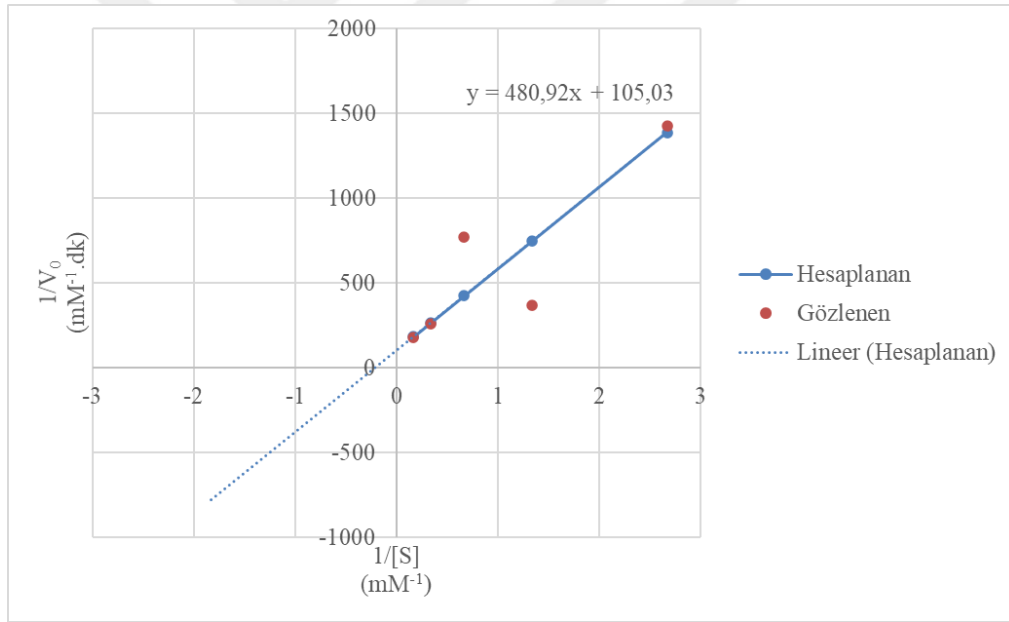
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0007	0,0007	0,0000	2,6667	1428,571	1387,476
0,750	0,0027	0,0013	0,0014	1,3333	370,370	746,255
1,500	0,0013	0,0023	-0,0010	0,6667	769,231	425,644
3,000	0,0038	0,0038	0,0000	0,3333	263,158	265,339
6,000	0,0055	0,0055	0,0001	0,1667	181,818	185,186
K_m :	4,5787					
V_{max} :	0,0095					

*: G: Gözlenen

**: H: Hesaplanan



Şekil 4.14 Galantamin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



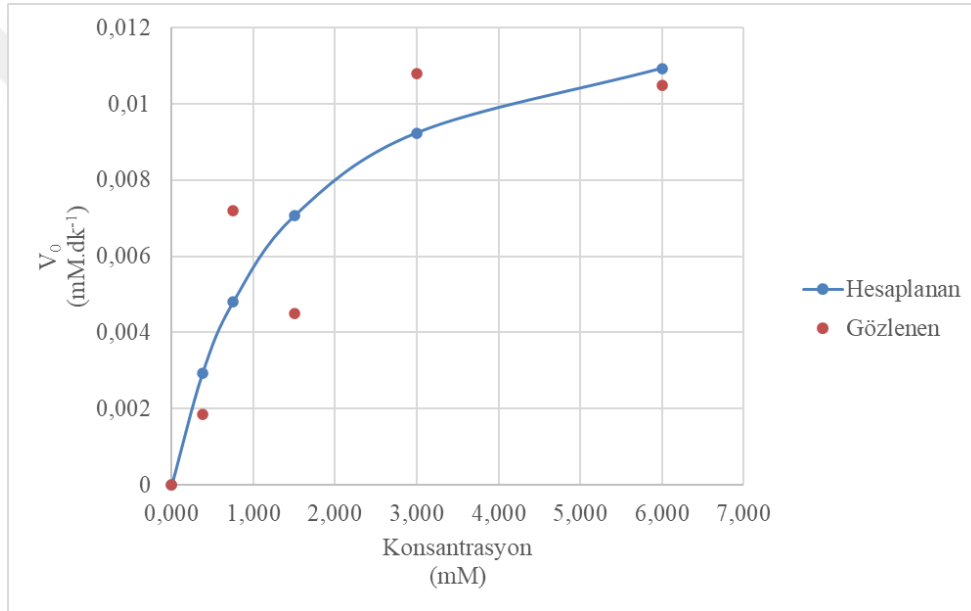
Şekil 4.15 Galantamin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.12 Floridzin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

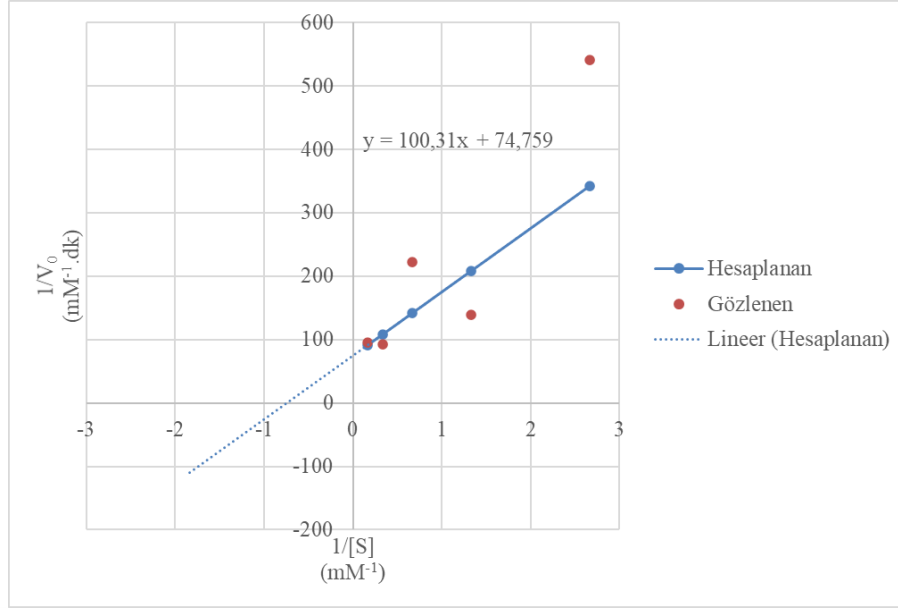
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0019	0,0029	-0,0011	2,6667	540,541	342,264
0,750	0,0072	0,0048	0,0024	1,3333	138,889	208,512
1,500	0,0045	0,0071	-0,0026	0,6667	222,222	141,635
3,000	0,0108	0,0092	0,0016	0,3333	92,593	108,197
6,000	0,0105	0,0109	-0,0004	0,1667	95,238	91,478
K_m :	1,3418					
V_{max} :	0,0134					

*: G: Gözlenen

**: H: Hesaplanan



Şekil 4.16 Floridzin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.17 Floridzin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Naringenin kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.13'te verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.18'de, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.19'da verilmiştir.

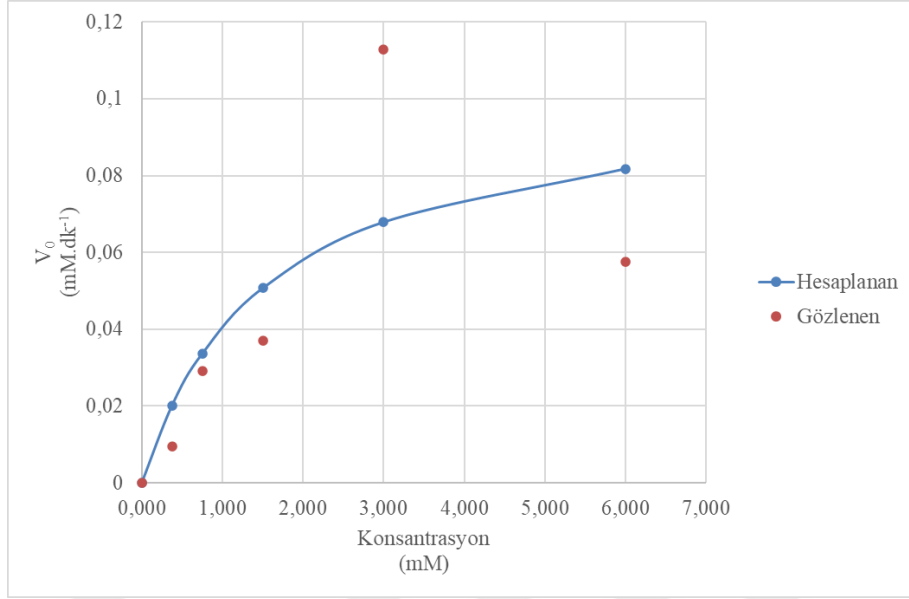
Bu grafikler kullanılarak hesaplanmış V_{max} değeri 0,1028 iken, K_m değeri 1,5400 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.13 Naringenin kullanarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

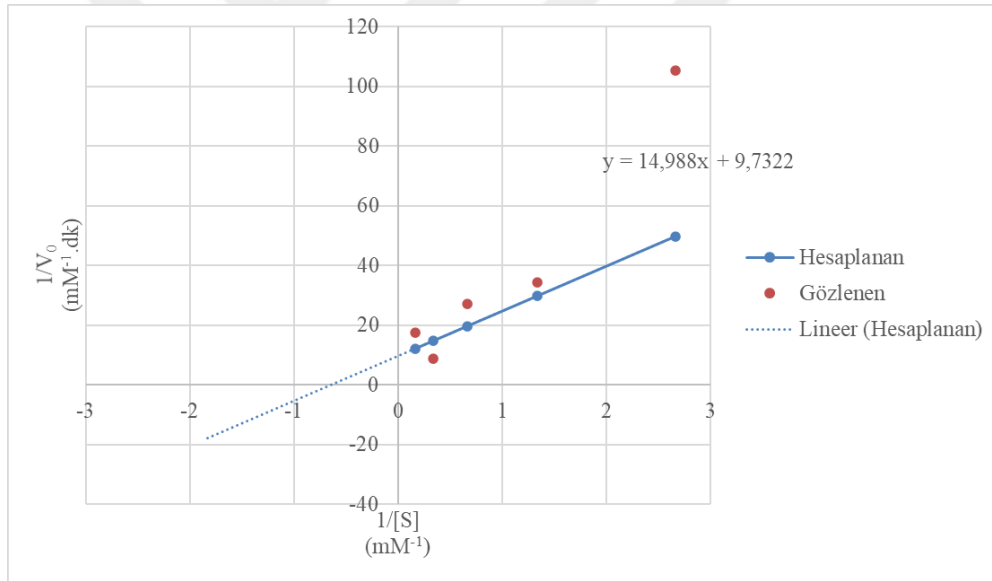
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0095	0,0201	-0,0106	2,6667	105,263	49,700
0,750	0,0290	0,0337	-0,0047	1,3333	34,483	29,716
1,500	0,0370	0,0507	-0,0137	0,6667	27,027	19,724
3,000	0,1128	0,0679	0,0449	0,3333	8,865	14,728
6,000	0,0575	0,0818	-0,0243	0,1667	17,391	12,230
Km:	1,5400					
Vmax:	0,1028					

*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan



Şekil 4.18 Naringenin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.19 Naringenin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Kuersetin kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.14'te verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.20'de yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.21'de verilmiştir.

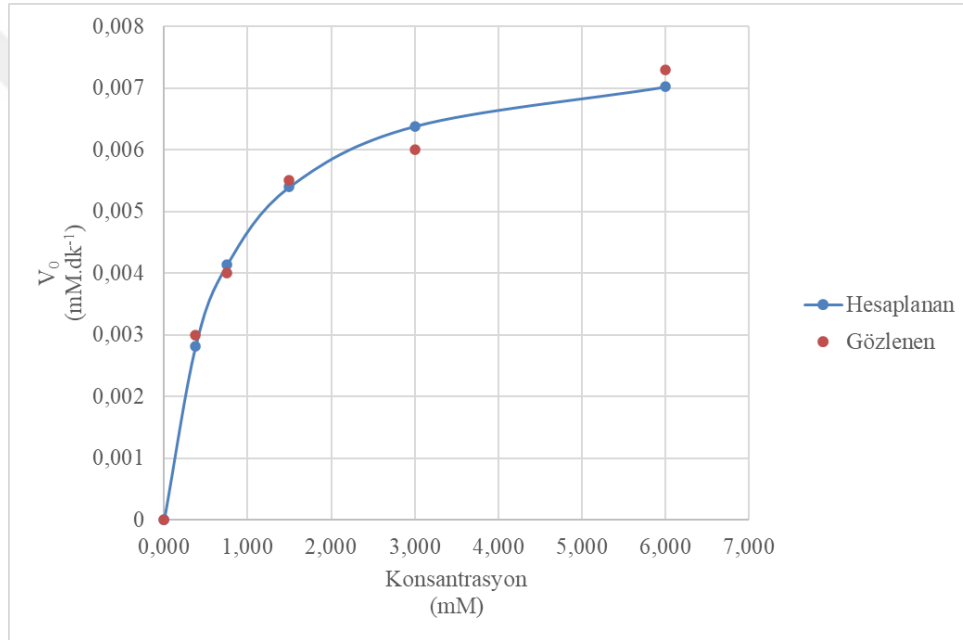
Bu grafikler kullanılarak hesaplanmış V_{max} değeri 0,0078 iken, K_m değeri 0,6676 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.14 Kuersetin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

