

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***SALVIA DORYSTOECHAS* (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) BİTKİ
EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİDİYABETİK VE ANTİ-ALZHEİMER
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Betül TAŞKIRAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***SALVIA DORYSTOECHAS* (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) BİTKİ
EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİDİYABETİK VE ANTİ-ALZHEİMER
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Betül TAŞKIRAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALVIA DORYSTOECHAS (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) BİTKİ
EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİDİYABETİK VE ANTİ-ALZHEİMER
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Betül TAŞKIRAN

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından
FYL-2024-6506 nolu proje ile desteklenmiştir.

MAYIS 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALVIA DORYSTOECHAS* (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) BİTKİ
EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİDİYABETİK VE ANTİ-ALZHEİMER
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Betül TAŞKIRAN

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 08/05/2025 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sevil AKSU (Danışman)

Doç. Dr. Naciye ERKAN

Doç. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

ÖZET

***SALVIA DORYSTOECHAS* (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) BİTKİ EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİDİYABETİK VE ANTİ-ALZHEİMER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Betül TAŞKIRAN

Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevil AKSU

Mayıs 2025; 115 sayfa

Son yıllarda metabolik ve nörodejeneratif hastalıkları hedefleyen bitkisel temelli biyoaktif bileşikler ve özellikle bu bileşikler açısından zengin bitkiler araştırma konuları olarak ön plana çıkmıştır. Bu çalışma, Türkiye'nin güneybatısına özgü endemik bir tür olan *Dorystoechas hastata*'nın (*D. hastata*) metanol ekstraktından elde edilen farklı fraksiyonların fenolik bileşik profillerini detaylı bir şekilde ortaya koymak ve bu fraksiyonların asetilkolinesteraz (AChE), α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkilerini değerlendirmek amacıyla yürütülmüştür. Çalışmada, bitkinin yüksek fenolik içeriğe sahip fraksiyonlarının antidiyabetik ve anti-Alzheimer potansiyeli araştırılarak, *D. hastata*'nın fraksiyonlanması ile enzim inhibisyon kapasitesi arasındaki ilişkinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Çalışmada, toplam fenolik bileşen tayini Folin-Ciocalteu ve toplam flavonoid bileşen tayini $AlCl_3$ yöntemi ile yapılmıştır. İnhibisyon çalışmaları genellikle tercih edilen yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Asetilkolin esteraz enziminin inhibisyonu Ellman, α -amilaz enziminin inhibisyonu nişasta-iyot ve α -glukozidaz enziminin inhibisyonu ise p-nitrofenil- α -D-glukopiranozit yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kinetik analizler için Michaelis-Menten grafiklerinin doğrusallaştırılması ile K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur. Elde edilen veriler istatistiksel olarak ANOVA ile analiz edilmiş ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

Maserasyon yöntemi ile elde edilen metanol ekstraktından metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonları elde edilmiş ve sistematik olarak analiz edilmiştir. UHPLC-MS/MS profillemesi sonucunda özellikle metanol fraksiyonunda karnosik asit (5622,18 $\mu g/g$), karnosol (2790,19 $\mu g/g$) ve rutin (2272,38 $\mu g/g$) en yüksek düzeylerde bulunmuştur. Rutin bileşiği dahil 8 bileşik *D. hastata*'da ilk kez raporlanmış ve bu durum türün kemotaksonomik verilerine önemli bir katkı sağlamıştır. Metanol fraksiyonu toplam fenolik bileşen tayininde $300,93 \pm 7,66$ mg GAE / g KF ile, su fraksiyonu ise toplam flavonoid bileşen tayininde $49,39 \pm 0,22$ mg QE / g KF ile en yüksek değere sahiptir.

Enzim inhibisyon deneyleri güçlü biyolojik aktivite ortaya koymuştur. Asetilkolinesteraz enzimi için metanol ve hekzan fraksiyonları 10 $\mu g/mL$ konsantrasyonda %40'ın üzerinde, kloroform ve su fraksiyonları ise % 25 civarında inhibisyon göstermiştir. Hekzan fraksiyonu α -amilaz enzimi üzerinde %86 inhibisyon (50 $\mu g/mL$ 'de) ile en yüksek aktiviteyi sergilemiştir. α -glukozidaz enziminin inhibisyonunda ise tüm fraksiyonlarda 10 $\mu g/mL$ derişimde %50-%75 arasında inhibisyon gözlenmiştir.

Bu bulgular, *D. hastata*'nın tip 2 diyabet ve Alzheimer hastalığı gibi kronik rahatsızlıklar üzerinde etkili olabilecek biyoaktif bileşikler açısından zengin olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler, bitkinin fonksiyonel gıda takviyeleri veya fitoterapötik ürünlerde değerlendirilme potansiyeline işaret etmektedir. Ancak bu potansiyelin doğrulanabilmesi için ileri düzey toksikolojik, farmakodinamik ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmalar, *D. hastata*'nın etkinliğini daha net ortaya koyacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Asetilkolinesteraz, Anti-diyabetik, Anti-Alzheimer, α -amilaz, α -glukozidaz, *Dorystoechas hastata*, Fenolik Bileşenler

JÜRİ: Doç. Dr. Sevil AKSU

Doç Dr. Naciye ERKAN

Doç. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE *IN VITRO* ANTIDIABETIC AND ANTI-ALZHEIMER EFFECTS OF *SALVIA DORYSTOECHAS* (SYN: *DORYSTOECHAS HASTATA*) PLANT EXTRACT

Betül TAŞKIRAN

MSc Thesis in Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sevil AKSU

May 2025; 115 pages

In recent years, plant-based bioactive compounds targeting metabolic and neurodegenerative diseases—and especially plants rich in such compounds—have come to the forefront of scientific research. This study aimed to comprehensively characterize the phenolic compound profiles of different fractions obtained from the methanol extract of *Dorystoechas hastata* (*D. hastata*), an endemic species native to southwestern Turkey, and to evaluate the *in vitro* inhibitory effects of these fractions on acetylcholinesterase (AChE), α -amylase, and α -glucosidase enzymes. The primary objective was to investigate the antidiabetic and anti-Alzheimer potential of fractions with high phenolic content and to elucidate the relationship between the fractionation of *D. hastata* and its enzyme inhibition capacity.

In this study, total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method, and total flavonoid content was measured using the AlCl₃ method. The inhibition assays were performed using commonly accepted protocols: acetylcholinesterase inhibition was assessed by the Ellman method, α -amylase inhibition by the starch-iodine method, and α -glucosidase inhibition by the p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG) method. Kinetic analyses were conducted by linearizing the Michaelis-Menten plots to calculate K_m and V_{max} values. Data were statistically analyzed using ANOVA, with a significance level set at $p < 0.05$.

Fractions of methanol, hexane, chloroform, and water were obtained from the methanol extract through maceration and systematically analyzed. UHPLC-MS/MS profiling revealed that the methanol fraction was particularly rich in carnosic acid (5622.18 μ g/g), carnosol (2790.19 μ g/g), and rutin (2272.38 μ g/g). Notably, eight compounds, including rutin, were reported for the first time in *D. hastata*, contributing significantly to the chemotaxonomic data of the species. The methanol fraction exhibited the highest total phenolic content at 300.93 ± 7.66 mg GAE/g extract, while the water fraction showed the highest total flavonoid content at 49.39 ± 0.22 mg QE/g extract.

The enzyme inhibition assays demonstrated strong biological activity. For acetylcholinesterase, the methanol and hexane fractions showed inhibition rates exceeding 40% at a concentration of 10 μ g/mL, whereas the chloroform and water fractions exhibited around 25% inhibition. The hexane fraction demonstrated the highest α -amylase inhibition at 86% (50 μ g/mL), while α -glucosidase inhibition ranged between 50% and 75% across all fractions at 10 μ g/mL concentration.

These findings indicate that *D. hastata* is rich in bioactive compounds with potential efficacy against chronic conditions such as type 2 diabetes and Alzheimer's disease. The data suggest that the plant holds promise for development as a functional food supplement or phytotherapeutic product. However, to confirm this potential, further advanced toxicological, pharmacodynamic, and clinical studies are required. Future research will be essential to more clearly establish the efficacy of *D. hastata*.

KEYWORDS: Acetylcholinesterase, Anti-diabetic, Anti-Alzheimer, α -amylase, α -glycosidase, *Dorystoechas hastata*, Phenolic compounds,

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Sevil AKSU

Assoc. Prof. Dr. Naciye ERKAN

Assoc. Prof. Dr. Sevilay CENGİZ ŞAHİN

ÖNSÖZ

Bu tez, endemik bir tür olan *Dorystoechas hastata* bitkisinin ekstraktlarının *in vitro* antidiyabetik ve anti-Alzheimer etkilerinin incelenmesi üzerine yaptığım çalışmanın bir ürünüdür. Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından FYL-2024-6506 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, desteğini ve sabrını esirgemeyen ve belki de en önemlisi bana inanıp özgürce fikirlerimi ve kendimi anlatmama olanak sağlayan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Sevil Aksu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan ekip arkadaşım Ayberk Yeşilada'ya ve fikirleriyle çalışmama farklı bir bakış açısı kazandıran, desteklerini her zaman hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi İlknur Birsen, Dr. Timur Tongur ve Dr. Ceren Özcan Diker'e minnettarlığımı sunarım. Çalışmam boyunca laboratuvar desteği sağlayan ve bana destek olan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sibel Tunç'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin birçok aşamasında beni destekleyen aileme ve dostlarıma da ayrıca teşekkür etmek isterim. Bana bu hayatta pes etmeden yaşamayı öğrettiği için ilham kaynağım olan sevgili annem Canan Gören'e, beni her zaman destekleyen ve bana olan inancını asla kaybetmeyen sevgili kardeşim Beril Taşkiran Çınlar'a son olarak şu an bu dünyada olmayan ama kalbimin en derinlerinde sonsuza kadar yaşayacak olan sevgili kardeşim Beyza Taşkiran'a sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım. Onların sabrı, sevgisi ve cesaretlendirmesi olmadan bu çalışmanın tamamlanması mümkün olmayabilirdi.

Bu çalışmanın, alanına katkı sağlamasını ve gelecekte benzer konularda çalışacak araştırmacılara bir yol göstermesi dileğiyle...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Diyabet Hastalığı.....	4
2.1.1. Tip 2 diyabet.....	4
2.1.2. Karbonhidrat metabolizması ve tip 2 diyabet.....	5
2.1.3. Tip 2 diyabetin tedavisinde mevcut ilaçlar, yan etkileri ve sınırlamaları.....	9
2.1.4. Fitokimyasalların tip 2 diyabet tedavisindeki potansiyelleri.....	11
2.2. Alzheimer Hastalığı.....	13
2.2.1. Asetilkolinin Alzheimer hastalığındaki rolü:	14
2.2.2. Kolinesteraz enzimleri:	14
2.2.3. Alzheimer hastalığının tedavisi için mevcut ilaçlar	15
2.2.4. Tip 2 diyabet ve Alzheimer hastalığının ilişkisi	18
2.2.5. Enzim inhibitörleri olarak fenolik bileşikler ve Alzheimer hastalığındaki rolleri	19
2.5. <i>D. hastata</i> Bitkisi ve Özellikleri.....	21
2.5.1. Morfolojik özellikleri	21
2.5.2. Antioksidan özellikleri ve biyolojik aktivitesi.....	22
2.6. Enzimler ve Enzim Kinetiği	24
2.6.1. Michealis-Menten kinetiği ve Lineweaver-Burk grafiği	26
2.6.2. Enzim inhibisyonu.....	31
3. MATERYAL VE METOT	34
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Yazılım Programları	34
3.2. <i>D. hastata</i> Bitkisinin Toplanması ve Hazırlanması.....	36
3.3. <i>D. hastata</i> Bitkisinden Çeşitli Ekstraktların Eldesi.....	36

3.4. Elde Edilen Fraksiyonların Karakterizasyonu.....	40
3.4.1. UHPLC-MS/MS cihazı ile fenolik bileşen içeriği analizi	40
3.4.2. Toplam fenolik bileşen tayini	41
3.4.3. Toplam flavonoid bileşen tayini	41
3.5. Elde Edilen Fraksiyonların Enzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi.....	42
3.5.1. Asetilkolinesteraz enziminin inhibisyon çalışmaları	42
3.5.2. α -amilaz enziminin inhibisyon çalışmaları.....	44
3.5.3. α -glukozidaz enziminin inhibisyon çalışmaları.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1. <i>D. hastata</i> Fraksiyonlarının Fenolik Bileşen Profili	48
4.1.1. Fraksiyonların UV-Vis Spektrumlarının Değerlendirilmesi	56
4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini	57
4.3. Enzim İnhibisyon Çalışmalarının Genel Stratejisi ve Önemi	66
4.3.1. Asetilkolin Esteraz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları	66
4.3.2 α -amilaz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları	86
4.3.3 α -glukozidaz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları.....	95
5. SONUÇLAR	104
6. KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “***Salvia Dorystoechas* (Syn: *Dorystoechas Hastata*) Bitki Ekstraktlarının *İn Vitro* Antidiyabetik ve Anti-Alzheimer Etkilerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

08/05/2025

Betül TAŞKIRAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

[E]	: Enzim konsantrasyonu
[ES]	: Enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonu
[I]	: İnhibitör konsantrasyonu
IC ₅₀	: % 50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon
[P]	: Ürün konsantrasyonu
[S]	: Substrat konsantrasyonu
V	: Hız
α	: Alfa
μ M	: Mikro molar
mM	: Mili molar
°C	: derece Celcius

Kısaltmalar

ACh	: Asetil kolin
AChE	: Asetilkolin esteraz
AD	: Alzheimer Disease
AH	: Alzheimer hastalığı
ATCI	: Asetiltiyokolin iyodür
BChE	: Bütilkolin esteraz
ChE	: Kolin esteraz
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
<i>D. hastata</i>	: <i>Dorystoechas hastata</i> Boiss. & Heldr. ex Benth.

EC : Enzyme Commission

Eks. : Ekstrakt

FC : Folin-Ciocalteu

GA : Gallik asit

GAE : Gallik asit eşdeğeri

GLP-1 : Glukagon benzeri peptid-1

GLUT4: Glukoz taşıyıcı 4

IDF : International Diabetes Federation

KF : Kuru Fraksiyon

MS :Mass spectrometry

QU : Kuersetin

QE : Kuersetin eşdeğeri

SGLT2: Sodyum glukoz taşıyıcı 2

T2D : Tip 2 Diyabet

U : Ünite

UHPLC: Ultra high performance liquid chromatography

UV-Vis: Ultraviolet-Visible

V_{max} : Maksimum reaksiyon hızı

V₀ : Başlangıç reaksiyon hızı

WHO : World Health Organization

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nişasta hidrolizi ile bağlantılı postprandial hiperglisemide α -amilazın ve α -glukozidazın rolünün şematik gösterimi (Kashtoh ve Beak 2023)	5
Şekil 2.2. (a) İnsan pankreatik α -amilazın yapısının şerit diyagramı. Üç yapısal domain (A, B ve C) gösterilmiştir. (b) İnsan pankreatik α -amilazın kalsiyum bağlanma bölgesi. (c) İnsan pankreatik α -amilazın klorür bağlanma bölgesi (Kashtoh ve Beak 2023).....	7
Şekil 2.3. (a) İnsan pankreatik α -amilaz/akarboz kompleksinin yapısı bir şerit diyagramı olarak gösterilmiştir. (b) İnsan pankreatik α -amilaz/akarboz kompleksinin aktif bölgesi (Kashtoh ve Beak)	8
Şekil 2.4 T2D tedavisi için fitokimyasalların çoklu terapötik hedeflerini gösteren şema (Nie vd. 2020)..	12
Şekil 2.5. Geleneksel kolinesteraz inhibitörlerinin moleküler yapısı	16
Şekil 2.6. Alzheimer hastalığı ile diyabet arasındaki ortak bağlantıları gösteren bir illüstrasyon	18
Şekil 2.7 Başlıca flavonoid gruplarının genel yapısı (Ambriz-Pérez vd. 2016)	19
Şekil 2.8. (a) <i>D. hastata</i> türlerinin çiçek ve yaprak yapısına genel bir bakış. (b) <i>D. hastata</i> türlerine genel bir bakış (Selim ve Mutlu 2016)	21
Şekil 2.9. (a) <i>D. hastata</i> 'nın (Termosos) vejetatif evresinin genel görünümü. (b) <i>D. hastata</i> 'nın spikaları (Işık ve Yücel 2017).	22
Şekil 2.10. Enzimlerin çalışma şekillerinin şematik gösterimi	25
Şekil 2.11. Michealis-Menten denkleminde elde edilen grafik (Nelson ve Cox 2008)	29
Şekil 2.12. Lineweaver-Burk denkleminde elde edilen grafik (Nelson ve Cox 2008)	30
Şekil 2.13. Kompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).....	32
Şekil 2.14. Unkompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).....	32
Şekil 2.15. Nonkompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).....	33
Şekil 3.1. Kurutulmuş <i>D. hastata</i> bitkisinin toprak üstü parçaları	36

Şekil 3.2. <i>D. hastata</i> bitkisinden maserasyon yöntemi ile oda sıcaklığında ham metanol ekstraksiyonuna ait akış şeması.....	37
Şekil 3.3. Elde edilen ekstraktlardan çözücünün uzaklaştırılması için kullanılan evaporatör düzeneği.....	38
Şekil 3.4. Elde edilen ham metanol ekstraktından metanol, n-hekzan, kloroform, etil asetat, n-bütanol ve su fraksiyonlarının elde edilmesine ait akış şeması.....	39
Şekil 3.5. Fenolik bileşen içerik tayinin yapıldığı UHPLC-MS/MS cihazı	40
Şekil 4.1. Ham metanolik ekstrakta n-hekzan ekstraksiyonun uygulanma aşamaları....	49
Şekil 4.2. <i>D. hastata</i> bitkisine ait fenolik bileşenlerin farklı çözücülerdeki dağılımı. ...	53
Şekil 4.3. Fraksiyonlarda tespit edilen 15 adet fenolik bileşiğin molekül yapıları. Kateşin türevleri için temsilen kateşin molekülü çizilmiştir. (ChemDraw Ultra 12.0 ile çizilmiştir.).....	55
Şekil 4.4. Fraksiyonların 200-800 nm aralığındaki UV-Vis spektrumu.....	56
Şekil 4.5. Toplam fenolik bileşen tayininde Folin-Ciocalteu metoduna ait reaksiyon mekanizması (Perez vd. 2023).....	57
Şekil 4.6. Farklı derişimlerdeki gallik asidin 760 nm'deki absorbands değerleri.....	58
Şekil 4.7. 760 nm'de gallik asidin standart kalibrasyon grafiği.	58
Şekil 4.8. Kuersetin-Al(III) kompleksine ait bir illüstrasyon (Shraim vd. 2021).....	59
Şekil 4.9. Toplam flavonoid bileşen tayininde AlCl ₃ metoduna ait reaksiyon mekanizması (Mekonnen ve Desta 2021).....	60
Şekil 4.10. Kuersetinin NaNO ₂ varlığında UV-Vis spektrumu.	61
Şekil 4.11. Kuersetinin NaNO ₂ varlığında Al ³⁺ ile oluşturduğu komplekse ait UV-Vis spektrumu.....	62
Şekil 4.12. Kuersetinin CH ₃ COONa varlığında UV-Vis spektrumu.....	62
Şekil 4.13. Kuersetinin CH ₃ COONa varlığında Al(III) ile oluşturduğu komplekse ait UV-Vis spektrumu.....	63
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki kuersetinin 427 nm'deki absorbands değerleri.	63
Şekil 4.15. Farklı derişimlerdeki kuersetinin 427 nm'deki absorbands değerleri.	64
Şekil 4.16. Asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolini hidrolize etmesi ve tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli TNB oluşturmaya ait reaksiyon mekanizması. (Chemdraw Ultra 12.0 programı ile çizilmiştir) (Kavruk vd. 2013).....	68