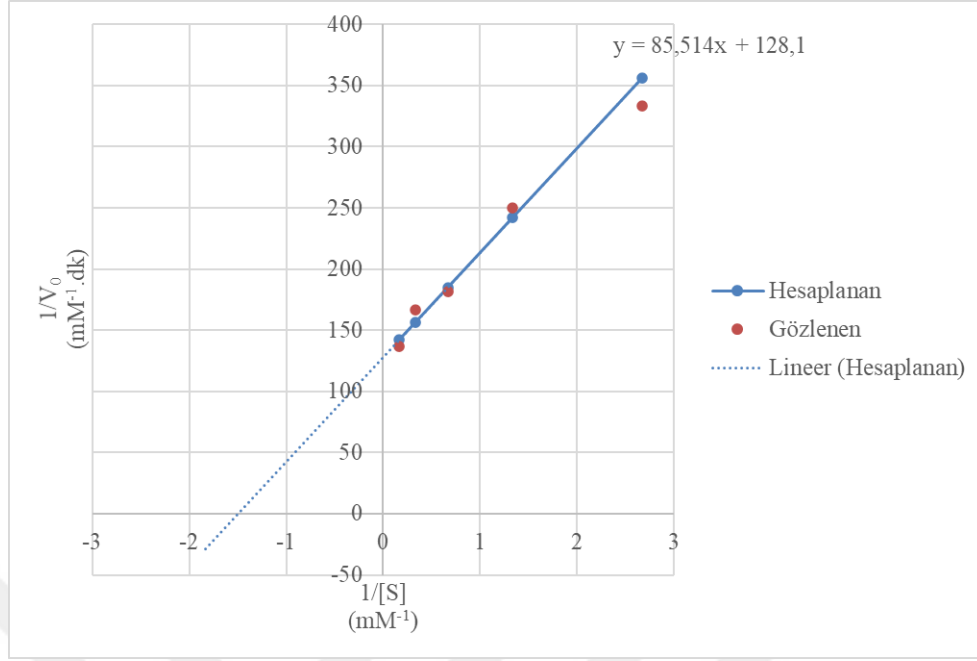
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0030	0,0028	0,0002	2,6667	333,333	356,135
0,750	0,0040	0,0041	-0,0001	1,3333	250,000	242,117
1,500	0,0055	0,0054	0,0001	0,6667	181,818	185,108
3,000	0,0060	0,0064	-0,0004	0,3333	166,667	156,603
6,000	0,0073	0,0070	0,0003	0,1667	136,986	142,351
K_m :	0,6676					
V_{max} :	0,0078					

*: G: Gözlenen

**: H: Hesaplanan



Şekil 4.20 Kuersetin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.21 Kuersetin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Umbelliferon kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.15'te verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.22'de, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.23'te verilmiştir.

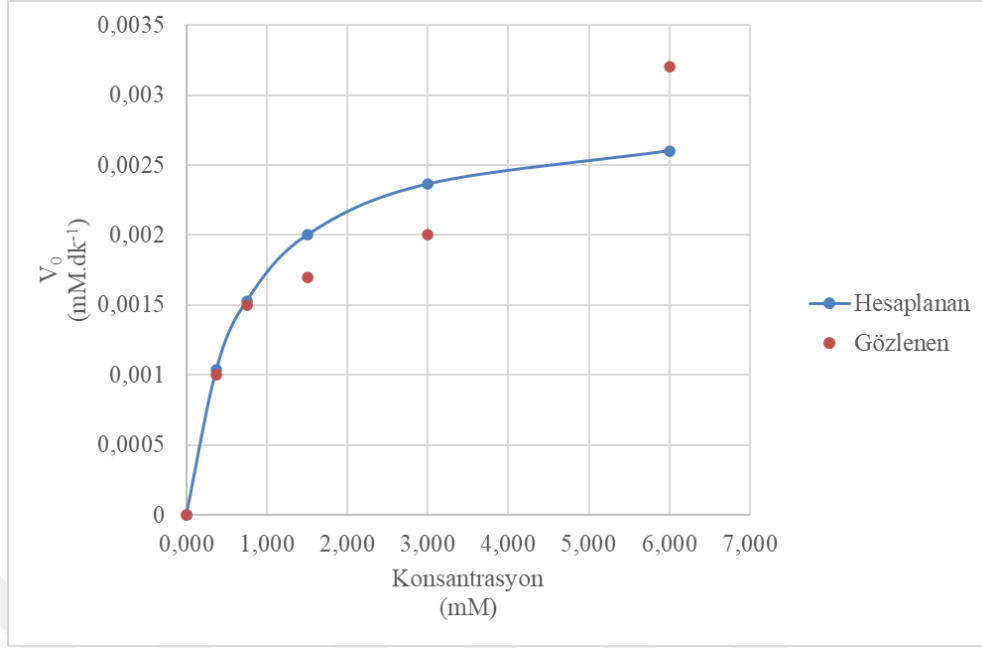
Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş V_{max} değeri 0,0029 iken, K_m değeri 0,6676 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.15 Umbelliferon kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

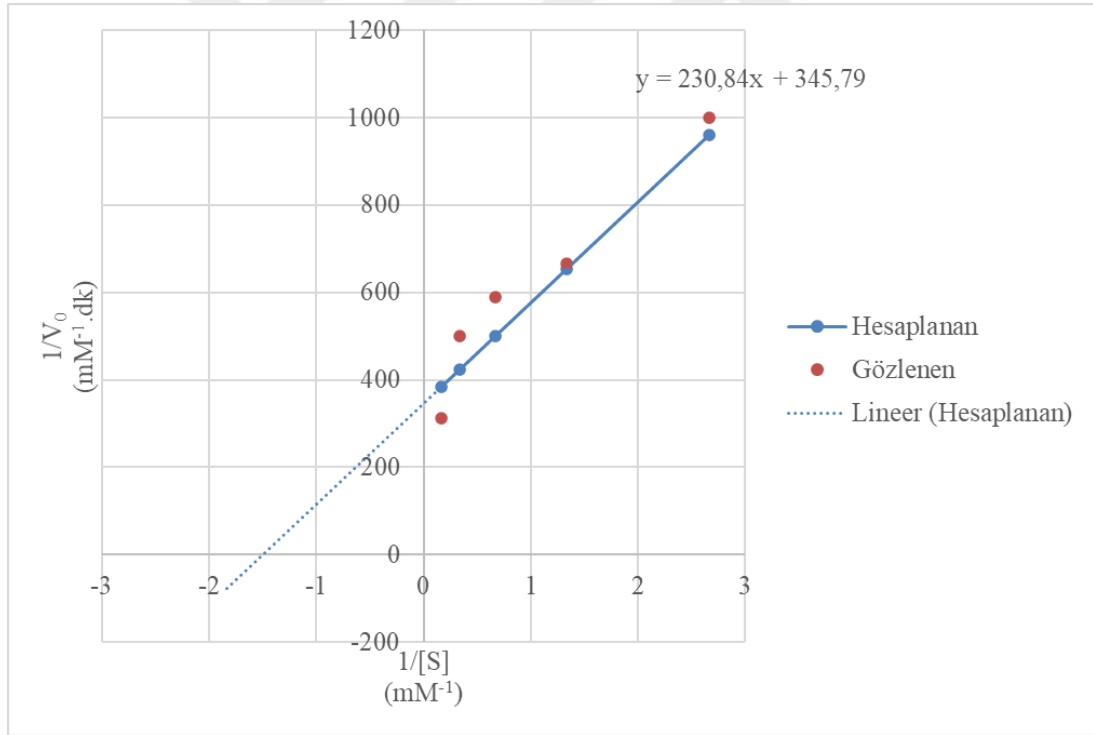
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0010	0,0010	0,0000	2,6667	1000,000	961,364
0,750	0,0015	0,0015	0,0000	1,3333	666,6667	653,579
1,500	0,0017	0,0020	-0,0003	0,6667	588,235	499,687
3,000	0,0020	0,0024	-0,0004	0,3333	500,000	422,741
6,000	0,0032	0,0026	0,0006	0,1667	312,500	384,267
K_m :	0,6676					
V_{max} :	0,0029					

*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan



Şekil 4.22 Umbelliferon kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.23 Umbelliferon kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Sinamik asit kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.16'da verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.24'te, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.25'te verilmiştir.

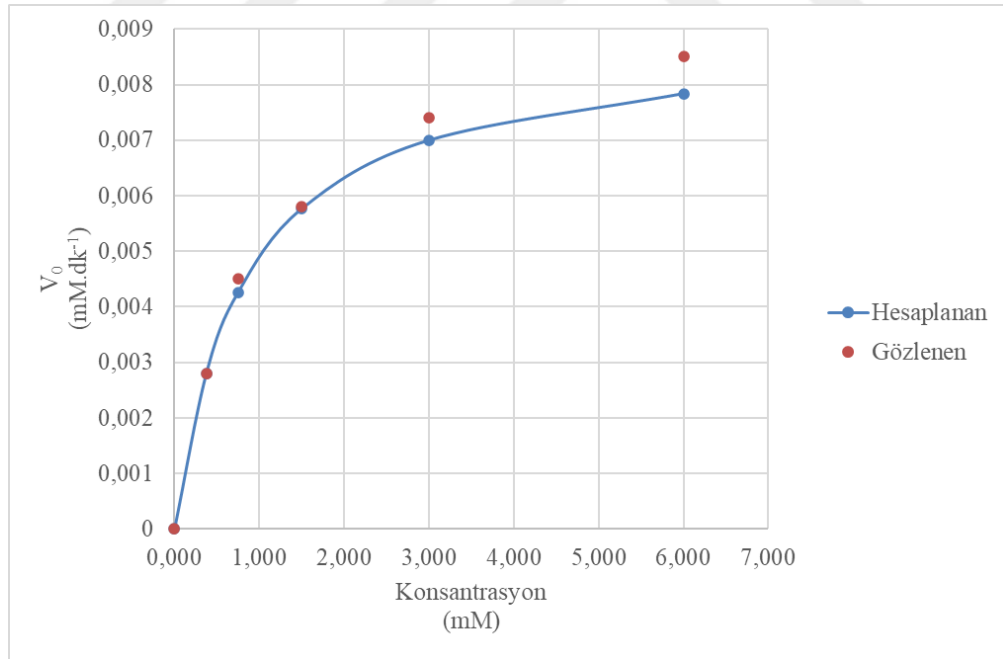
Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş $V_{\max}$ değeri 0,0089 iken, K_m değeri 0,8170 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.16 Sinnamik asit kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

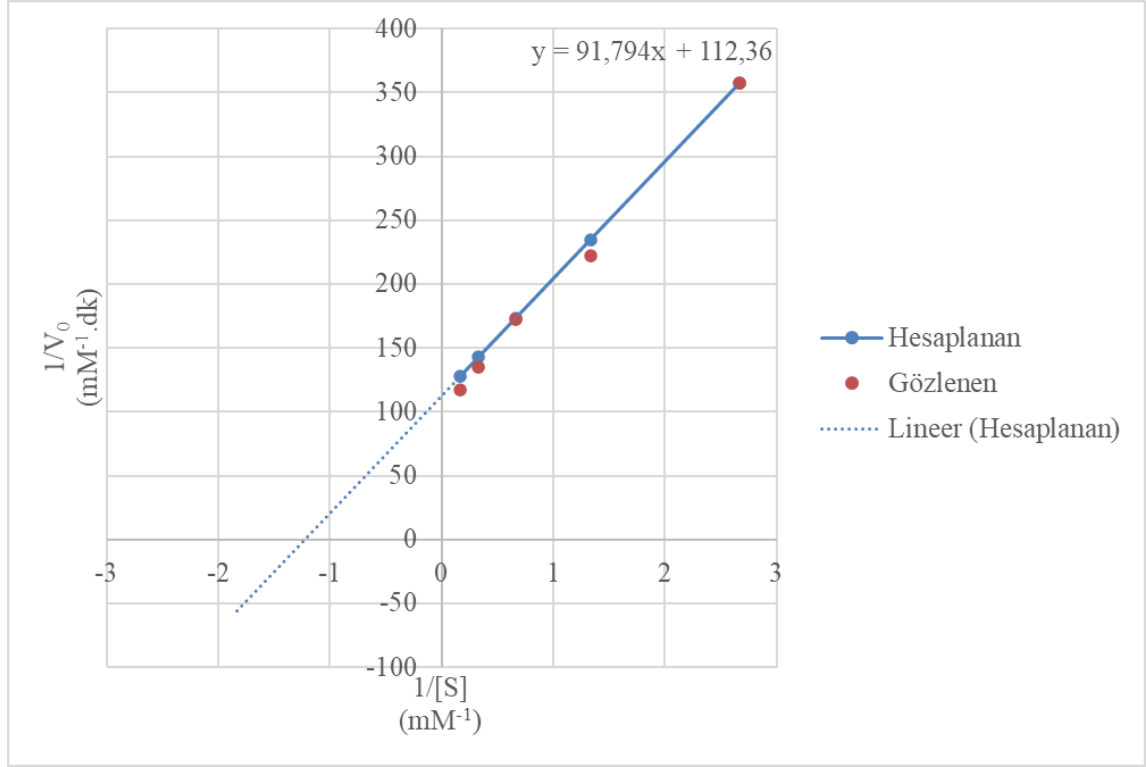
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,375	0,0028	0,0028	0,0000	2,6667	357,143	357,143
0,750	0,0045	0,0043	0,0002	1,3333	222,222	234,751
1,500	0,0058	0,0058	0,0000	0,6667	172,414	173,555
3,000	0,0074	0,0070	0,0004	0,3333	135,135	142,957
6,000	0,0085	0,0078	0,0007	0,1667	117,647	127,659
Km:	0,8170					
Vmax:	0,0089					

*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan

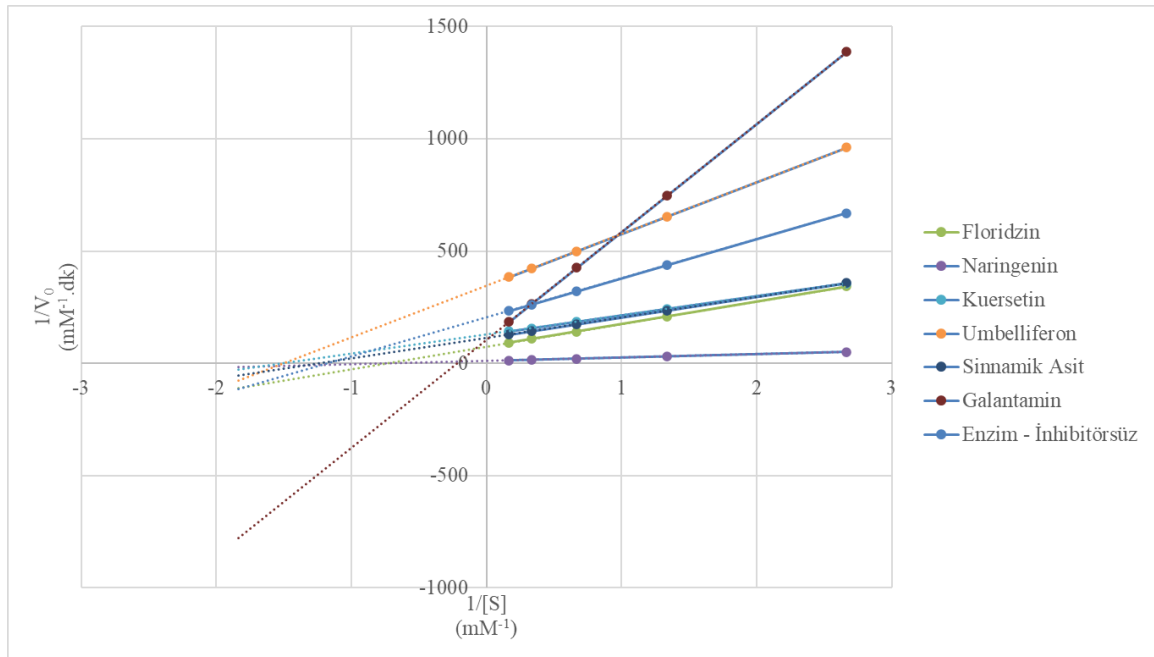


Şekil 4.24 Sinnamik asit kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.25 Sinamik asit kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan galantamin için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali Şekil 4.25 'te verilmiştir.