Şekil 4.17. Sabit AChE derişiminde (0,25 U/mL) farklı ATCI konsantrasyonlarından elde edilen zamana bağı absorbands grafiğı.....	69
Şekil 4.18. TNB'nin zamana bağı 412 nm'deki absorbands değerlerinin izlenmesine ait grafik I- 420 sn.....	70
Şekil 4.19. TNB'nin zamana bağı 412 nm'deki absorbands değerlerinin izlenmesine ait grafik II- 300 sn.....	70
Şekil 4.20. TNB'nin zamana bağı 412 nm'deki absorbands değerlerinin izlenmesine ait grafik III- 150 sn.....	71
Şekil 4.21. AChE enzimine ait Michealis-Menten grafiğı.....	73
Şekil 4.22. AChE enzimine ait Lineweaver-Burk grafiğı- 6 Nokta.....	73
Şekil 4.23. AChE enzimine ait Hanes-Woolf grafiğı- 6 Nokta.....	74
Şekil 4.24. AChE enzimine ait Eadie-Hofstee grafiğı- 6 Nokta.....	74
Şekil 4.25. AChE enzimine ait Lineweaver-Burk grafiğı- 5 Nokta.....	75
Şekil 4.26. AChE enzimine ait Hanes-Woolf grafiğı- 5 Nokta	75
Şekil 4.27. AChE enzimine ait Eadie-Hofstee grafiğı- 5 Nokta	76
Şekil 4.28 Asetilkolinesteraz enzimi üzerine metanol fraksiyonunun (100 µg/mL) zamana bağı % inhibisyonunu gösteren sütun grafiğı. (n=3 hata çubukları: ±SE).....	78
Şekil 4.29. Farklı derişimlerdeki metanol fraksiyonunun ortamda enzim olmaksızın süreye bağı absorbandsı.....	79
Şekil 4.30. Fraksiyonların farklı derişimlerde AChE enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı sütun grafiğı (n=3 hata çubukları: ±SE)	82
Şekil 4.31 Nişastaya ait 620 nm'de çizilen standart kalibrasyon grafiğı.....	86
Şekil 4.32. Sabit nişasta derişiminde (1,5 mg/mL) farklı α-amilaz derişimlerinden elde edilen enzim aktivite grafiğı.....	88
Şekil 4.33. Sabit nişasta derişiminde (1,5 mg/mL) artan α-amilaz derişiminin enzim aktivitesiyle doğrusal ilişkisini gösteren grafik.....	88
Şekil 4.34 Sabit enzim derişiminde (0,625 U/mL) artan substrat derişiminin enzim aktivitesiyle ilişkisini gösteren grafik.....	89
Şekil 4.35. Sabit enzim derişiminde (0,625 U/mL) artan substrat derişiminin enzim aktivitesiyle doğrusal ilişkisini gösteren grafik.....	89

Şekil 4.36 α -amilaz enzimine ait Michealis-Menten grafiği.....	90
Şekil 4.37. α -amilaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	91
Şekil 4.38. İnhibitörün artan derişiminin nişastaya olan etkisini gösteren grafik. (Metanol fraksiyonu ile çalışılmıştır.) (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE)	91
Şekil 4.39. Metanol ekstraktının α -amilaz enzimi için inhibisyon süresi ve % inhibisyon arasındaki ilişkiyi veren grafik.....	92
Şekil 4.40 Metanol ve hekzan ekstraktlarının artan derişimi ile α -amilaz enziminin % inhibisyonunu gösteren grafik.	93
Şekil 4.41. α -glukozidaz enziminin p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG) substratını hidroliz etme reaksiyonu. (ChemDraw Ultra 12.0 ile çizilmiştir.).....	96
Şekil 4.42. α -glukozidaz enzimi üzerine metanol fraksiyonunun (100 μ g/mL) zamana bağlı % inhibisyonunu gösteren sütun grafiği. (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE).....	97
Şekil 4.43. Fraksiyonların farklı derişimlerde α -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı sütun grafiği (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE)	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. DM tedavisinde kullanılan ilaçların sınıfları, etki mekanizmaları ve yan etkileri (Riyaphan vd. 2021).....	10
Çizelge 2.2. Günümüzde Alzheimer hastalığında sıklıkla kullanılan FDA tarafından onay alan ilaçların etki mekanizmalarını ve yan etkilerini göstermektedir	16
Çizelge 2.3 Enzimlerin uluslararası sınıflandırma sistemi (Nelson ve Cox 2008).....	25
Çizelge 3.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar	34
Çizelge 3.2 Deneylerde kullanılan cihazlar	35
Çizelge 4.1 <i>D. hastata</i> bitkisinin metanolik ekstraksiyonunun metanol, hekzan, kloroform, su fraksiyonlarına ait UHPLC-MS/MS cihazı ile elde edilmiş fenolik bileşen analizin sonuçları.	51
Çizelge 4.2 Fraksiyonların toplam fenolik ve flavonoid bileşen değerleri (n=3 hata çubukları: $\pm$ SD).....	64
Çizelge 4.3 Asetilkolinesteraz (AChE) enzimine ait başlangıç hızlarının (V_0) farklı asetiltiyokolin (ATCI) derişimleri için hesaplanması ve istatistiksel analizleri	71
Çizelge 4.4. AChE enzimine ait farklı grafiklerden elde edilen kinetik parametreler.....	76
Çizelge 4.5. Metanol fraksiyonunun (100 μ g/mL) süreye bağlı % inhibisyon değerler.....	77
Çizelge 4.6. AChE enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	80
Çizelge 4.7. Farklı fraksiyonların aynı derişimde AChE enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	81
Çizelge 4.8. Fraksiyonların farklı derişimlerde AChE enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	84
Çizelge 4.9. Metanol, hekzan, kloroform ve su ekstraktlarının AChE enzimi için % inhibisyon değerleri.....	94
Çizelge 4.10. α -glukozidaz enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	96

Çizelge 4.11. α -glukozidaz enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	98
Çizelge 4.12. Farklı fraksiyonların aynı derişimde α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	99
Çizelge 4.13. Fraksiyonların farklı derişimlerde α -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	101



1. GİRİŞ

Son yıllarda bitkisel temelli yaklaşımlar, farmakolojik ve terapötik araştırmalarda büyük bir ilgi görmektedir. Bu ilgi, özellikle ilaçların yan etkilerinin yarattığı sağlık sorunları ve doğal bileşiklerin çok yönlü biyolojik etkileri nedeniyle artmıştır. Bitki kaynaklı bileşiklerin yan etkileri azaltma potansiyeli sunması ve hastalıkların tedavisinde etkin bir rol oynayabilmesi önemli bir araştırma alanını oluşturur. Bitkisel temelli ilaçlara örnek olarak, galantaminin Alzheimer hastalığı tedavisindeki başarısı ve metformin gibi doğal ürünlerden türetilen ilaçların Tip 2 diyabet yönetimindeki etkinliği, bu alanın önemini pekiştirmektedir. Bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, antikanser, antimikrobiyal, antidiyabetik, antienflamatuvar ve enzim inhibisyonu gibi biyolojik etkileri, araştırmacılar için yeni tedavi hedefleri sunmaktadır.

Diyabet hastalığı (Diabetes Mellitus-DM) 21. yüzyılın en hızlı büyüyen küresel sağlık sorunlarından biridir. Hastalığın küresel prevalansı, dünya nüfusunun yaşlanması, kentleşme oranının artması ve daha hareketsiz yaşam tarzı nedeniyle hızla artmaktadır. DM, dünya çapında önde gelen ilk on ölüm nedeni arasında yer almakta ve yetişkin nüfusta %8,8'lik küresel prevalans oranı ile çok hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Sun vd. 2022).

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) 2021 yılında yayınladığı Diyabet Atlası'nın 10. baskısına göre; 2021 yılında 537 milyon kişinin diyabet hastası olduğu ve bu sayının 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Ayrıca bu raporda 2021 yılında 20-79 yaş arası 6,7 milyondan fazla kişinin diyabete bağlı nedenlerden dolayı öldüğü tahmin edilmektedir. Diyabetle yaşayan çocuk ve ergenlerin (19 yaşına kadar) sayısı her yıl artmakta ve dünya genelinde her yıl milyonlarca çocuk ve ergene tip 1 diyabet tanısı konulmaktadır. IDF Diyabet Atlasında gebelikte hipergliseminin yaklaşık her altı gebelikten birini etkilediğini de ifade etmiştir. Bir başka önemli sorun da, büyük çoğunluğu tip 2 olan teşhis edilmemiş diyabetli kişilerin oranının (%45) sürekli olarak yükselecek olmasıdır (IDF Diyabet Atlası, 2021).

Diyabete bağlı küresel sağlık harcamalarındaki artış ise kayda değer olup, 20-79 yaş arası yetişkinler için 2007 yılında 232 milyar ABD dolarından 2021 yılında 966 milyar ABD dolarına yükselmiştir. Bu, 15 yıl içinde %316'lık bir artışı temsil etmektedir. Diyabete bağlı maliyetlerin daha da artmaya devam etmesi beklenmektedir. IDF, diyabetle ilgili toplam sağlık harcamalarının 2030 yılına kadar 1,03 trilyon ABD dolarına, 2045 yılına kadar ise 1,05 trilyon ABD dolarına ulaşacağını tahmin etmektedir (IDF Diyabet Atlası, 2021). DM'ye dair çizilen bu tablo ve rakamlardaki artış gösteriyor ki, küresel olarak diyabet hastası olan herkese, mümkün olan en kısa zamanda uygun ve etkili tedavinin sağlanması için yeni terapötik stratejiler belirlemek en acil önceliklerden biri olmalıdır.

Alzheimer hastalığı (AH), dünya genelinde demans vakalarının yaklaşık %60-70'ini oluşturan nörodejeneratif bir bozukluktur ve 21. yüzyılın en büyük halk sağlığı sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. AH, özellikle yaşlanan nüfus nedeniyle hızla artmakta ve bireysel, ailevi ve toplumsal düzeyde ciddi ekonomik ve sosyal yükler yaratmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2024 yılı raporuna göre, dünya çapında 55 milyondan fazla insan demansla yaşamakta ve her yıl yaklaşık 10 milyon yeni vaka ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık, yaşlı bireylerde engellilik ve bakıma bağımlılığın en önde gelen nedenlerinden biridir.

Önümüzdeki yıllarda, dünya genelindeki yaşlı nüfus artışı nedeniyle AH'nin prevalansının daha da yükseleceği öngörülmektedir. 2050 yılına kadar, demansla yaşayan kişi sayısının 139 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, Alzheimer hastalığının yalnızca bireysel sağlık üzerinde değil, aynı zamanda bakım verenler ve sağlık sistemleri üzerindeki ekonomik maliyetler açısından da büyük etkileri bulunmaktadır. 2019 yılı itibarıyla, Alzheimer hastalığı ve diğer demansların küresel maliyeti yaklaşık 1.3 trilyon ABD doları olarak tahmin edilmiştir ve bu maliyetin 2030 yılına kadar 2,8 trilyon dolara ulaşması beklenmektedir.

AH'nin neden olduğu bilişsel bozukluklar, genellikle beyindeki asetilkolin düzeylerindeki azalmayla ilişkilidir. Bu durum, nörotransmitter seviyesini artırmayı hedefleyen tedavi yaklaşımlarını ön plana çıkarmaktadır. Ancak mevcut tedavi yöntemleri (örneğin, kolinesteraz inhibitörleri olan donepezil, rivastigmin ve galantamin) sadece semptomatik rahatlama sağlamaktadır ve hastalığın ilerlemesini durduramamaktadır. Ayrıca, bu tedavilerin bulantı, kusma, baş dönmesi gibi yan etkileri, uzun süreli kullanımda hasta uyumunu zorlaştırmaktadır.

Bu bağlamda, bitkisel temelli terapötik yaklaşımlar, Alzheimer hastalığının tedavisinde umut verici bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Özellikle antioksidan özellikleri ile bilinen fenolik bileşikler, oksidatif stresin nörodejeneratif hastalıkların patogeneziindeki rolünü azaltmada kritik bir öneme sahiptir. Ayrıca, asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden doğal ürünler, nörotransmitter seviyelerini artırarak bilişsel fonksiyonların korunmasına yardımcı olabilir.

Bitkisel kaynaklı terapilerde kullanılan doğal ürünlere örnek olarak, galantamin Alzheimer tedavisinde FDA onaylı bir ilaç olarak dikkat çekmektedir. Bunun yanı sıra, *D. hastata* gibi endemik bitkilerin biyoaktif bileşenleri de nörodejeneratif hastalıkların yönetiminde araştırılmaya değer büyük bir potansiyel sunmaktadır. Fenolik içerik açısından zengin olan bu bitkiler hem antioksidan etkileri hem de kolinesteraz enzimini inhibe edici özellikleri ile AH'nin semptomlarının yönetiminde önemli bir rol oynayabilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, T2D ve AH arasında güçlü bir bağlantının olduğunu ortaya koymuştur. Tip 2 diyabetli bireylerde Alzheimer gelişme riskinin sağlıklı bireylere kıyasla %50 ile %100 oranında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu iki hastalık arasındaki ortak patofizyolojik mekanizmalar, Tip 3 diyabet kavramını gündeme getirmiştir. Bu terim, beyin insülin direncini ve insülin sinyal bozukluklarını Alzheimer hastalığının potansiyel bir nedeni olarak tanımlamaktadır.

T2D ve AH arasındaki bu ilişki, tedavi yaklaşımlarını yeniden düşünmeyi gerektirir. Beyindeki insülin sinyalizasyonunu iyileştiren terapötik stratejiler, her iki hastalığın yönetiminde umut verici olabilir. Örneğin; T2D tedavisinde kullanılan GLP-1 reseptör agonistleri insülin duyarlılığını artırarak Alzheimer hastalığında bilişsel gerilemeyi yavaşlatabilir. Oksidatif stres ve inflamasyonu azaltmaya yönelik antioksidan ve anti-inflamatuvar tedaviler, doğal ve farmakolojik yaklaşımlar, her iki hastalığın patogenezi hafifletebilir.

T2D arasındaki bağlantılar, bu iki hastalığın hem ortak metabolik kökenlerini hem de nörolojik sonuçlarını anlamak için yeni bir paradigma sunmaktadır. Tip 3 diyabet olarak nitelendirilen bu ilişki hem metabolik hem de nörodejeneratif bozuklukları hedef alan bütünleşmiş tedavi yaklaşımlarının önemini vurgulamaktadır. Araştırmalar, bitkisel kaynaklı fenolik bileşikler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi biyoaktif bileşiklerin, bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde umut verici bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, bitkisel ürünlerin klinik etkinliğini değerlendirmek için daha fazla çalışma yapılması gereklidir.

Mevcut tedavi seçenekleri genellikle semptomları kontrol etmekte etkili olsa da uzun vadede ciddi yan etkilere yol açabilmektedir. Bu durum, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde daha güvenli, etkili ve sürdürülebilir çözümlere olan ihtiyacı artırmıştır. Bitkisel temelli yaklaşımlar, bu ihtiyaçlara yanıt verme potansiyeline sahiptir. Örneğin, diyabet tedavisinde *Trigonella foenum-graecum* (çemen otu), *Momordica charantia* (kudret narı) gibi bitkiler hipoglisemik etkileri ile bilinmektedir. *Taxus brevifolia*'dan (pasifik porsuk ağacı) elde edilen taksol, modern kanser tedavisinde devrim yaratmıştır. Alzheimer hastalığı için *Ginkgo biloba* ve *Salvia officinalis* (adaçayı) gibi bitkiler, nöroprotektif etkileri ve asetilkolinesteraz enzimini inhibe edici özellikleri ile dikkat çekmektedir.

Türkiye, zengin biyolojik çeşitliliği ve endemik bitki türleri ile önemli bir doğal ilaç kaynağıdır. Endemik bitkiler, sadece belirli bir coğrafi bölgede doğal olarak yetişen ve başka hiçbir yerde bulunmayan türlerdir. Bu tür bitkiler, bulundukları bölgelerin ekolojik, kültürel ve tıbbi mirasının bir parçasıdır. Endemik bitkilerin ortak özelliği, doğal yaşam alanlarında zengin bir kimyasal profile uyum sağlamaları ve bölgesel iklim koşullarına bağlı olarak güçlü biyoaktif bileşikler üretmeleridir.

Dorystoechas hastata Boiss & Heldr. Ex Benth (D. *hastata*), Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde, özellikle Antalya çevresinde yetişen endemik bir bitki türü olup hem yerel hem de ulusal düzeyde ekonomik ve bilimsel bir değere sahiptir. Bu bitkinin kimyasal içerik profiline ve çeşitli biyolojik aktivitelerine yönelik kapsamlı çalışmalar henüz bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile fenolik bileşenler açısından zengin olan D. *hastata* bitkisinin toprak üstü parçaları ile oda sıcaklığında metanolik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve bu ham ekstraktın fraksiyonlanması ile hekzan, su, kloroform ve metanol fraksiyonları elde edilmiştir. Bu şekilde elde edilmiş olan fraksiyonların fenolik bileşen analizinin yapılması ve AChE, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu üzerindeki etkilerinin incelenmesi ile Tip-2 Diyabet ve Alzheimer hastalıklarındaki farmakolojik potansiyelinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde D. *hastata* üzerine yapılan biyolojik aktivite çalışmaları oldukça sınırlıdır ve bu tez çalışması, bitkinin enzimatik etkilerini inceleyerek literatüre önemli bir katkı sunmayı hedeflemektedir. Bu araştırma, yalnızca D. *hastata*'nın farmakolojik potansiyelini ortaya koymakla kalmayıp, aynı zamanda bu bitkinin endemik bir tür olarak yerel ve ulusal düzeyde ekonomik katkılarını da vurgulamaktadır. Çalışmanın sonuçlarının, yeni ilaç tasarımları ve gıda takviyesi ürünlerinin geliştirilmesine ışık tutması beklenmektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Diyabet Hastalığı

Diabetes mellitus, insülin hormonunun yetersiz üretimi, hiç üretilmemesi veya vücudun üretilen insülini etkin bir şekilde kullanamaması sonucu kan şekeri seviyelerinin yükselmesiyle karakterize edilen kronik bir hastalıktır (Eizirik ve ark., 2020). İnsülin, pankreas tarafından salgılanan bir hormondur ve kan dolaşımındaki glikozun hücrelere taşınarak enerjiye dönüştürülmesi ya da depolanmasını sağlar. Bunun yanında, insülin yağ ve protein metabolizmasında da kritik bir role sahiptir.