Şekil 4.26 Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan galantamin için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali

Lineweaver - Burk grafiği, enzim inhibisyonunun türünü belirlemek için kullanılır ve grafiklere bakılarak yarışmalı, yarışmasız ve karışık tip inhibisyonlar anlaşılabilir. Yarışmalı inhibitörler, inhibe edilmemiş enzimle aynı y-kesişim noktasına sahiptir (yarışmalı inhibitörler V_{max} 'ı bozmadığından, V_{max} 'ın tersi de değışmez). Bununla birlikte, iki doğrunun farklı eğimleri ve x kesişim noktaları vardır. Yarışmasız inhibisyon, inhibe edilmemiş enzim ile aynı x- kesişim noktasına sahiptir (K_m etkilenmez), ancak doğrular farklı eğim ve y kesişme noktalarına sahiptir. Karışık tip inhibisyonda y ve x eksen kesişim noktalarının ikisi de inhibe edilmemiş enzimden farklıdır. Bitki kökenli bileşikler ve galantamin için K_m ve V_{max} değerleri ve sonuçlara göre elde edilmiş inhibisyon tipleri Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17 Asetilkolinesteraz inhibisyon türleri

	K_m	V_{max}	İnhibisyon Tipi
Enzim	0,8535	0,0049	
Galantamin (Pozitif Kontrol)	4,5787	0,0095	Karışık Tip İnhibisyon
Floridzin	1,3418	0,0134	İnhibisyon yok.
Naringenin	1,5400	0,1028	İnhibisyon yok.
Kuersetin	0,6676	0,0078	İnhibisyon yok.
Umbelliferon	0,6676	0,0029	Rekabetsiz İnhibisyon
Sinamik asit	0,8170	0,0089	İnhibisyon yok.

4.4 α - Glukozidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları

4.4.1 α - Glukozidaz İnhibisyon Analiz Sonuçları

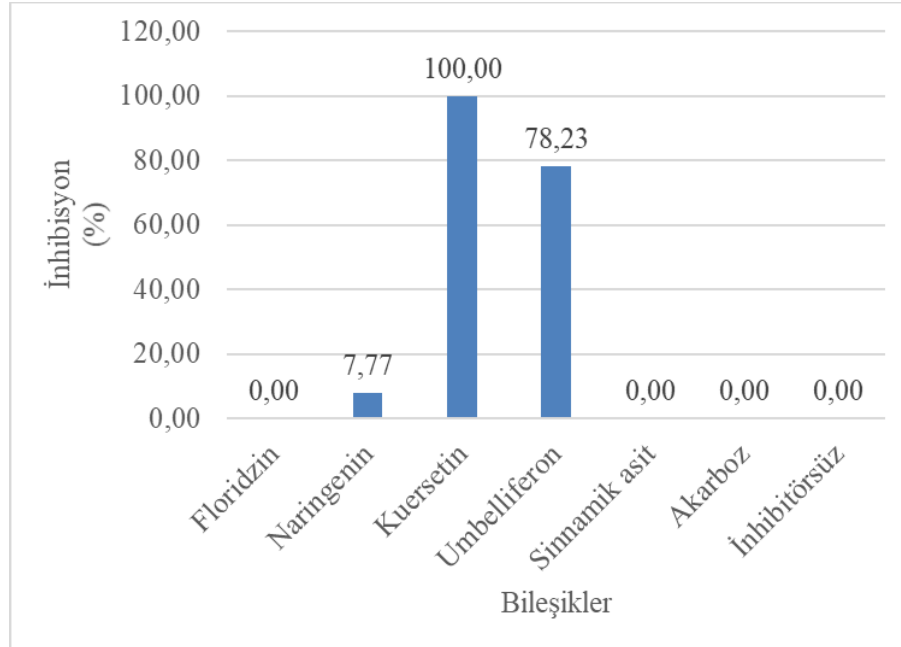
α - Glukozidaz inhibisyon testinde, floridzin, naringenin, kuersetin, umbelliferon, ve sinamik asidin üç farklı konsantrasyonunun (5, 10 ve 15 mg/mL) inhibitör aktiviteleri test edilmiştir ve bitki kökenli bu bileşiklerin aktiviteleri, ticari olarak kullanılan bir α - glukozidaz inhibitörü olan akarbozun üç farklı konsantrasyonu (5, 10 ve 15 mg/mL) ile karşılaştırılmıştır. Bileşiklerin 5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL konsantrasyonlarının sonuçları sırasıyla Tablo 4.18, Tablo 4.19 ve Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.18 Bileşiklerin 5 mg/mL konsantrasyonu için α - glukozidaz inhibisyon analiz sonuçları

İnhibisyon	
Floridzin	0
Naringenin	7,77
Kuersetin	100,00
Umbelliferon	78,23
Sinnamik asit	0
Akarboz	0
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.18 ve Şekil 4.27, bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun α - glukozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkilerini % inhibisyon olarak göstermektedir.

Tablo 4.18 ve Şekil 4.27’de verilen sonuçlara göre akarboz 5 mg/mL konsantrasyonda α - glukozidaz enziminde herhangi bir inhibisyona sebep olmazken, 5 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden naringenin, umbelliferon ve kuersetinin α - glukozidaz üzerine etki ettiği ve bu etkinin sırasıyla %7,77; %78,23 ve %100 gibi bir değerlerle pozitif kontrol olan akarbozdan daha yüksek bir inhibisyon yüzdesiyle α - glukozidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



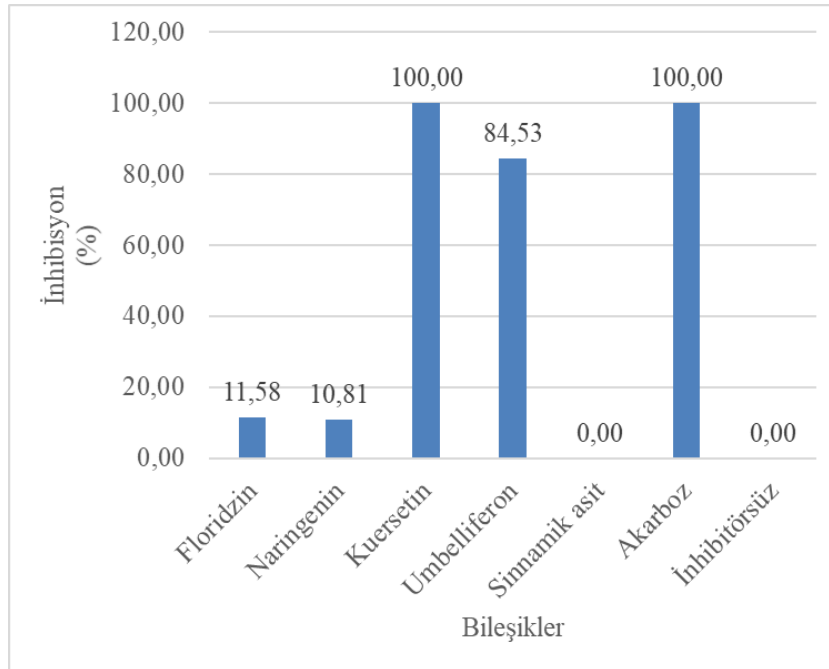
Şekil 4.27 5 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan akarbozun 10 mg/mL, konsantrasyonlarının α - glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.19 ve Şekil 4.28’de verilmiştir.

Tablo 4.19 10 mg/mL bileşik konsantrasyonları için α - glukozidaz inhibisyon analizi sonuçları

İnhibisyon	
Floridzin	11,58
Naringenin	10,81
Kuersetin	100,00
Umbelliferon	84,53
Sinamik asit	0
Akarboz	100,00
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.19 ve Şekil 4.28’de verilen sonuçlara göre akarboz 10 mg/mL konsantrasyonda α - glukozidaz enziminde %100’lük bir inhibisyona sebep olurken, 10 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden floridzin, naringenin, kuersetin ve umbelliferonun α - glukozidaz üzerine etki ettiği ve bu etkinin sırasıyla %11,58; %10,81; %100 ve %84,53 gibi bir değerlerle α - glukozidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



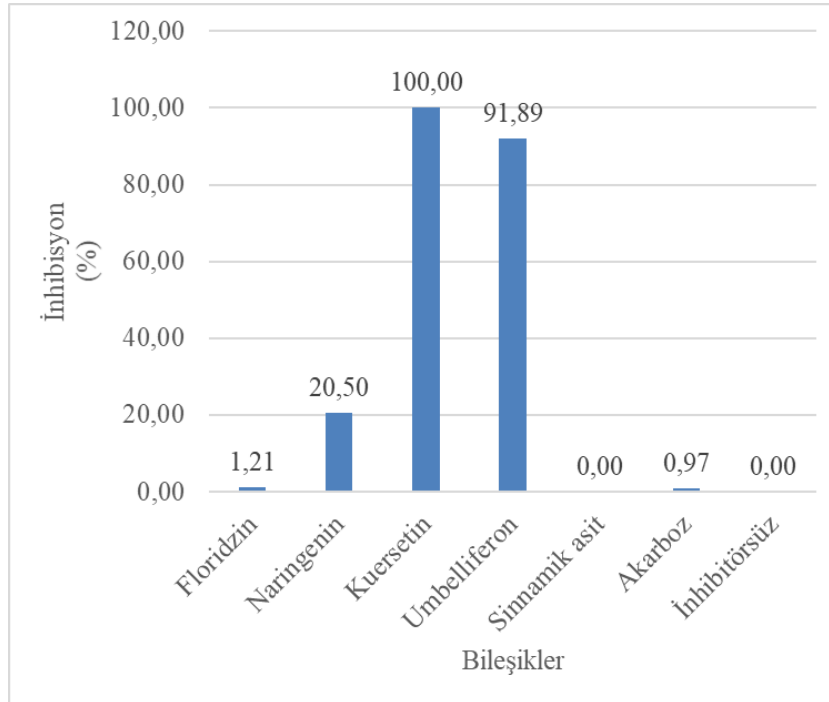
Şekil 4.28 10 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Bitki kökenli bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantaminin 15 mg/mL, konsantrasyonlarının α - glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdesi (% inhibisyon) sonuçları Tablo 4.20 ve Şekil 4.29’de verilmiştir.

Tablo 4.20 15 mg/mL bileşik konsantrasyonları için α - glukozidaz inhibisyon analizi sonuçları

	İnhibisyon
Floridzin	1,21
Naringenin	20,50
Kuersetin	100,00
Umbelliferon	91,89
Sinamik asit	0
Akarboz	0,97
İnhibitörsüz	-

Tablo 4.20 ve Şekil 4.29’da verilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılmış olan akarboz 15 mg/mL konsantrasyonda α - glukozidaz enziminde %0,97’lik bir inhibisyona sebep olurken, 15 mg/mL konsantrasyonda kullanılmış olan bitki kökenli bileşiklerden floridzin, naringenin, kuersetin ve umbelliferonun α - glukozidaz üzerine etki ettiği ve bu etkinin sırasıyla %1,21; %20,50; %100 ve %91,89 gibi bir değerlerle α - glukozidaz enzimini inhibe ettiği görülmektedir.



Şekil 4.29 15 mg/mL bitki kökenli bileşikler ve akarbozun α - glukozidaz enzimi inhibisyon yüzdeleri

Yapılan istatistiksel analiz, üç tekrarlı çalışmanın aktiviteleri arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p = 0,8691$).

4.4.2 α - Glukozidaz İnhibisyon Kinetiği Analiz Sonuçları

α - Glukozidaz enziminin inhibisyon kinetiği analizinde 11; 5,5; 2,75; 1,375; 0,6875 ve 0,344 mM gibi geniş yelpazede değişen substrat konsantrasyonları için, bitki kökenli bileşiklerden sadece inhibisyon analizinde yüksek sonuç veren kuersetin ve umbelliferon ve pozitif kontrol için Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmış ve bu değerlere göre sonuçlar yorumlanmıştır.

İnhibitör kullanılmadan yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.21’de verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.30’da yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.31’de verilmiştir.

Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş V_{max} değeri 0,0155 iken, K_m değeri 3,7987 olarak bulunmuştur.