Hücrelerin insüline yanıt verememesi veya insülin eksikliği, diyabetin klinik bir göstergesi olan yüksek kan şekeri düzeylerine (hiperglisemi) yol açar. Tedavi edilmediği takdirde, bu durum uzun vadede vücutta ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Yüksek kan şekeri, kalp ve damar hastalıkları (KVH), sinir hasarı (nöropati), böbrek rahatsızlıkları (nefropati), uzuv kaybı ve görme kaybı gibi sağlık sorunlarına yol açarak yaşam kalitesini olumsuz etkiler veya yaşamı tehdit edici boyutlara ulaşabilir (Forbes vd. 2013). Bununla birlikte, diyabet uygun bir şekilde yönetildiğinde bu komplikasyonlar önlenabilir ya da geciktirilebilir.

Amerikan Diyabet Derneği'ne göre diyabet; tip 1 diyabet (T1D), tip 2 diyabet (T2D), gestasyonel diyabet (GD) ve diğer spesifik diyabet türleri olmak üzere dört ana sınıfa ayrılır (American Diabetes Association, 2018). Tip 1 diyabet, pankreastaki β -hücrelerinin otoimmün yıkımıyla ortaya çıkar. Tip 2 diyabet, insülin salgısı devam etmesine rağmen hücrelerin insüline karşı direnç geliştirmesi sonucu meydana gelir. Gestasyonel diyabet, genellikle gebeliğin ikinci veya üçüncü trimesterinde ortaya çıkar ve gebelik öncesinde diyabet teşhisi konmamış bireylerde görülür. Diğer spesifik diyabet türleri ise farklı nedenlere bağlı olarak gelişir.

2.1.1. Tip 2 diyabet

Tip 2 diyabet en yaygın diyabet türüdür ve dünya genelindeki tüm diyabetlerin %90'ından fazlasını oluşturur. T2D, kanda yüksek glikoz seviyelerine yol açan karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının bozulması ile karakterizedir.

T2D'nin ana nedeni, iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda gelişen insülin direncine bağlı olarak pankreas β -hücrelerinden insülin salgılanmasının giderek azalmasıdır (DeFronzo vd. 2015). Bu dokularda insülin direnci ve ilerleyici β -hücre yetmezliği neredeyse tüm T2D hastalarında mevcuttur. Bu anormalliklere ek olarak, T2D'de glukoz intoleransından beş patofizyolojik durum daha sorumludur:

-Esterleşmemiş yağ asitlerine kronik maruziyet (lipotoksisite).

-Özellikle glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) salgısının bozulması sonucu inkretin etkinin azalması ve inkretin hormonlarına karşı β -hücresi direnci.

-Pankreasta α -hücreleri tarafından artan glukagon salgısı ve glukagona karşı hepatik glukoz üretiminde artış ve insülin tarafından baskılanmasında bozulma.

-Sodyum-glukoz taşıyıcı-2 (SGLT2) proteini tarafından böbreklerden glukozun geri emiliminin artması.

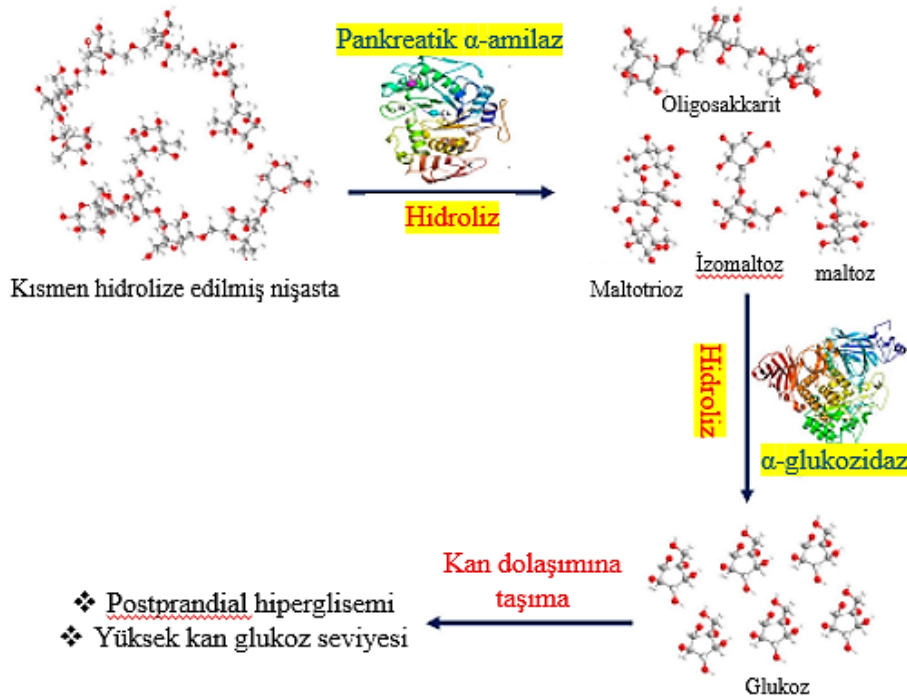
İnsülinin iştah baskılayıcı etkilerine karşı merkezi sinir sistemi direnci ve bozulmuş nörosinaptik hormon salgılanması, altta yatan direnci daha da kötüleştiren iştah düzensizliği ve kilo alımında artış (DeFronzo vd. 2015).

2.1.2. Karbonhidrat metabolizması ve tip 2 diyabet

Yemeklerde en bol bulunan karbonhidrat nişastadır ve iki farklı polisakkaritten oluşur: biri α -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağlarına sahip doğrusal bir yapı olan amiloz, diğeri ise α -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidik bağları içeren dallanmış bir yapı olan amilopektin.

Pankreatik α -amilaz (EC 3.2.1.1), en önemli sindirim enzimi olarak kabul edilir. Bu enzim, kalsiyuma bağımlı bir metaloenzimdir ve katalizör görevi görerek, amiloz, amilopektin, glikojen ve diğer maltodekstrin gibi polisakkarit moleküllerinin α -1,4 glikozidik bağlarının hidrolizini kolaylaştırır. İnsanlarda nişastanın büyük bir kısmının sindiriminden sorumludur (Dhital vd. 2017).

Bir diğer sindirim enzimi olan α -glukozidaz veya maltaz (EC 3.2.1.20), karbonhidrat sindiriminin son aşamasını katalize eder. Bu enzim, 1,4- α bağları üzerinde etkili olarak glukoz oluşumunu sağlar.



Şekil 2.1. Nişasta hidrolizi ile bağlantılı postprandial hiperglisemide α -amilazın ve α -glukozidazın rolünün şematik gösterimi (Kashtoh ve Beak 2023).

Şekil 2.1’de gösterildiği gibi bu süreç, nişastanın ve diğer karbonhidratların enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için α -amilaz ve α -glukozidaz tarafından sindirim

sisteminde yapı taşlarına kadar ayrılmasını sağlar. Diyetle alınan nişasta emilmeden önce, sırasıyla ağız ve ince bağırsakta, tükürük ve pankreatik α -amilazlar tarafından hidrolize edilir. α -amilaz ürünleri, ince bağırsak lümeninde, genellikle α -glukozidazlar olarak bilinen fırça border exo-hidrolazlar, maltaz-glukoamilaz (MGAM; EC 3.2.1.20 ve 3.1.2.3) ve sükras-izomaltaz (SI; EC 3.2.1.48 ve 3.2.1.10) enzimlerinin kombinasyonu tarafından daha fazla hidrolize edilerek glukozu kadar parçalanır.

Bilimsel araştırmalar, insan pankreatik α -amilaz (HPA) aktivitesi ile yemek sonrası glikoz seviyeleri (postprandial glikoz) arasındaki ilişkiyi ortaya koymuş ve Tip 2 diyabet (T2D) yönetiminde yemek sonrası hipergliseminin (PPHG) azaltılmasının önemini vurgulamıştır.

α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibitörlerinin diyetle alınan nişastanın sindirimini ve emilimini engelleme kapasitesi, bu maddelerin "nişasta engelleyiciler" olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, pankreatik bu enzimlerin aktivitelerinin aşırı baskılanması, kolonda sindirilmemiş karbonhidratların bakteriyel fermentasyonuna yol açarak ishal ve gaz gibi yan etkilere neden olabileceğinden, bu inhibitörlerin aktivitesinin ölçülü bir şekilde düzenlenmesi gereklidir (Dhital vd. 2017).

Hali hazırda, karbonhidrat sindirimi ve emilimini sınırlayarak çalışan bazı diyabet ilaçları bulunmaktadır. Bu tür ilaçlar, yemek sonrası glikoz seviyelerini kontrol altına almak için etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

- α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin yapısı ve etki mekanizmaları:

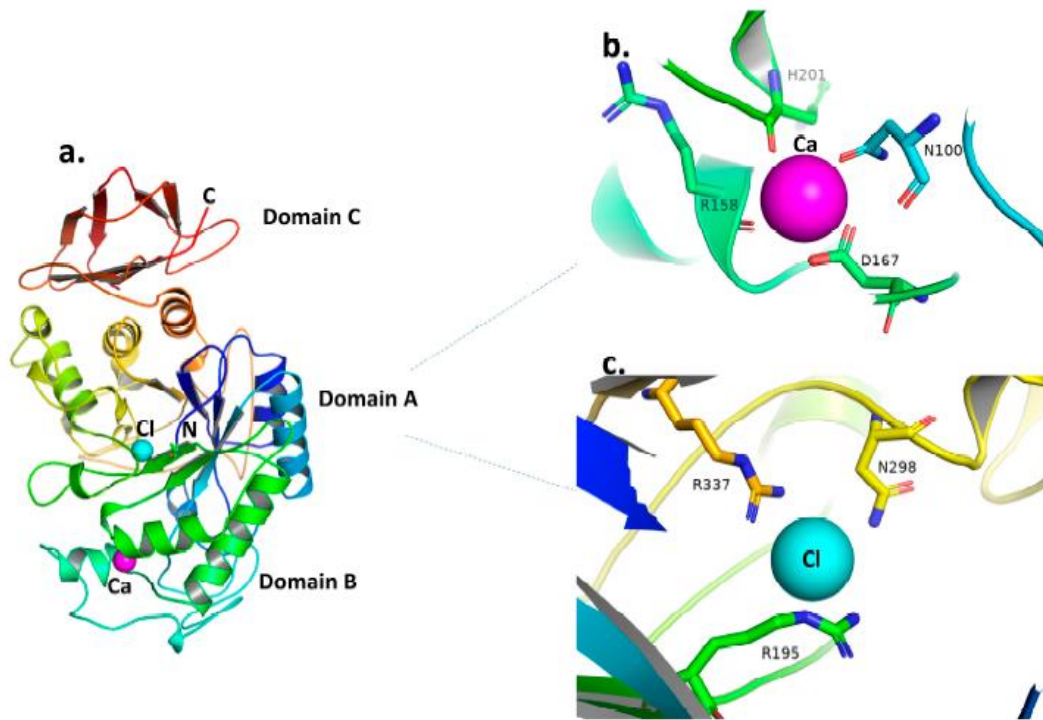
α -amilaz ve α -glukozidaz, karbonhidrat metabolizmasında kritik rol oynayan iki temel enzimdir. Bu enzimler, nişasta ve diğer kompleks karbonhidratları şeker moleküllerine parçalayarak enerji üretimi sürecini başlatır. Özellikle Tip-2 diyabet gibi hastalıkların tedavisinde bu enzimlerin inhibisyonu, glikoz emilimini azaltarak kan şeker seviyelerinin kontrol altına alınmasında kullanılmaktadır.

Yaygın olarak α -amilazlar olarak bilinen α -1,4-Glukan-4 glukanohidrolazlar (EC 3.2.1.1.), glikozit hidrolaz 13 (GH13) ailesine aittir ve tükürük ve pankreas sıvılarında bulunurlar. α -amilaz bir metaloenzimdir ve metaloenzimler aktif bölgelerinde kofaktör olarak bir metal katyonu kullanırlar. Bu enzimler, hidrolitik aktiviteler de dahil olmak üzere çok çeşitli reaksiyonları uyarırlar. α -amilaz, yapısal bütünlük için önemli bir kalsiyum iyonuna ihtiyaç duyan ve klorür iyonları tarafından aktive edilen bir metaloenzimdir.

Bu ailenin genel amino asit dizisi homolojisi düşük olsa da yüksek oranda korunmuş kalıntıların kısa bölgelerine sahiptir ve yapısal araştırmalar, üyelerinin karşılaştırılabilir üç boyutlu yapıları sahip olduğunu göstermiştir. Bu izozimler, kromozom 1 üzerinde bulunan ve çeşitli izozimlerin yalnızca pankreas veya tükürük bezlerinde ifade edileceği şekilde kontrol edilen çok genli bir ailenin üyeleridir. AMY1 ve AMY2 genleri, her biri bir polipeptit zincirinde 496 amino asit içeren hem tükürük hem de pankreatik α -amilaz izozimlerini üretir. Nişasta emilmeden önce, tükürük ve pankreatik α -amilazlar onu ağızda ve ince bağırsakta hidrolize eder (Patel vd. 2017)

Bu izozimler 1-4- α -glikozidik bağların bölünmesi yoluyla karbonhidrat polimerlerini maltoz, dekstrinler ve maltotrioz gibi daha kısa oligomerlere hidrolize eder. Daha küçük oligomerlere (%10-30) erken bir kısmı bölünme tükürük izozimi tarafından sağlanır. Kısmen sindirilmiş sakkaritler bağırsağa girdiğinde, pankreasta üretilen ve lümene salgılanan pankreatik amilaz, bunları daha küçük oligosakkaritlere yoğun bir şekilde hidrolize eder. Daha sonra, fırça sınırında bulunan α -glukozidazlar, α -amilaz ürünlerini ince bağırsağın lümeninde glukoza hidrolize eder. Daha sonra, glukoz taşıyıcıları glukoza bağırsak mukozasından alır ve kan dolaşımına taşır.

α -Amilaz enzimlerinin insan tükürüğü, pankreası ve domuz pankreasından elde edilen 3D yapıları X-ışını kristalografisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin yapıları birbirine oldukça benzerdir.



Şekil 2.2. (a) İnsan pankreatik α -amilazın yapısının şerit diyagramı. Üç yapısal domain (A, B ve C) gösterilmiştir. (b) İnsan pankreatik α -amilazın kalsiyum bağlama bölgesi. (c) İnsan pankreatik α -amilazın klorür bağlama bölgesi (Kashtoh ve Beak 2023).

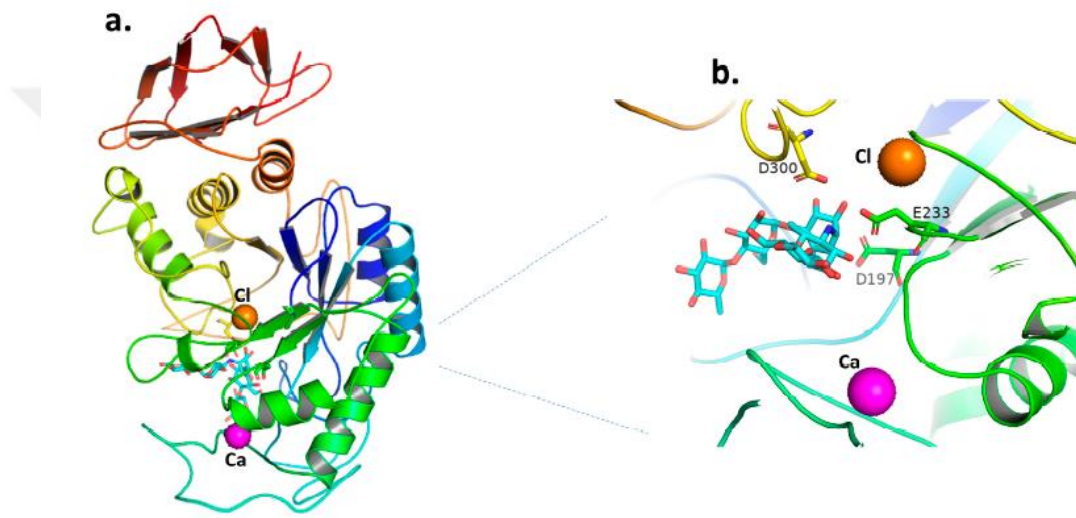
Memelilere ait amilazlar üç yapısal domainden (A, B ve C) oluşur. Bunlardan en büyüğü olan A domaini, standart bir (β - α) 8 varil katlanma yapısı oluşturur (Şekil 2.2a). Bu yapının bir ucu, aktif bölgedeki kritik kalıntılar olan katalitik triadın iki aspartat (D197 ve D300) ve bir glutamat (E233) kalıntısına denk gelir (Şekil 2.2b). Aktif bölge, A ve B domainlerinin karboksil uçlarını ayıran büyük bir yarık içinde bulunur. A domainide ayrıca bağlı bir klorür iyonu bulunur ve bunun amilazı aktive ettiği uzun zamandır bilinmektedir. Bağlı klorür iyonunun, aktif bölgeye yakın bir konumda yer alan R195, N298 ve R337 ile ligand etkileşimleri oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.2c).

B domaini, en küçük domain olup, A domainindeki β -varilleri destekleyen bir kalsiyum bağlama bölgesi oluşturur. B domainindeki bağlı Ca^{2+} iyonu, aktif bölge

alanına da sınır teşkil eder ve muhtemelen aktif bölge protein konfigürasyonunun korunmasında kritik bir rol oynar.

Kalsiyum ile ligand etkileşimleri yapan N100, R158, D167 ve H201 kalıntılarının bu fonksiyona büyük ölçüde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.2b).