Pozitif kontrol olarak kullanılmış olan akarboz ile yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.22’de verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.32’de, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.33’te verilmiştir.

Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş V_{max} değeri 0,1013 iken, K_m değeri 3,0180 olarak bulunmuştur.

Kuersetin kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.23’te verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.34'te, yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.35'te verilmiştir.

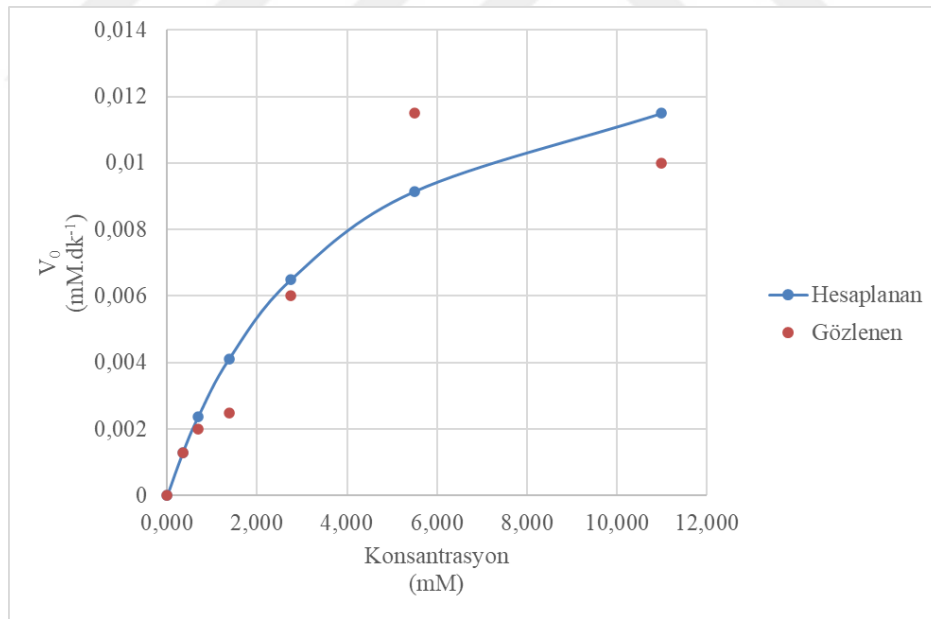
Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş $V_{\max}$ değeri 0,0378 iken, K_m değeri 1,3502 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.21 İnhibitör kullanılmadan gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

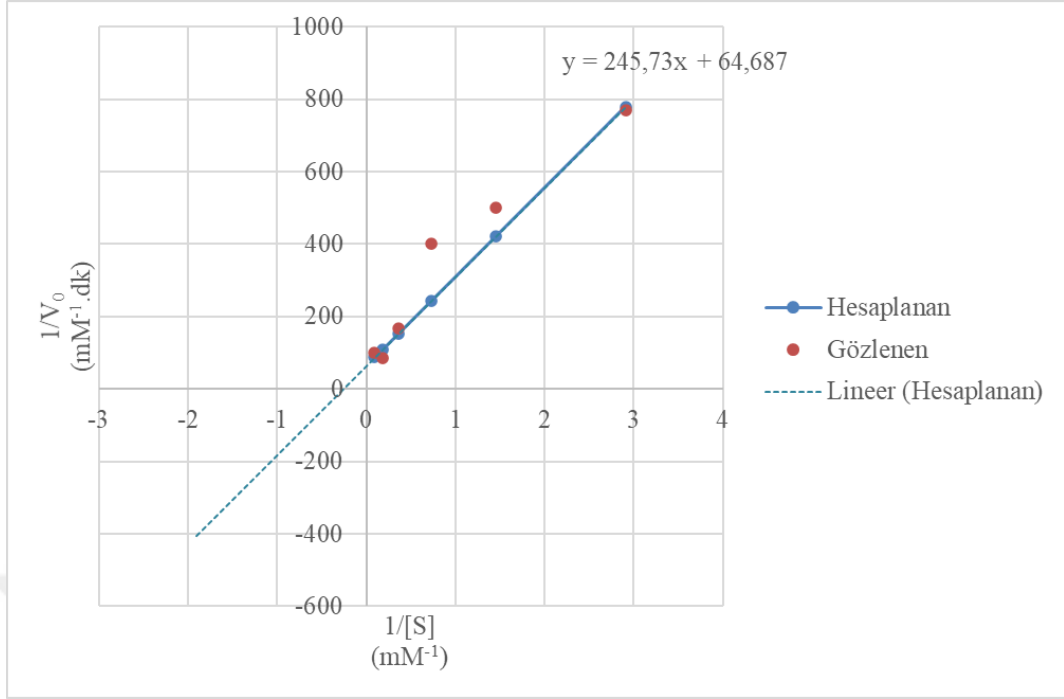
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,344	0,0013	0,0013	0,0087	2,9070	769,230	779,008
0,688	0,0020	0,0024	0,0091	1,4545	500,00	422,107
1,375	0,0025	0,0041	0,0059	0,7273	400,00	243,397
2,750	0,0060	0,0065	0,0040	0,3637	166,667	154,042
5,500	0,0115	0,0091	0,0071	0,1818	86,957	109,365
K_m :	3,7987					
$V_{\max}$:	0,0155					

*: G: Gözlenen

**: H: Hesaplanan



Şekil 4.30 Michealis-Menten grafiği, inhibitörsüz



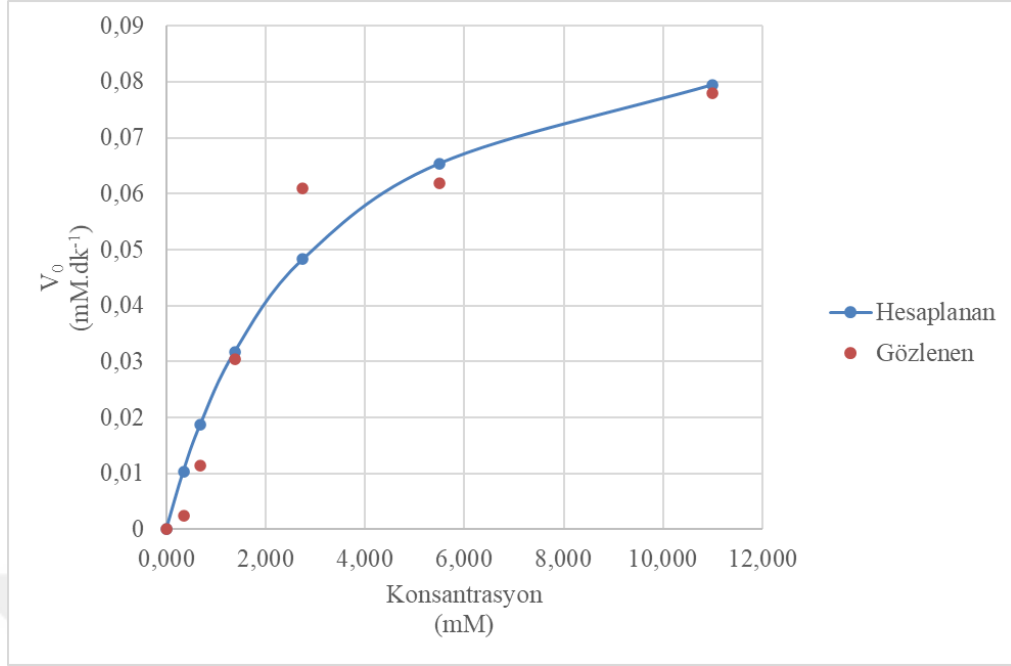
Şekil 4.31 Lineweaver-Burk grafiği, inhibitörsüz

Tablo 4.22 Akarboz kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

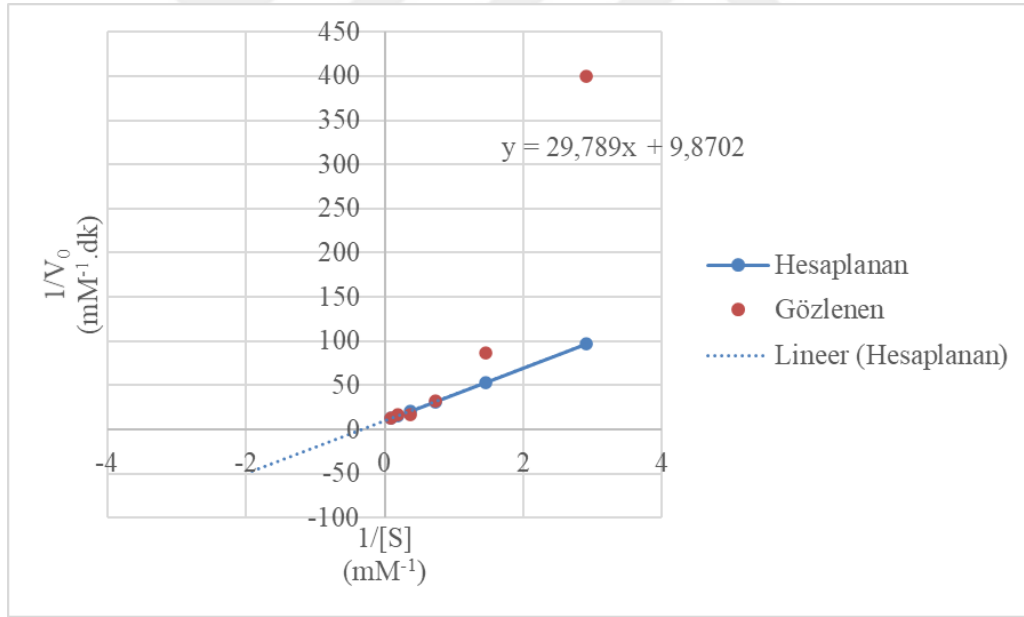
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	$1/[S]$ (mM ⁻¹)	$1/V_0$ G* (mM ⁻¹ .dk)	$1/V_0$ H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,344	0,0025	0,0104	-0,0079	2,9070	400,000	96,465
0,688	0,0115	0,0188	-0,0073	1,4545	86,957	53,199
1,375	0,0305	0,0317	0,0012	0,7272	32,787	31,535
2,750	0,0610	0,0483	0,0127	0,3636	16,393	20,702
5,500	0,0618	0,0654	-0,0036	0,1818	16,181	15,286
Km:	3,0180					
Vmax:	0,1013					

*: G: Gözlenen

**: H: Hesaplanan



Şekil 4.32 Akarboz kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.33 Akarboz kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.23 Kuersetin kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

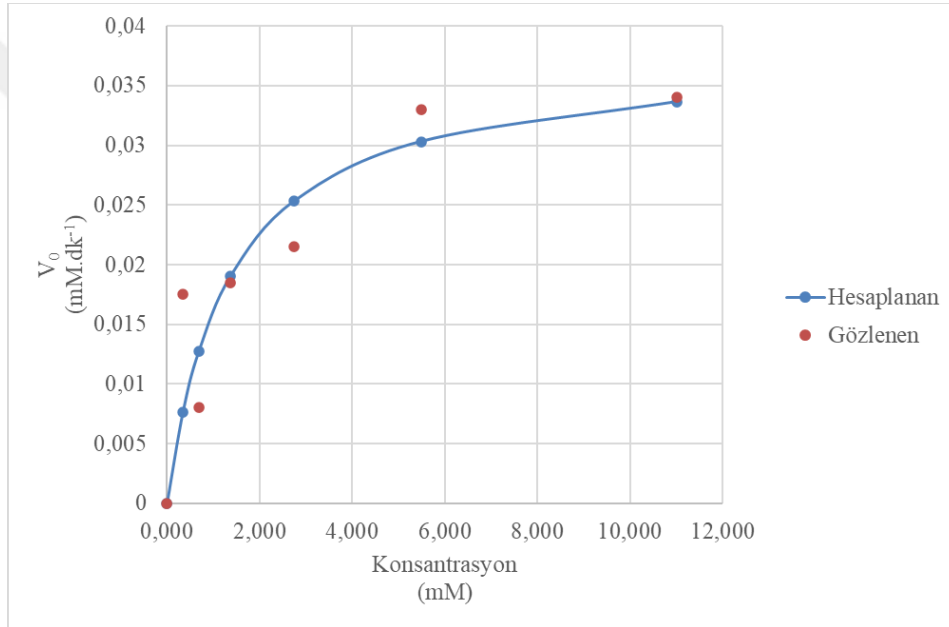
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,344	0,0175	0,0077	0,0098	2,9070	57,143	130,377
0,688	0,0080	0,0127	-0,0047	1,4545	125,000	78,463
1,375	0,0185	0,0191	-0,0006	0,7273	54,054	52,467
2,750	0,0215	0,0253	-0,0038	0,3636	46,512	39,470
5,500	0,0330	0,0303	0,0027	0,1818	30,303	32,971

Km: 1,3502

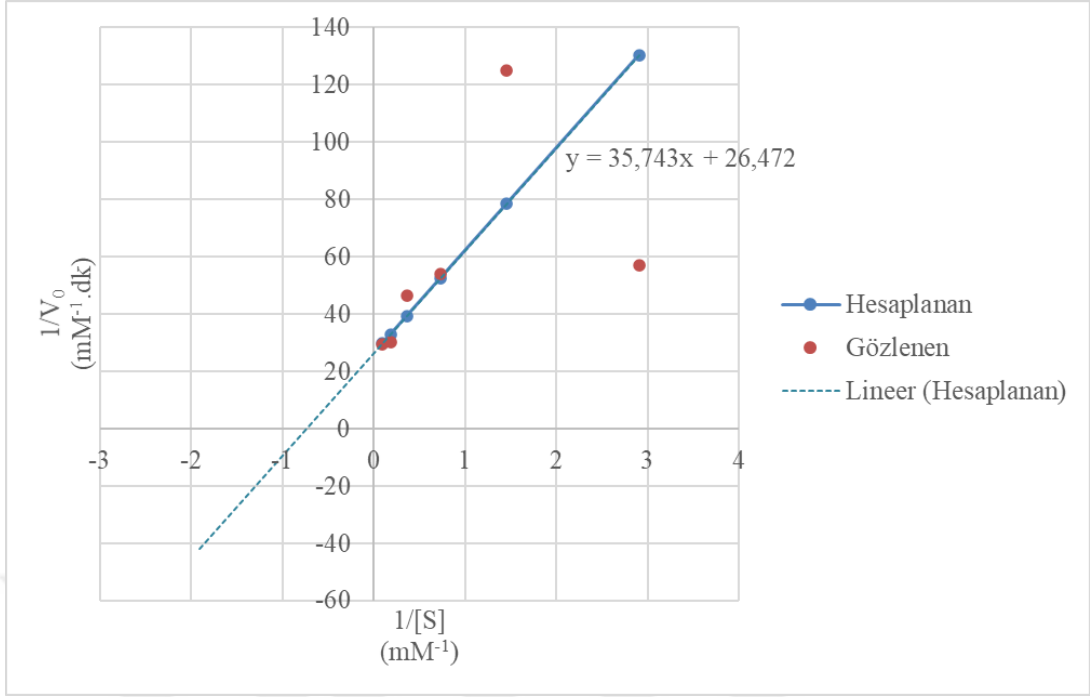
Vmax: 0,0378

*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan



Şekil 4.34 Kuersetin kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.35 Kuersetin kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Umbelliferon kullanarak yapılan kinetik çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.24'te verilmiştir.