C domaini ise anti-paralel β -yapılardan oluşur ve A ve B domainleriyle yalnızca dolaylı bir ilişki içindedir. Özellikle, insan pankreatik α -amilazının N-terminal glutamat kalıntısının post-translasyonel modifikasyonu ile oluşan stabil bir pirolidon türevi, diğer sindirim enzimlerine karşı koruma sağlayabilir. Bununla birlikte, molekülün N-terminalindeki C domaininin, A ve B domainleriyle daha zayıf bir bağa sahip olması nedeniyle katalitik sürece doğrudan katkı sağlaması olası görünmemektedir.



Şekil 2.3. (a) İnsan pankreatik α -amilaz/akarboz kompleksinin yapısı bir şerit diyagram olarak gösterilmiştir. **(b)** İnsan pankreatik α -amilaz/akarboz kompleksinin aktif bölgesi (Kashtoh ve Beak 2023).

Amilazların katalitik süreçleri, kataliz sırasında kovalent bir ara ürünün oluşumunda Asp ve Glu kalıntılarının karboksil gruplarının asit-baz katalizörler ve nükleofilik reaktantlar olarak görev yaptığı iki aşamalı yer değiştirme mekanizmasının mükemmel bir temsilcisidir. Bir Cl^- iyonu, katalitik olarak önemli bir karboksil grubunun protonlanmasını kolaylaştırarak aktivasyonu sağlayabilir.

Amilaz, lineer amiloz ve amilopektin bölümlerini birçok kez hedef alan bir endoenzimdir ve ana ürün olarak maltotrioz ve maltoz (çok az miktarda glikoz üretimi) ortaya çıkarır. Kinetik çalışmalara göre, domuz pankreatik enziminin aktif bölgesi beş glikoz molekülüne kadar bağlayabilir; bu da glikoz moleküllerinin bağlanabileceği beş alt bölge olduğunu göstermektedir. Birçok üç boyutlu yapı, birden fazla bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir, ancak akarboz ile komplekslenmiş domuz pankreatik amilaz yapısı altıncı bir bölge ortaya koymuştur (Patel vd. 2017).

Akarboz, vogliboz ve miglitol gibi α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri, yemek sonrası hiperglisemiyi (PPHG) azaltmayı hedefleyen en yaygın kullanılan antidiyabetik

ilaçlardır. Bununla birlikte, bu inhibitörler tedavide kullanıldığında ishal, şişkinlik ve gaz gibi gastrointestinal yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, PPHG yönetimi için yeni α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörlerinin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir.

α -amilazın yapısına dair bu tür bilgiler, α -amilazın çeşitli inhibitörlerle etkileşimini daha iyi anlamak ve daha az yan etkiye sahip antidiyabetik ilaçlar geliştirmek için kullanılabilir.

2.1.3. Tip 2 diyabetin tedavisinde mevcut ilaçlar, yan etkileri ve sınırlamaları

Tip 2 diyabet hastalığı, tedavi edilmesi zor olan, karmaşık ve ilerleyici bir bozukluktur. Hastaların çoğu tanı anında daha çok diyabet sonucu oluşmuş olan ikincil bozukluklar nedeniyle doktora başvurur. Bu hastalar genelde antidiyabetik ilaçlar kullanmadan normal glisemiye ulaşamaz veya sürdüremez durumdadırlar. Hastaların büyük bir kısmı glisemik kontrolü sağlamak için uzun süreli monoterapi veya oral antidiyabetik tedavi ile insülin tedavisi almak zorundadır.

Antidiyabetik ilaçların ortak amacı yüksek kan şekeri oranını düşürmektir. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan oral antidiyabetik ilaçlar etki biçimlerine göre aşağıdaki gibi gruplandırılır (Tripathi, 2019).

a) İnsülin sekresyonunu arttıranlar (sülfonilüreler, meglitinidler ve DPP-4 inhibitörleri): Bu grupta yer alan ilaçlardan DPP-4 inhibitörleri, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinden salgılanan GLP-1'in parçalanmasını engelleyerek GLP-1 seviyelerini artırır. GLP-1, pankreastaki beta hücrelerinden insülin salınımını artırır. Sülfonilüreler ise yine bu hücrelerdeki ATP duyarlı potasyum kanallarını kapatır ve depo insülinin serbest kalmasını sağlar. Böylece kan şekeri seviyesi düşer.

b) İnsüline duyarlılığı değiştirenler (insülin direncini azaltmaya yönelik olanlar) (biguanidler ve tiazolidindionlar): Bu gruptaki ilaçlar, genellikle insülin reseptörlerine etki ederek hücrelerin insüline karşı duyarlılığını arttırmayı hedefler. Örneğin; biguanidler grubundan olan ve dünyada en sık kullanılan diyabet ilacı olan metformin, karaciğerde glukoz üretimini azaltarak kan şekeri seviyelerini düşürür. Ayrıca periferik dokularda insülin duyarlılığını arttırarak glukozun hücrelere girişini arttırır.

c) Glukozun intestinal emilim oranını azaltanlar (α -glukozidaz ve α -amilaz inhibitörleri): İnsanlarda α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri, diyetle alınan nişasta ve şekerlerin glukozu parçalanmasında rol oynar. Yaygın olarak α -amilazlar olarak bilinen α -1,4-Glukan-4 glukanohidrolazlar (EC 3.2.1.1.), glikozit hidrolaz (GH) ailesi 13'e aittir ve tükürük ve pankreas sıvılarında bulunurlar. Diyetle alınan nişasta emilmeden önce, sırasıyla ağız ve ince bağırsakta, tükürük ve pankreatik α -amilazlar tarafından hidrolize edilir. α -amilaz ürünleri, ince bağırsak lümeninde, genellikle α -glukozidazlar olarak bilinen fırça border exo-hidrolazlar, maltaz-glukoamilaz (MGAM; EC 3.2.1.20 ve 3.1.2.3) ve sükraz-izomaltaz (SI; EC 3.2.1.48 ve 3.2.1.10) enzimlerinin kombinasyonu tarafından daha fazla hidrolize edilerek glukozu kadar parçalanır. Bu grupta yer alan ilaçlar bu enzimleri inhibe ederek karbonhidrat sindirimini inhibe ederler ve kan şekerinin yükselmesini engellerler. En çok bilinenleri akarboz ve miglitoldür.

d) Glukozun idrardan atılmasını sağlayanlar (SGLT2 inhibitörler): Bu ilaçlar böbreklerdeki SGLT-2 proteinlerini inhibe ederek glukozun idrardan atılmasını artırarak kan şekeri seviyelerini düşürürken insüline duyarlılığı da arttırırlar.

Çizelge 2.1. DM tedavisinde kullanılan ilaçların sınıfları, etki mekanizmaları ve yan etkileri (Riyaphan vd., 2021).

Sınıf	Etki Mekanizması	İsim	Yan Etkiler
α-glukozidaz ve α-amilaz inhibitörleri	Karbonhidrat sindirimini geciktirir, genel sindirim süresini uzatır ve glikoz seviyesi emilimini azaltır	Akarboz ve miglitol	Hafif mide ağrısı, gaz veya şişkinlik, kabızlık, ishal
Sodyum glukoz bağlantılı taşıyıcı-2 (SGLT-2) inhibitörleri	Glikozun geri emilimini engellemek ve idrarda salgılanmasını kolaylaştırmak için proksimal kıvrımlı tübülde (PCT) SGLT2'yi inhibe eder.	Dapagliflozin, Canagliflozin, Sitagliptin	Mide rahatsızlığı, ishal, baş ağrısı
Dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) inhibitörleri	Periferik plazmada DPP-4 aktivitesini bloke ederek periferik dolaşımda inkretin hormonu glukagon benzeri peptid (GLP)-1'i inhibe eder.	Sülfonilüreler, Tiyazolidindionlar, Biguanidler	Açlık, kilo alımı, cilt reaksiyonu
Peroksizom proliferatör aktive reseptör-γ (PPARγ)	Enerji homeostazının düzenlenmesiyle ilişkili olarak trigliserit seviyesini azaltır	PPAR γ agonisti, RXR (Retinoid X reseptörleri) agonistleri (rexinidler)	Kilo alımı, sıvı retansiyonu, kalp yetmezliği riskinde artış
İnsülin reseptör kinaz (IRK)	Tetramerik bir glikoprotein olan insülin reseptörü, hedef hücrelerdeki spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak fosforilasyon üzerinde insülin etkisi yaratır	IRS (1, 2, 3, 4), SHC (Src homology 2 domain containing)	Güvenli veya etkili tedavi olup olmadığı belirsiz
İnsülin reseptör substratı (IRS)	Aktive edilmiş hücre yüzeyinin aşağı akışında önemli bir sinyal aracı olarak işlev gören protein sitoplazmik adaptör	IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü 1), IGF-2, İnsülin	Hipotansiyon, sıvı retansiyonu, ortostatik
Glikoz taşıyıcı 4 (GLUT4)	Kasta eksprese edilir ve kas dokusu içinde insülinle uyarılan glukoz alımını düzenler	MET2 (Miyosit artırıcı faktör-2), MyoD miyojenik protein	Büyük ölçüde bilinmemektedir.
G proteinine bağlı reseptörler (GPCR)	İnsülin sekresyonunu ve sekresyonu kontrol eden insülinle ilişkili β -hücre GPCR'lerinin sayısını inhibe etmek için β -hücreleriyle çalışır	İnsülin sekretagogları, GLP-1 (glukagon benzeri peptid-1), GIP (glukoza bağımlı insülinotropik peptid)	Kusma, ishal, gastrointestinal problemler

Çizelge 2.1’de bu sınıflardaki ilaçlara ait etki mekanizmaları, örnek ilaç isimleri ve ilaçların yan etkileri ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu ilaçlar ya monoterapi olarak ya da iki veya daha fazla olarak kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Zamanla hastanın ilaçlara verdiği yanıtı bağlı olarak tedavi şekli değiştirilebilmektedir (Krentz ve Bailey, 2005).