Bu veriler kullanılarak çizilmiş Michealis-Menten grafiği Şekil 4.36'da yine aynı verilerin kullanılmasıyla elde edilmiş Lineweaver-Burk grafiği ise Şekil 4.37'de verilmiştir.

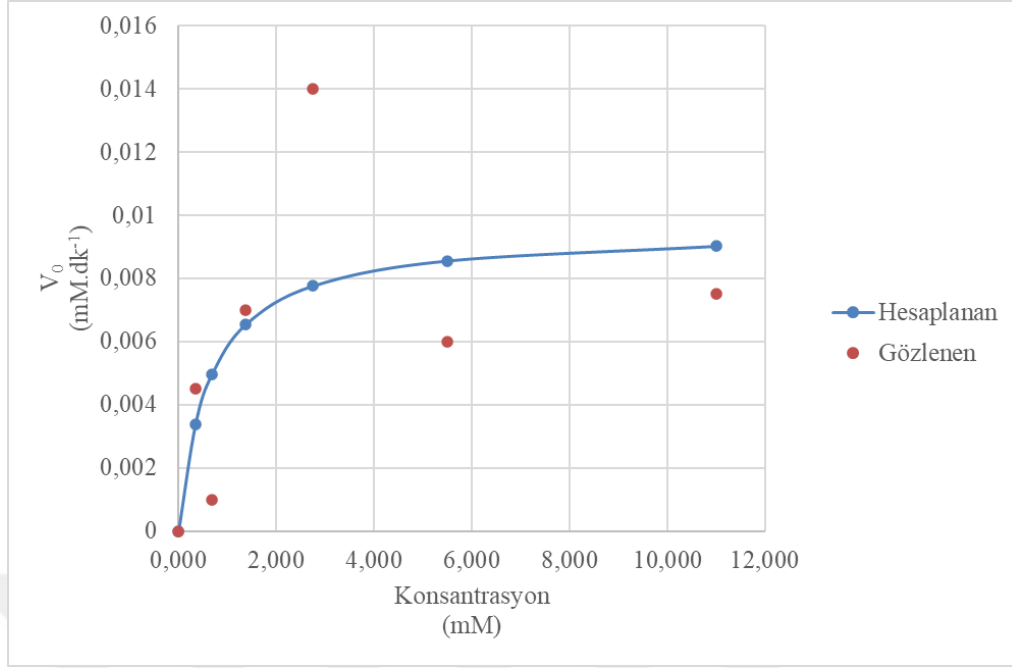
Bu grafikler kullanılarak elde edilmiş V_{max} değeri 0,0095 iken, K_m değeri 0,6295 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.24 Umbelliferon kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon için kinetik verileri

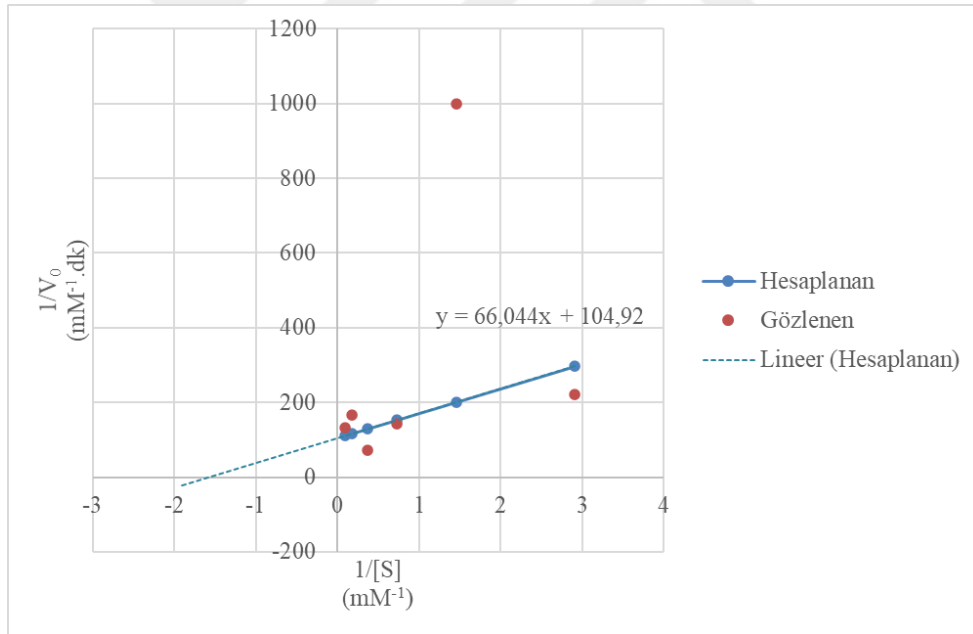
[S] (mM)	V_0 G* (mM.dk ⁻¹)	V_0 H** (mM.dk ⁻¹)	V_0 Fark (G* - H**) (mM.dk ⁻¹)	1/[S] (mM ⁻¹)	1/ V_0 G* (mM ⁻¹ .dk)	1/ V_0 H** (mM ⁻¹ .dk)
0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,344	0,0045	0,0034	0,0011	2,9070	222,222	296,912
0,688	0,0010	0,0050	0,0040	1,4545	1000,000	200,987
1,375	0,0070	0,0065	0,0005	0,7273	142,857	152,955
2,750	0,0140	0,0078	0,0062	0,3636	71,429	128,939
5,500	0,0060	0,0086	-0,0026	0,1818	166,667	116,931
K_m :	0.6295					
V_{max} :	0,0095					

*: G: Gözlenen

** : H: Hesaplanan

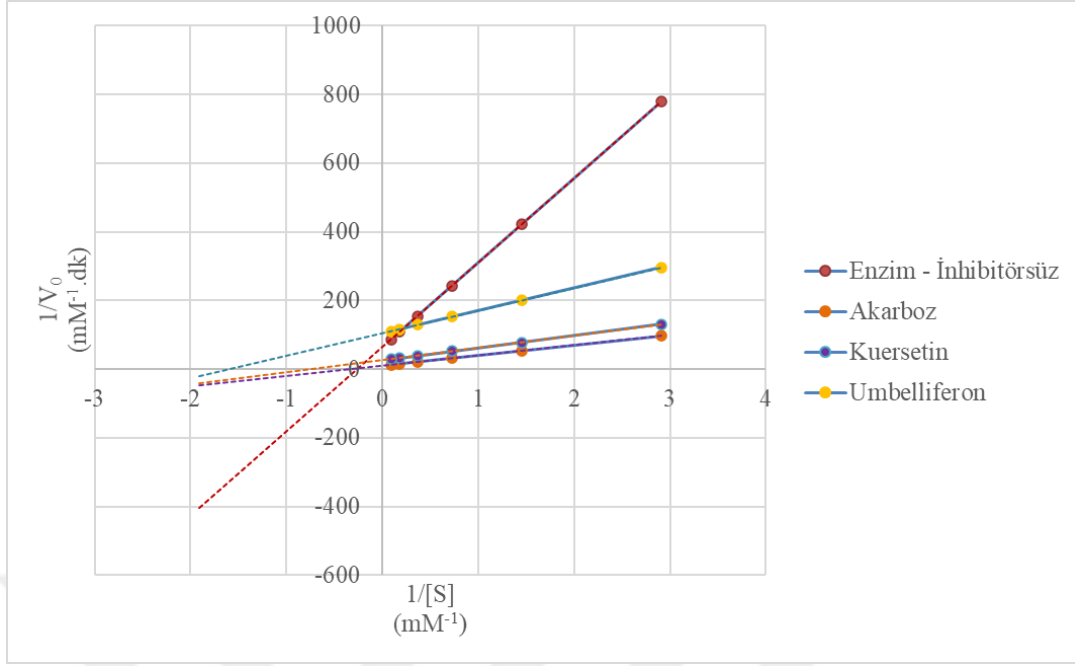


Şekil 4.36 Umbelliferon kullanıldığı durum için Michealis-Menten grafiği



Şekil 4.37 Umbelliferon kullanıldığı durum için Lineweaver-Burk grafiği

Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan galantamin için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali Şekil 4.38’de verilmiştir.



Şekil 4.38 Bütün bitki kökenli bileşikler ve pozitif kontrol olan akarboz için çizilmiş olan Lineweaver-Burk grafiklerinin birleştirilmiş hali

Bitki kökenli bileşikler ve galantamin için K_m ve V_{max} değerleri ve sonuçlara göre elde edilmiş inhibisyon tipleri Tablo 4.25'te verilmiştir.

Tablo 4.25 α - Glukozidaz inhibisyon türleri

	K_m	V_{max}	İnhibisyon Tipi
Enzim	3,7987	0,0155	
Akarboz (Pozitif Kontrol)	3,0180	0,1013	Karışık Tip İnhibisyon
Kuersetin	1,3502	0,0378	Karışık Tip İnhibisyon
Umbelliferon	0,6295	0,0095	Karışık Tip İnhibisyon

5. TARTIŞMA

5.1 α - Amilaz İnhibisyon Analizi

α - Amilaz inhibisyon deneyiyle ilgili sonuçlar, Bölüm 4'teki tablolarda verilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi akarboz, deney için pozitif bir kontrol olarak kullanılmış ve deneyde kullanılan en düşük konsantrasyon olan 5 mg/mL değerinde bile %100 inhibisyona sebep olmuştur. Bitki kökenli bileşiklerin inhibisyon sonuçları, akarbozdan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, kuersetinin 5 mg/mL'lik bir konsantrasyondan başlayarak akarboz gibi davrandığı, umbelliferonun ise 10 mg/mL'lik konsantrasyondan sonra %100 inhibisyona sebep olduğu görülmektedir.

Oboh vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada kuersetinin α -amilazın aktivitesi üzerine etkisini incelemiş ve kuersetinin için IC_{50} değerinin $507,61 \pm 10,8 \mu\text{g/L}$ olduğunu gözlemlemiştir. Diğer bir deyişle, yaklaşık 1 mg/L konsantrasyonda kullanılacak kuersetinin, α - amilaz aktivitesinin %100 inhibe edilmesine yeterli olacağı görülmektedir. Yapılan bu doktora çalışmasında test edilen kuersetin konsantrasyonu Oboh vd. tarafından kullanılan konsantrasyonla karşılaştırıldığında oldukça yüksek kalmaktadır. Dolayısıyla kuersetin 5 mg/mL'lik konsantrasyonunda %100'lük bir inhibisyonun görülmesi doğaldır. Bu açıdan bakıldığında Oboh vd. yapmış olduğu çalışma, bu tez çalışmasında elde edilen verileri desteklemektedir. Buradaki konsantrasyon farkını sebebi, Giancarlo vd. (2006)'nın yapmış olduğu benzer bir çalışmada test edilecek örnekler için mg/mL seviyesinde bir konsantrasyon kullanılmasını önermiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemde Giancarlo vd. yapmış olduğu çalışma temel olarak kullanıldığı için, elde edilen değerler Oboh vd. (2015) tarafından gözlenen değerlerden yüksek olmuştur.

Öte yandan, Martinez-Gonzalez vd. (2019) de kuersetinin α - amilaz üzerindeki inhibitör etkisini gözlemlemiş ve bu çalışma sonucunda kuersetinin α - amilaz üzerinde inhibe edici aktivitesinin IC_{50} değerini $12,70 \pm 1,20 \mu\text{M}$ olarak gözlemlemiştir. Kuersetinin moleküler ağırlığının 302,236 g/mol olduğu göz önüne alınarak hesaplama yapıldığında, kuersetinin α - amilaz üzerinde inhibe edici aktivitesine ait IC_{50} değerini 3,84 mg/L olarak hesaplamak mümkündür. Bu da yaklaşık 7,68 mg/L konsantrasyonda kullanılacak kuersetinin, α -amilaz aktivitesinin %100 inhibe edilmesine sebep olacağı anlamına gelmektedir. Dikkat edileceği

üzere, Oboh vd. (2015), Martinez-Gonzalez vd. (2019) ve bu tez çalışmasından elde edilen, α - amilaz üzerinde inhibe edici aktivitesine sahip kuersetin konsantrasyonu ile ilgili veriler arasında büyük farklar bulunmaktadır. Literatürdeki verilere göre etkin kuersetin konsantrasyonunun en düşük 1 mg/L iken, en yüksek 7,68 mg/L olduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ise yaklaşık olarak bu iki verinin ortasında yer almaktadır. Etkin kuersetin konsantrasyonundaki bu farkın sebebi çeşitli deneysel hatalardan kaynaklanabileceği gibi, ortam şartlarından da kaynaklanmış olması muhtemel görülmektedir.

Ancak, gerek bu tez çalışmasında, gerekse hem Oboh vd. (2015), hem de Martinez-Gonzalez vd. (2019) tarafından elde edilen bulgular, kuersetinin α -amilaz için etkili bir inhibitör olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Hatta kuersetinin inhibitör etkisinin, pozitif kontrol olarak kullanılan akarboza benzer etki göstermesi, bu bitki kökenli bileşiğin α - amilaz inhibitörü olarak kullanım potansiyelinin ne derece yüksek olduğunu da göstermektedir.

Literatürde, umbelliferonun α - amilaz üzerindeki inhibitör aktivitesi daha önce ortaya koymaya çalışan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Ramu vd. (2014) umbelliferonun α - amilaz üzerindeki inhibisyon aktivitesinde IC_{50} değerini $32,26 \pm 1,80$ μ g/mL olarak bulmuştur. Dolayısıyla, enzimin %100 oranında inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon yaklaşık olarak 64,52 μ g/mL'dir. Bu tez çalışmasında elde edilen verilere göre umbelliferonun α - amilazı %100 inhibe ettiği konsantrasyon 10 mg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca umbelliferonun 5 mg/mL konsantrasyonunun ise inhibisyona sebep olmadığı görülmüştür. İki sonuç arasında ciddi bir konsantrasyon farkı bulunmaktadır.

Öte yandan, floridzin ve sinnamik asit, α - amilaz için iyi aktivatörler olarak görev yapıyor gibi görünmektedirler. Bulgulara göre, floridzin α - amilaz aktivitesini 5 mg/mL konsantrasyonda yaklaşık 2 kat, 10 mg/mL konsantrasyonda yaklaşık 4 kat ve 15 mg/mL konsantrasyonda ise yaklaşık 6 kat arttırmıştır. Sinnamik asidin α -amilazı 5 mg/mL konsantrasyonda yaklaşık 1 kat ve 10 ile 15 mg/mL konsantrasyonlarda da yaklaşık 2 kat arttırdığı gözlenmiştir. Naringenin de aynı şekilde α - amilaz için bir aktivatör olarak davrandığı gözlemlenmiş, ancak aktiviteyi 5 mg/mL'de sadece yaklaşık %18, 10 mg/mL'de %45 ve 15 mg/mL'lik konsantrasyonda ise %60 arttırmıştır.

Literatürde, floridzin ve sinnamik asidin α - amilaz üzerindeki inhibisyon aktivitesi ile çok az çalışma bulunmaktadır. Yapılan incelemeye göre literatürde sadece Li vd. (2019) yaptığı çalışma ile floridzinin α - amilaz üzerindeki inhibisyon aktivitesini test etmiş ve çalışma sonucunda hiçbir inhibisyon aktivitesi gözlemlenmemiştir. Öte yandan, Adisakwattana vd. (2009), α - amilaz üzerindeki inhibisyon aktivitelerini gözlemlmek için bir dizi sinnamik asit türevi kullanmış ve tüm sinnamik asit türevlerinin herhangi bir inhibisyon aktivitesi göstermediğini öne sürmüştür. Görüldüğü gibi literatürde bulunan sonuçlar ile kimi zaman tutarlı, kimi zaman tutarsız sonuçlar bulunmuştur. Enzim çalışmalarında bu farkı etkileyebilecek çok fazla parametre mevcuttur. Bu farkın nereden kaynaklandığını anlayabilmek için detaylı analiz yapılmalıdır.

5.2 Ksantin Oksidaz İnhibisyon Analizi

Ksantin oksidaz inhibisyon analizi ile ilgili bulgular, Bölüm 4'teki tablolarda verilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, allopurinol deney için bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, hiçbir bitki kökenli bileşiğin ksantin oksidaz aktivitesini çok fazla etkilemediğini ortaya koymuştur. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılmış allopurinolün doza bağlı bir aktivite gösterdiği ve bu aktivitenin de %38,96'nın üzerine çıkamadığı görülmüştür.

Mohos vd. (2019), yapmış olduğu çalışmada allopurinol için IC_{50} değerini 0,7 μ M olarak bulmuş ve aynı zamanda kuersetin ($IC_{50} = 0,24 \mu$ M) ve bir kuersetin türevi olan quercetin-3'-sülfatın ($IC_{50} = 0,21 \mu$ M) allopurinolden daha inhibitör görevi gösterdiğini bulmuştur.

Kong vd. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, 122 adet geleneksel Çin tıbbında kullanılan bitkiden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonları incelenmiştir. Bu bitkilerden elde edilen 122 metanol ekstraktından 69'unun 100 mg/mL'de ksantin oksidaz inhibitör aktivitesini inhibe ettiği ve 29'unun da %50'den fazla inhibisyona sebep olduğu gösterilmiştir. Metanol ekstraktına eşit miktarda su ekstraktı incelendiğinde, bu ekstraktların 40'inin 100 mg/mL'de ksantin oksidaz inhibitör aktivitesini inhibe ettiği ve 13'ünün de %50'den fazla inhibisyona sahip olduğu tespit edilmiştir. 50 mg/mL'de, 58 metanol ve 24 su ekstraktında inhibe edici aktivite görülmüştür.

Sonuç olarak, gerek saf kuersetin ve allopurinol ile yapılan çalışmalarda, gerekse saflaştırılmamış bitki ekstraktlarında bile ksantin oksidaz inhibitör aktivitesi görülmesine

rağmen bu tez çalışmasında hem allopurinolde, hem de bitki kökenli bileşiklerde kayda değer bir aktivitenin görülmemiş olması ksantin oksidaz inhibisyon analizinde problemlerin olduğunu göstermektedir. Bu problemin sebebi, deneyler için sipariş verilmiş olan hem ksantik oksidaz enziminin hem de allopurinolün soğuk zinciri ile taşınmasında yaşanmış problemten kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.3 Asetilkolinesteraz İnhibisyon Analizi

Asetilkolinesteraz inhibisyon analizi ile ilgili sonuçlar Bölüm 4'teki tablolarda verilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, deney için pozitif kontrol olarak galantamin kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde bu tez çalışmasında denenmiş bitki kökenli bileşiğin asetilkolinesteraz enzimi inhibitörü olarak çalışmadığı görülmüştür. Ancak, ham bitki ekstraktlarının asetilkolinesteraz inhibisyon analizi için kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Crowch ve Okello (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *Acacia nilotica* (Leguminose) ve *Rhamnus prinoides* (Rhamnaceae) bitkilerinden elde edilen ekstraktların anti-asetilkolinesteraz etkilerinin denenmiştir. *A. nilotica* ve *R. prinoides*'in sonikasyonla elde edilmiş su ekstraktları, sırasıyla yaklaşık %56 ve %53 değerinde belirgin bir AChE baskılaması göstermiştir. Her iki bitkiden elde edilmiş ekstraktlar özellikle sınırlı yarışmalı bir inhibisyon kinetiği sergilemiştir. Çalışmada galantamin, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve IC₅₀ değeri 0,4 µg/mL olarak gözlenmiştir. Sonuç olarak *A. nilotica* için IC₅₀ değeri 79 µg/mL ve *R. prinoides* için IC₅₀ değeri ise 201 µg/mL olarak gözlenmiştir (Crowch ve Okello, 2009).

Shahat vd. (2015), *C. colocynthis*, *E. spinosa*, *R. stricta*, *S. hypericifolia* ve *C. hexagyna* gibi beş geleneksel şifalı bitkiden metanol ile elde edilmiş ham ekstraktının asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör potansiyelleri test etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *C. colocynthis* ve *E. spinosa*, 400 µg/mL'de asetilkolinesterazı sırasıyla %83,54 ve %81,92 oranında inhibe ettiği görülmüştür.

Bu çalışmalara göre *A. nilotica*'nın 158 µg/mL (0,158 mg/mL) ve *R. prinoides*'in 402 µg/mL (0,402 mg/mL) konsantrasyonu (Crowch ve Okello, 2009) ile AChE enzimini %100 inhibe ettiği görülürken, *C. colocynthis* ve *E. spinosa*, 400 µg/mL (0,4 mg/mL) konsantrasyonları ile AChE enzimini sırasıyla %83,54 ve %81,92 oranında inhibe ettiği

bulunmuştur. Bu yapılan tez çalışmasında ise 5 mg/mL umbelliferonun AChE enzimini %42,70; 5 mg/mL'sinin %49,30 ve 15 mg/mL'sinin ise %62 inhibisyona sebep olduğu gözlenmiştir. Sonuçlara göre, daha önceki çalışmalarda elde edilen verilere göre ham bitki ekstraktlarının AChE inhibitör potansiyellerinin, umbelliferondan daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür.

Öte yandan, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre galantaminin 10 ve 15 mg/mL konsantrasyonunda %100 etki göstermesi, Crowch ve Okello (2009) elde ettiği sonuca göre 0,402 mg/mL galantaminin %100 inhibisyona sebep olduğu düşünüldüğünde, şaşırtıcı olmamıştır. Burada 5 mg/mL konsantrasyonda %98,30 inhibisyonun görülmüş olması tartışılması gereken bir noktadır. Deneysel hatalardan dolayı bu konsantrasyonda %100 inhibisyon görülmediği muhtemeldir.

5.3.1 Asetilkolinesteraz Kinetik İnhibisyon Deneyi

Rivastigmin, takrin, donepezil ve galantamin gibi AChE inhibitörleri onay alarak Alzheimer hastalığında en yaygın kullanılan kimyasallardır. Ancak, AChE inhibitörlerinin sebep olduğu ciddi bazı problemler ve yüksek toksisite oranı, bu ilaçların en önemli yan etkileridir (Kwon vd., 2010). Etkili AChE inhibitörlerinden galantamin, Alzheimer hastalığı için ciddi anlamda yararlanılan bir ilaçtır (Mollataghi vd., 2012). Galantamin, AChE'nin doğal bir inhibitörüdür ve Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan *Gallanthus* spp adı verilen kardelenden türünden elde edilmiştir. İnsanlarda galantamin kullanılarak yapılan klinik denemelerde galantamin kullanımının ACh ve AChE değerinin eş zamanlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Turi vd., 2014). Yapılan bazı araştırmalar bitki kökenli bileşiklerin Alzheimer hastalığında umut olabileceğini gösterdiği için, bilim insanları bitkilerden elde ettikleri ekstraktların AChE enzim inhibitör potansiyellerini araştırmaktadır.

Wetwitayaklung vd. (2007), *Q. indica* bitkisinin çiçek ekstraktlarının AChE enzim inhibisyonunu ve inhibisyon kinetiğini araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *Q. indica* çiçeğinden metanol ekstraktı inhibitör etkisi göstermiştir. Ekstraktın AChE enzimi inhibisyonu için IC₅₀ değeri doza bağlı olarak 0,77 µg/mL olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada enzimin K_m değeri 0,034 mM, V_{max} ise 0,017 µM/dak/µg protein olarak

bulunmuşken; ekstrakt kullanıldığında K_m değerinin önce azaldığı, ardından %60 - 88,9 arasında arttığı, V_{max} değerinin ise %2,8 - 52,3 arasında azaldığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasında herhangi bir bitki kökenli bileşik kullanılmadığında enzimin K_m değeri 0,8535 mM, V_{max} ise 0,0049 mM/dak olarak bulunmuştur. Ancak galantamin kullanıldığında K_m değeri 4,5787 mM, V_{max} 0,0095 mM/dak; floridzin kullanıldığında K_m değeri 1,3418 mM, V_{max} 0,0134 mM/dak; naringenin kullanıldığında K_m değeri 1,5400 mM, V_{max} 0,1028 mM/dak; kuersetin kullanıldığında K_m değeri 0,6676 mM, V_{max} 0,0078 mM/dak; umbelliferon kullanıldığında K_m değeri 0,6676 mM, V_{max} 0,0029 mM/dak ve sinamik asit kullanıldığında K_m değeri 0,8170 mM, V_{max} 0,0089 mM/dak olarak bulunmuştur. Çizilen Lineweaver - Burk grafiklerinden elde edilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin karışık tip bir inhibisyon gösterirken, bitki kökenli bileşiklerden umbelliferonun rekabetsiz inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur.

5.4 α - Glukozidaz İnhibisyon Analizi

α - Glukozidaz inhibisyon deneyiyle ilgili sonuçlar Bölüm 4'teki tablolarda verilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, deney için pozitif kontrol olarak akarboz kullanılmıştır. Sonuçlara göre akarboz 10 mg/mL konsantrasyon ile doza bağlı bir inhibisyon etkisi göstermektedir.

Öte yandan kuersetin denenen bütün konsantrasyonlarda (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL) %100 inhibisyona sebep olmaktadır.

Konsantrasyonun 5 mg/mL'den 10 mg/mL'ye artışı, floridzin, naringenin ve umbelliferonun α - glukozidaz inhibisyon aktivitesini artırmıştır. Ancak, konsantrasyonlar 10 mg/mL'den 15 mg/mL'ye çıktığında diğer bileşiklerde artış devam ederken, floridzinde bir düşüş söz konusu olmuştur.

Adisakwattana vd. (2009) yaptığı bir çalışmada, sinamik asit türevlerinin α - glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesi karşılaştırılmış ve sinamik asit türevlerinden bazılarının α - glukozidaz enzimi inhibitörü olduğu belirlenmiştir.

Literatürde, umbelliferonun α - glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesi inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Karakaya vd. (2018) yaptıkları çalışmada elde edilen verilere göre umbelliferon, α - glukozidaz enziminin inhibisyonunda IC_{50} değeri 9,32 mg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca, akarbozun 1 mg/mL konsantrasyonda %82,28 inhibisyon sergilediğini gözlemlemişlerdir.

Bu tez çalışmasında, umbelliferonun 5 mg/mL'de %78,23; 10 mg/mL'de %84,53 ve 15 mg/mL'de %91,89 inhibisyona sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar Karakaya vd. (2018) bulduğu sonuçlara oldukça yakındır. Ancak akarbozun etkisi konusunda bu tez çalışmasında bulunan sonuç, Karakaya vd. (2018) bulduğu sonuçlarla tutarsızdır.

Ramu vd. (2014) umbelliferonun α -amilaz üzerindeki inhibisyon aktivitesini test ettiğinde IC_{50} değerini $7,08 \pm 0,17$ μ g/mL olarak bulmuştur. Bu değer hem bu tez çalışmasında hem de Karakaya vd. (2018) tarafından gözlemlenenden oldukça düşüktür.

5.4.1 α - Glukozidaz Kinetik İnhibisyon Analizi

α - Glukozidaz enziminin inhibisyon kinetiği analizinde 11; 5,5; 2,75; 1,375; 0,6875 ve 0,344 mM gibi geniş yelpazede değişen substrat konsantrasyonları için, bitki kökenli bileşiklerden sadece inhibisyon analizinde yüksek sonuç veren kuersetin ve umbelliferon ve pozitif kontrol için Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplanmış ve bu değerlere göre sonuçlar yorumlanmıştır.

Bu tez çalışmasında herhangi bir bitki kökenli bileşik kullanılmadığında enzimin K_m değeri 3,7987 mM, V_{max} ise 0,0155 mM/dak olarak bulunmuştur. Ancak akarboz kullanıldığında K_m değeri 3,0180 mM, V_{max} 0,1013 mM/dak; kuersetin kullanıldığında K_m değeri 1,3502 mM, V_{max} 0,0378 mM/dak ve umbelliferon kullanıldığında K_m değeri 0,6295 mM, V_{max} 0,0095 mM/dak olarak bulunmuştur. Çizilen Lineweaver - Burk grafiklerinden elde edilen sonuçlara göre pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz karışık tip bir inhibisyon gösterirken, bitki kökenli bileşiklerden kuersetin ve umbelliferonun yine karışık tip bir inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur.

Rouzbehan vd. (2017) üç farklı Labiatae türünden elde edilen ekstraktların farklı fraksiyonlarının α - glukozidaz enzim inhibisyonunun kinetiğini karşılaştırmıştır. Sonuçlara göre, akarbozun $7 \pm 0,19$ mg/mL IC_{50} değeri ile enzim inhibisyonunu sağladığı ve *Zataria multiflora*'nın etil alkol fraksiyonunun IC_{50} değerinin $0,35 \pm 0,01$ mg/mL ve *Salvia mirzayanii*'nin petrol eteri fraksiyonunun IC_{50} değerinin $0,4 \pm 0,11$ mg / mL ile güçlü α - glukozidaz inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Ekstraktların tümünün sınırlı yarışmalı - yarışmasız inhibisyon sergilediği bulunmuştur. Burada akarbozun enzimi %100 inhibe ettiği konsantrasyonun, bu tez çalışmasında elde edilen veri ile birbirine çok yakın olduğunu söylemek mümkündür.



6. SONUÇ

Enzim inhibitörü, bir enzime bağlanan ve onun etkinliğini azaltan bir moleküldür. İnhibitörlerin bazıları, enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak substrat ve enzimin uyumluluğunu azaltır. Bu durum da enzim - substrat kompleksi oluşumunun inhibe edilmesine yol açarak, reaksiyonların kataliz edilmesini önler ve bir reaksiyon tarafından oluşturulan ürün miktarını azaltır veya bazen tamamen durdurur. Bazı enzim inhibitörlerinin konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin yavaşladığı ve dolayısıyla da üretilen ürün miktarının inhibitör molekül konsantrasyonu ile ters orantılı olduğu söylenebilir. Bir enzimin aktivitesinin bloke edilmesi bir patojeni öldürebileceğinden veya metabolik bir dengesizliği düzeltebileceğinden, birçok ilaç, şifalı bitki ve bunlardan türetilmiş bileşikler enzim inhibitörleri olarak denenmektedir. Bu yüzden enzim inhibitörlerinin keşfi ve geliştirilmesi biyokimya ve farmakolojide aktif bir araştırma alanı olmuştur. Bir enzim inhibitörünün tıbbi olarak kullanılıp kullanılamayacağına özgüllüğü ve enzimi inhibe etmek için gereken konsantrasyonu gibi değerlere bakılarak karar verilmesi gerekmektedir.

Bu nedenle enzimlere bağlanan tüm moleküllerin inhibitör olduğunu söyleyemek mümkün değildir. Enzim aktivatörleri enzimlere bağlanıp enzimsel aktivitelerini arttırırken, enzim substratları ise bağlandığında enzimin normal katalitik döngüsünde ürünlere dönüştürülür.

Bu çalışmanın bulgularından yola çıkarak bazı sonuçlar ileri sürülebilir. Bu tez çalışmasında denenen bitki kökenli bileşiklerden kuersetin ve umbelliferonun, iyi bilinen bir α - amilaz inhibitörü olan akarboz ile benzer aktivite gösteren iyi α - amilaz inhibitörü potansiyeli olduğu görülmüştür. Bu sonuç, diyabet hastalığını yönetme potansiyeline sahip bazı bileşikleri önermek için son derece önemlidir.

Öte yandan, elde edilen sonuçlar floridzin ve sinnamik asidin α - amilaz için aktivatör olarak davrandığını göstermiştir. Ayrıca naringenin de floridzin ve sinnamik asit kadar iyi olmasa da, α - amilaz için bir aktivatör olarak davrandığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, öncelikli olarak floridzin ve sinnamik asidin, ikinci seviyede naringenin deterjan, ilaç, kâğıt, tekstil, fermantasyon, akaryakıt üretimi ve gıda endüstrileri gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanım potansiyelinin bulunduğunu söylemek mümkündür.

Elde edilen sonuçlar, umbelliferonun test edilen bütün konsantrasyonlarda (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL) AChE inhibitörü olarak çalıştığını göstermektedir. Bu bitki kökenli bileşiğin AChE enzimini %42,7 ile %62 arasında inhibe ettiği testler sonucunda görülmüştür. Ayrıca yapılan kinetik çalışmalar umbelliferonun rekabetsiz inhibisyon gösterdiğini de ortaya koymuştur. Umbelliferon konsantrasyonu artırılarak test edildiğinde, daha yüksek inhibisyon gösterme ihtimali göz önüne alındığında bu bileşiğin AChE inhibitörü olarak kullanılması önerilebilir.

Ayrıca kuersetinin bütün konsantrasyonlarda (5 mg/mL, 10 mg/mL ve 15 mg/mL) α -glukozidaz enzimini %100 inhibe ettiği bulunmuştur. Yapılan kinetik çalışması kuersetinin karışık tip bir inhibisyona sebep olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, umbelliferon da α -glukozidaz enzimini konsantrasyona bağlı olarak %78,23 ile %91,89 inhibe etmiş, kinetik çalışması sonucunda bu inhibisyonun da karışık tip bir inhibisyon olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, kuersetin ve umbelliferonun α -glukozidaz enzimi inhibitörü olarak kullanılması mümkün görünmektedir.

Sonuç olarak, inhibitör etkisi gösteren bitki kökenli bileşikler için daha ileri testler yapılarak, bu bileşiklerin kullanım detayları belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Abu Soud, R. S., Hamdan, L. I., & Afifi, F. U. (2004). Alpha amylase inhibitory activity of some plant extracts with hyporrryemic activity. *Scientia Pharmaceutica*, 72(1), 25-33.
- Adisakwattana, S., Chantarasinlapin, P., Thammarat, H., & Yibchok-Anun, S. (2009). A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal α -glucosidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24(5), 1194-1200.
- Alam, M. A., Subhan, N., Rahman, M. M., Uddin, S. J., Reza, H. M., & Sarker, S. D. (2014). Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5(4), 404-417.
- Ara, K. Z. G., Månberger, A., Gabriško, M., Linares-Pastén, J. A., Jasilionis, A., Friðjónsson, Ó. H., Hreggviðsson, G. Ó., Janeček, Š., & Karlsson, E. N. (2020). Characterization and diversity of the complete set of GH family 3 enzymes from *Rhodothermus marinus* DSM 4253. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.
- Arđan, T., Kovačeva, J., & Čejková, J. (2004). Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. *Acta histochemica*, 106(1), 69-75.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., & Rollinger, J. M. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Azmi, S. M. N., Jamal, P., & Amid, A. (2012). Xanthine oxidase inhibitory activity from potential Malaysian medicinal plant as remedies for gout. *International Food Research Journal*, 19(1), 159-165.
- Balasubramanian, A., & Ponnuraj, K. (2009). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(9), 949-951.
- Bartels, C. F., Zelinski, T., & Lockridge, O. (1993). Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. *American journal of human genetics*, 52(5), 928-936.
- Bennett, T. P., & Frieden, E. (1969). *Modern topics in biochemistry: structure and function of biological molecules*. Macmillan, London

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (5th ed.). W. H. Freeman and Company, New York.
- Bhutkar, M. A., & Bhise, S. B. (2012). In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. *International journal of chemical science*, 10(1), 457-462.
- Birks, J. S. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane database of systematic reviews*, (1), CD005593.
- Bischoff, H. (1995). The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and investigative medicine. Clinical and investigative medicine*, 18(4), 303-311.
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme kinetics: principles and methods*. John Wiley ve Sons.
- Boehlke, C., Zierau, O., & Hannig, C. (2015). Salivary amylase–The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Archives of oral biology*, 60(8), 1162-1176.
- Boumerfeg, S., Baghiani, A., Djarmouni, M., Ameni, D., Adjadj, M., Belkhiri, F., Charef, N., Khennouf, S., & Arrar, L. (2018). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. 3(1), 30-41.
- Budavari, Susan, vd. (1996), *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (12th ed.). Merck.
- Bustanji, Y., Hudaib, M., Tawaha, K., Mohammad, M., Almasri, I., Hamed, S., & Oran, S. (2011). In vitro xanthine oxidase inhibition by selected Jordanian medicinal plants. *The jordan journal of pharmaceutical sciences*, 4(1), 49-56.
- Calixto, J. B. (2019). The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(3), e20190105.
- Castagnetto, J. M., Hennessy, S. W., Roberts, V. A., Getzoff, E. D., Tainer, J. A., & Pique, M. E. (2002). MDB: the metalloprotein database and browser at the Scripps Research Institute. *Nucleic acids research*, 30(1), 379-382.
- Chacko, L. W., & Cerf, J. A. (1960). Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section. *Journal of anatomy*, 94(Pt 1), 74-81.
- Chen, C., Lü, J. M., & Yao, Q. (2016). Hyperuricemia-related diseases and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors: an overview. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 2501-2512.

- Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(8), 1233-1239.
- Core R Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/> Erişim tarihi: 15/10/2020.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Crowch, C. M., & Okello, E. J. (2009). Kinetics of acetylcholinesterase inhibitory activities by aqueous extracts of *Acacia nilotica* (L.) and *Rhamnus prinoides* (LHr.). *African Journal of pharmacy and pharmacology*, 3(10), 469-475.
- Dastjerdi, Z. M., Namjoyan, F., & Azemi, M. E. (2015). Alpha amylase inhibition activity of some plants extract of *Teucrium* species. *European journal of biological sciences*, 7(1), 26-31.
- Dej-Adisai, S., & Pitakbut, T. (2015). Determination of α -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(5), 1679-1683.
- EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mortensen, A., ve Rivière, G. (2019). Safety evaluation of the food enzyme glucan 1, 4- α -glucosidase from *Trichoderma reesei* (strain DP-Nzh63). *EFSA Journal*, 17(10), e05825.
- Elion, G. B. (1978). Allopurinol and other inhibitors of urate synthesis. In *Uric acid* (pp. 485-514). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Elya, B., Basah, K., Mun'im, A., Yulastuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of α -glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2012: 281078.
- Ernst M.E., Clark E.C., & Hawkins D.W. (2008). Gout and Hyperuricemia. In Dippiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*, (pp. 1539-1540). The Mc Graw Hill Medical, Washington.
- Garbe, D. (2012). Cinnamic acid. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley, Weinheim.

- Gholamhoseinian, A., Moradi, M. N., & Sharifi-Far, F. (2009). Screening the methanol extracts of some Iranian plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Research in pharmaceutical sciences*, 4(2), 105-116.
- Gholamhoseinian, A., Sharifi-Far, F., & Rahimi-Naiini, M. (2017). Screening of methanol extracts of sixty plants from Kerman for their potential xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of herbmed pharmacology*, 6(3), 126-129.
- Giacobini, E. (2003). Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 28(3-4), 515-522.
- Giancarlo §, S., Rosa §, L. M., Nadjafi, F., & Francesco, M. (2006). Hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Natural product research*, 20(9), 882-886.
- Hamza, A. A., Ksiksi, T. S., Shamsi, O. A. A., & Balfagh, S. A. (2015). α -glucosidase inhibitory activity of common traditional medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of developing drugs*, 4(5), 144.
- Hanefeld, M., & Schaper, F. (2007). The role of alpha-glucosidase inhibitors (acarbose). In *Pharmacotherapy of diabetes: New developments* (pp. 143-152). Springer, Boston.
- Hawkes, T. R., George, G. N., & Bray, R. C. (1984). The structure of the inhibitory complex of alloxanthine (1 H-pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine-4, 6-diol) with the molybdenum centre of xanthine oxidase from electron-paramagnetic-resonance spectroscopy. *Biochemical journal*, 218(3), 961-968.
- Hendriani, R., Sukandar, E. Y., ve Anggadiredja, K. (2016). In vitro evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of selected medicinal plants. *International journal of pharmaceutical and clinical research*, 8(4), 235-238.
- Henson, M. C., & Chedrese, P. J. (2004). Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Experimental biology and medicine*, 229(5), 383-392.
- Higgins, P., Ferguson, L. D., & Walters, M. R. (2011). Xanthine oxidase inhibition for the treatment of stroke disease: a novel therapeutic approach. *Expert review of cardiovascular therapy*, 9(4), 399-401.
- Hill, R. (1970). Needham J (ed.). *The Chemistry of Life: Eight Lectures on the History of Biochemistry* (pp. 17). Cambridge University Press, London.
- Hille, R., & Massey, V. (1981). Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmacology and therapeutics*, 14(2), 249-263.

- Hille, R., Hall, J., & Basu, P. (2014). The mononuclear molybdenum enzymes. *Chemical reviews*, 114(7), 3963-4038.
- Holum, J. (1968): *Elements of General and Biological Chemistry*, 2nd ed., (pp. 377). Wiley, New York.
- Ibers, J. A., & Holm, R. H. (1980). Modeling coordination sites in metallobiomolecules. *Science*, 209: 223-235.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), 261-264.
- Jeremy M.B., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, 5th edition. W H Freeman, New York.
- Johnson, K. A. (2008). Role of induced fit in enzyme specificity: a molecular forward/reverse switch. *Journal of biological chemistry*, 283(39), 26297-26301.
- Karakaya, S., Gözcü, S., Güvenalp, Z., Özbek, H., Yuca, H., Dursunoğlu, B., ... & Kılıç, C. S. (2018). The α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of the dichloromethane extracts and constituents of *Ferulago bracteata* roots. *Pharmaceutical biology*, 56(1), 18-24.
- Khacheba, I., Djeridane, A., & Yousfi, M. (2014). Twenty traditional Algerian plants used in diabetes therapy as strong inhibitors of α -amylase activity. *International journal of carbohydrate chemistry*, 2014: Article ID 287281.
- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y., & Rhee, H. I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21(6), 756-761.
- Koelle, G. B. (1954). The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *Journal of comparative neurology*, 100(1), 211-235.
- Kong, L. D., Cai, Y., Huang, W. W., Cheng, C. H., & Tan, R. X. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of ethnopharmacology*, 73(1-2), 199-207.
- Kwon, S. H., Lee, H. K., Kim, J. A., Hong, S. I., Kim, H. C., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K., Kim, Y. B., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European journal of pharmacology*, 649(1-3), 210-217.

- Larner, J., Lardy, H., & Myrback, K. (1960). Other glucosidases. In Boyer, P.D. (ed.). *The Enzymes*. 4 (2nd ed.) (pp. 369-378). Academic Press, New York.
- Leal, L. K. A. M., Ferreira, A. A. G., Bezerra, G. A., Matos, F. J. A., & Viana, G. S. B. (2000). Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of ethnopharmacology*, 70(2), 151-159.
- Li, W., Wang, X., Zhang, J., Zhao, X., Wu, Y., Tan, S., Zheng, Q., & Gao, X. (2019). Multivariate analysis illuminates the effects of vacuum drying on the extractable and nonextractable polyphenols profile of loquat fruit. *Journal of food science*, 84(4), 726-737.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the american chemical society*, 56(3), 658-666.
- Lino, C. S., Taveira, M. L., Viana, G. S. B., & Matos, F. J. A. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research: An international journal devoted to medical and scientific research on plants and plant products*, 11(3), 211-215.
- Lopina, O. D. (2017). Enzyme inhibitors and activators. In *Enzyme Inhibitors and Activators*. IntechOpen.
- Mahmood, N. (2016). A review of α -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comparative clinical pathology*, 25(6), 1253-1264.
- Makarova, E., Górnaś, P., Konrade, I., Tirzite, D., Cirule, H., Gulbe, A., Pugajeva, I., Seglina, D., & Dambrova, M. (2015). Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: a preliminary study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 560-568.
- Martinek, R.: (1969) *Practical Clinical Enzymology: The american journal of medical technology*, 31(162): 2005-2007.
- Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., de La Rosa, L. A., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). *Spectrochimica acta part a: molecular and biomolecular spectroscopy*, 206, 437-447.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology*, 41(1), 31-91.

- McCue, P., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin i-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of food biochemistry*, 29(3), 278-294.
- Mohos, V., Pánovics, A., Fliszár-Nyúl, E., Schilli, G., Hetényi, C., Mladěnka, P., Needs, P.W., Kroon, P.A., Pethő, G., & Poór, M. (2019). Inhibitory effects of quercetin and its human and microbial metabolites on xanthine oxidase enzyme. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2681.
- Mollataghi, A., Coudiere, E., Hadi, A. H. A., Mukhtar, M. R., Awang, K., Litaudon, M., & Ata, A. (2012). Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, 83(2), 298-302.
- Morgan, E. J., Stewart, C. P., & Hopkins, F. G. (1922). On the anaerobic and aerobic oxidation of xanthin and hypoxanthin by tissues and by milk. *Proceedings of the royal society of london. series b, containing papers of a biological character*, 94(657), 109-131.
- Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer letters*, 269(2), 315-325.
- Nair, S. S., Kavrekar, V., & Mishra, A. (2013). In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *European journal of experimental biology*, 3(1), 128-132.
- National Research Council. (2003). *Beyond the molecular frontier: challenges for chemistry and chemical engineering*. National Academies Press.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nessa, F., Ismail, Z., & Mohamed, N. (2010). Xanthine oxidase inhibitory activities of extracts and flavonoids of the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharmaceutical biology*, 48(12), 1405-1412.
- Ngoc, T. M., Khoi, N. M., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Van Don, D., Van Luong, H., Son, D. C., & Bae, K. (2012). Xanthine oxidase inhibitory activity of constituents of *Cinnamomum cassia* twigs. *Bioorganic ve medicinal chemistry letters*, 22(14), 4625-4628.
- Nickavar, B., & Amin, G. (2011). Enzyme assay guided isolation of an α -amylase inhibitor flavonoid from *Vaccinium arctostaphylos* leaves. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 10(4), 849-853.

- Niño, J., Hernández, J. A., Correa, Y. M., & Mosquera, O. M. (2006). In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Memórias do instituto oswaldo cruz*, 101(7), 783-785.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., & Fukushima, S. (1983). Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 31(11), 3984-3987.
- Nour, A. H., Khan, M., Sulaiman, A. Z., Batool, T., Nour, A. H., Khan, M. M., & Kormin, F. (2014). In vitro anti-acetylcholinesterase and antioxidant activity of selected Malaysian plants. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 7(3), 93-97.
- Oboh, G., Ademosun, A. O., Ayeni, P. O., Omojokun, O. S., & Bello, F. (2015). Comparative effect of quercetin and rutin on α -amylase, α -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5), 1103-1110.
- Pacher, P. A. L., Nivorozhkin, A., ve Szabó, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological reviews*, 58(1), 87-114.
- Palmer, T. (1995). Kinetics of single-substrate enzyme catalysed reactions. *Understanding enzymes*, 4, 107-127.
- Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C. R. (Eds.). (2016). *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products*. Elsevier.
- Parvathy, U., Jeyakumari, A., Ninan, G., Murthy, L. N., Visnuvinayagam, S., & Ravishankar, C. N. (2018). *Aquatic Enzymes and Their Applications in the Seafood Industry*. Apple Academic Press Inc.
- Peker, S. M., & Helvacı, S. S. (2008). *Solid-liquid two phase flow*. Elsevier.
- Petrus, K., Schwartz, H., & Sontag, G. (2011). Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(8), 2555-2563.
- Qaisar, M. N., Chaudhary, B. A., Sajid, M. U., & Hussain, N. (2014). Evaluation of α -glucosidase inhibitory activity of dichloromethane and methanol extracts of *Croton bonplandianum* Baill. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(11), 1833-1836.

- Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G. D., & Levine, M. J. (1996). Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta crystallographica section d: biological crystallography*, 52(3), 435-446.
- Ramesh, B., & Pugalendi, K. V. (2006). Impact of umbelliferone (7-hydroxycoumarin) on hepatic marker enzymes in streptozotocin diabetic rats. *Indian journal of pharmacology*, 38(3), 209-210.
- Ramsay, R. R., & Tipton, K. F. (2017). Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules*, 22(7), 1192.
- Ramu, R., Shirahatti, P. S., Zameer, F., Ranganatha, L. V., & Prasad, M. N. (2014). Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on α -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. *South African Journal of Botany*, 95, 54-63.
- Reed, M. C., Lieb, A., & Nijhout, H. F. (2010). The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays*, 32(5), 422-429.
- Rengasamy, K. R., Aderogba, M. A., Amoo, S. O., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2013). Potential antiradical and alpha-glucosidase inhibitors from *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food chemistry*, 141(2), 1412-1415.
- Ribeiro, M. H. (2011). Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1883-1895.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
- Rouzbehan, S., Moein, S., Homaei, A., & Moein, M. R. (2017). Kinetics of α -glucosidase inhibition by different fractions of three species of Labiatae extracts: a new diabetes treatment model. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1483-1488.
- Russo, G. L., Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Iannitti, R., & Palumbo, R. (2014). Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. In *Advances in nutrition and cancer* (pp. 185-205). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Saganuwan, A. (2010). Some medicinal plants of Arabian Peninsula. *Journal of medicinal plants research*, 4(9), 767-789.
- Satyanarayana, P., Subrahmanyam, P., Kasai, R., & Tanaka, O. (1985). An apiose-containing coumarin glycoside from *Gmelina arborea* root. *Phytochemistry*, 24(8), 1862-1863.

- Schardinger, F. (1902). Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. Zeitschrift für untersuchung der nahrungs und genußmittel, sowie der gebrauchsggegenstände, 5(22), 1113-1121.
- Scheen, A. J. (1998). Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. Diabetes ve metabolism, 24(4), 311-320.
- Segel, I. H. (1975). Biochemical calculations. Wiley.
- Seltzer, B. (2010). Galantamine-ER for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. Clinical interventions in aging, 5, 1-6.
- Shahat, A. A., Ibrahim, A. Y., Ezzeldin, E., & Alsaied, M. S. (2015). Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of some medicinal plants for treating neuro degenerative disease. African journal of traditional, complementary and alternative medicines, 12(3), 97-103.
- Skibo, E. B. (1986). Noncompetitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogs acting at the functional flavin adenine dinucleotide cofactor. Biochemistry, 25(15), 4189-4194.
- Spotti, M. J., & Campanella, O. H. (2020). Enzymatic Processes of Dietary Fibers. In Science and Technology of Fibers in Food Systems (pp. 301-327). Springer.
- Tainer, J. A., Roberts, V. A., & Getzoff, E. D. (1992). Protein metal-binding sites. Current opinion in biotechnology, 3(4), 378-387.
- Tamil, I. G., Dineshkumar, B., Nandhakumar, M., Senthilkumar, M., & Mitra, A. (2010). In vitro study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, Phyllanthus amarus. Indian journal of pharmacology, 42(5), 280-282.
- Telagari, M., & Hullatti, K. (2015). In-vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity of Adiantum caudatum Linn. and Celosia argentea Linn. extracts and fractions. Indian journal of pharmacology, 47(4), 425-429.
- Thomas, J., & Gillham, B. (1989). Biochemical Basic of Medicine ,2nd ed, Wright.
- Tripathi, A., & Bankaitis, V. A. (2017). Molecular docking: From lock and key to combination lock. Journal of molecular medicine and clinical applications, 2(1), PMC5764188.
- Turi, C. E., Axwik, K. E., Smith, A., Jones, A. M. P., Saxena, P. K., & Murch, S. J. (2014). Galanthamine, an anti-cholinesterase drug, effects plant growth and development in Artemisia tridentata Nutt. via modulation of auxin and neurotransmitter signaling. Plant signaling ve behaviour, 9(4), e28645.

- Umamaheswari, M., AsokKumar, K., Somasundaram, A., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K. (2007). Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of ethnopharmacology*, 109(3), 547-551.
- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of ethnopharmacology*, 124(3), 646-648.
- Unno, T., Sugimoto, A., & Kakuda, T. (2004). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of ethnopharmacology*, 93(2-3), 391-395.
- Wetwitayaklung, P., Limmatvapirat, C., Phaechamud, T., & Keokitichai, S. (2007). Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn. flower extract. *Science, engineering and health studies*, 1(2): 20-28.
- Stuart, M. C., Kouimtzi, M., & Hill, S. R. (Eds.). (2009). WHO model formulary 2008. World Health Organization.



EKLER

EKLER

EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
α - amilaz	1	0,0225	0,022455	0,1823	0,6716
Residuals	42	5,1737	0,123183		

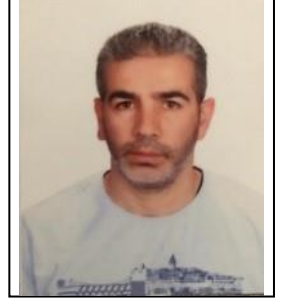
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Ksantin oksidaz	4	0,098	0,02438	0,0665	0,9918
Residuals	165	60,467	0,36647		

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
AChE	2	0,052	0,02608	0,023	0,9773
Residuals	99	112,314	1,13449		

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
α - glukozidaz	2	0,1771	0,08857	0,1408	0,8691
Residuals	45	28,3107	0,62913		

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmed Muftah Omar MENSHAZ
Doğum Yeri ve Yılı : Alkhums, Libya, 1978
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : menshaz@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Alestqlal Lisesi, 1995
Lisans : Al Mergeb Üniversitesi, 2000
Yüksek Lisans : Libya Akademik, Trablus, 2010

Mesleki Deneyim

İş Yeri : Khoms Eğitim Hastanesi, 2001 - 2013
İş Yeri : Yüksek Tıp Meslekleri Enstitüsü, 2010 - 2014
İş Yeri : Al Mergeb Üniversitesi, 2012 - 2013

Yayın Listesi :

Menshaz, A., & Altuner, E.M. (2019) Biochemical calculation methods to determine enzyme activity, EurasianBioChem 2019 Abstract Book, p.459.

Menshaz, A., & Altuner, E.M. (2019) The potential of some plant-derived compounds in inhibition of α -amylase, which is important for diabetic patients, EurasianBioChem 2019 Abstract Book, p.794.

Menshaz, A., & Altuner, E.M. (2019) Biochemical calculation methods to determine enzyme activity, EurasianBioChem 2019 Proceedings Book, p.1405-1409.

Menshaz, A., & Altuner, E.M. (2020). The Potential of Some Plant-Derived Compounds in Inhibition of α -Amylase, Important for Diabetic Patients. Fresenius Environmental Bulletin, 29(9A): 8642-8646.