Yukarıda sayılan ilaç türleri içerisinde postprandial hiperglisemiye en etkili şekilde düşürebilen ilaçlar α -glukozidaz sınıfı enzimlerin inhibisyonunu sağlayanlar olduğu bilinmektedir. Bu ilaçlar karbonhidratların sindirimini azaltarak çok daha az monosakkaritin emilim ile kana geçmesini sağlamaktadırlar.

Bugüne kadar mevcut T2D ilaçları çoğunlukla sindirim bozukluğu, kalp yetmezliği riskinde artış, idrar yollarında enfeksiyon ve ayrıca sinirler, böbrekler ve gözlerde hasar gibi çeşitli yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, batı ülkelerinde ve Japonya’da T2D tedavisinde en çok reçete edilen oral terapötik ajan olan metformin iştah kaybı, ishal, bulantı, kusma, şişkinlik ve karın ağrısı gibi gastrointestinal yan etkilere neden olabilmektedir (Hotta vd. 2019).

Geleneksel oral antidiyabetik formülasyonların bazı sınırlamaları vardır. Piyasada bulunan antidiyabetik ilaçlar arasında çözünürlük ve geçirgenlik sorunları oldukça yaygındır, özellikle sülfonilüreler düşük biyoyararlanım göstermektedir. Bu da sık dozaj rejimini gerektirmektedir. Bu durum hastalarda uyum sağlayamama ve doz atlama olasılığının artmasına neden olmaktadır. Öte yandan, T2D için genellikle ilk basamak ilaç olarak reçete edilen metformin, yüksek oranda çözünür ancak biyoyararlanımı düşüktür. Diğer antidiyabetik ilaçlarda görülen sınırlamalar arasında tiyazolidindionlarda görülen kısa yarılanma ömrü (3-5 saat) yer alır ve bu da biyoyararlanımın zayıflamasına ve terapötik etkinliğin azalmasına neden olmaktadır (Bhikshapathi vd., 2013).

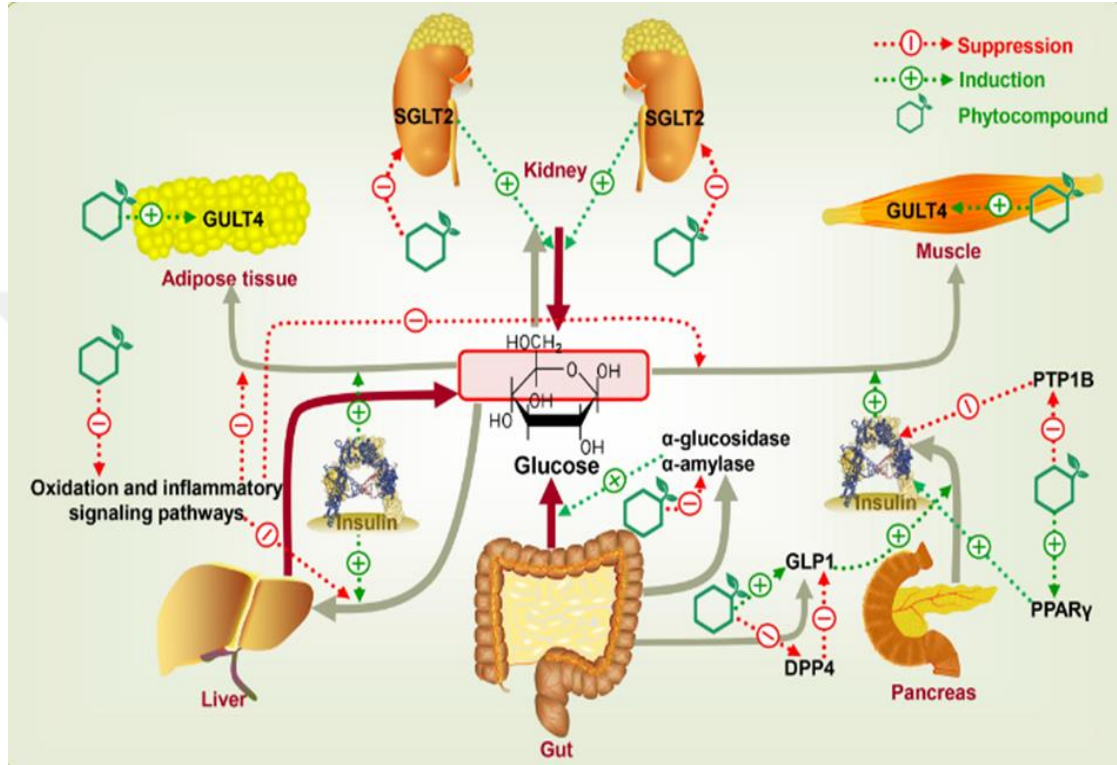
Yukarıda belirtilen endişelerin yanı sıra, iyi bilinen ve yaygın olarak reçete edilen bazı antidiyabetik ilaçlar da ciddi hipoglisemi ve kilo alımına neden olmaktadır. Dahası, böyle bir tedavi yaklaşımı glukoz homeostazının mükemmel şekilde korunmasına izin vermez ve zamanla kardiyovasküler komplikasyonlar ortaya çıkabilir.

2.1.4. Fitokimyasalların tip 2 diyabet tedavisindeki potansiyelleri

Bitkiler her zaman ilaçlar için iyi bir kaynak olmuştur. Fitokimyasallar, bitkilerden izole edilebilen doğal bileşenlerdir ve giderek derinleşen araştırmalarla daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. Günümüzde, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilaçların yaklaşık %50’si bitki kaynaklı bileşikler veya bunların türevleridir. Örneğin, biguanidin tipi bir antidiyabetik ilaç olan metformin, *Galega officinalis* L.’den (*Fabaceae* familyası) (Munhoz ve Frode 2018) izole edilen galeginden geliştirilmiştir ve şu anda T2D tedavisinde birinci basamak oral ilaç olarak kullanılmaktadır (Apostolova vd., 2020). Geleneksel tedavilerle karşılaştırıldığında, doğal bitki kaynaklı ajanlar daha az yan etkiye sahip, daha uygun fiyatlı ve erişilebilir olduğundan, farmasötik araştırmalar giderek bitkilerden yeni antidiyabetik ilaçlar keşfetmeye yönelmektedir. Yaklaşık 1200 bitkinin antidiyabetik bileşikler içerdiği iddia edilmiş ve 400’den fazla bitki ve bunların biyoaktif bileşenleri T2D tedavisi için bilimsel olarak değerlendirilmiştir. Fitokimyasal bazlı tedaviler, T2D’yi tedavi etmek için yeni

yaklaşımlar olarak veya mevcut monoterapileri desteklemek için yardımcı maddeler olarak geliştirilebilir (Alam vd., 2018).

Flavonoidler, polifenoller, terpenoidler, alkaloidler, saponinler, kinonlar, polisakkaritler vb. bileşikler dahil olmak üzere tıbbi bitkilerden elde edilen çok çeşitli fitokimyasallar, antidiyabetik etkileri açısından yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Bacanlı vd. 2019)



Şekil 2.4. T2D tedavisi için fitokimyasalların çoklu terapötik hedeflerini gösteren şema (Nie vd. 2020).

- Karbonhidrat Sindiriminin ve Glikoz Emiliminin Azaltılması: Polifenoller, terpenoidler ve tanenler, başlıca karbonhidrat hidrolize edici sindirim enzimleri olan α -glukozidaz ve α -amilaz üzerinde inhibitör etkisi gösterirler. α -Amilaz nişasta gibi makromolekülleri hidrolize ederek oligoglukanlara dönüştürür. İnce bağırsağın fırça sınırında bu maddeler α -glukozidaz tarafından emilebilir glukozla dönüştürülür ve daha sonra kan dolaşımına geçerler. Bu koşullar altında fitokimyasallar α -amilaz ve α -glukozidazı inhibe ederek yemek sonrası kan glukoz seviyelerini önemli ölçüde azaltabilirler (Tundis vd., 2010).

SGLT2 proteini üzerine inhibitör aktivitesine sahip florizin, klorojenik asit, quercetin, kaempferol, kurarinone ve sophoraflavanone, idrarda glukoz atılımını teşvik eder ve böbrekte glukozun yeniden emilimini baskırlar. Glukozun atılımı, plazma seviyelerinde glikozun azalmasına yol açarak glisemik parametreleri iyileştirir (Blaschek, 2017; Moradi-Marjaneh vd., 2019).

- Glikoz Alımının ve Metabolizmasının Teşviki: Patolojik olarak, diyabetik hastalarda glukoz taşıyıcı protein 4 (GLUT4) ekspresyonu daha düşüktür. GLUT4 ekspresyonundaki azalma, glikoz alım sisteminde bozukluğa ve sonuçta da insülin direncine neden olur (Gannon vd., 2015; Hussain vd., 2020).

Flavonoidler ve polifenolik bileşikler ise GLUT4 ekspresyonunun yanı sıra glukoz alımını da güçlendirebilir. Örneğin, berberin ve vanilik asit GLUT4 translokasyonunu adenozin 5'-monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) bağımlı yol üzerinden, resveratrol ise fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-protein kinaz B (Akt) yolu üzerinden iyileştirir (Sayem vd., 2018).

- İnsülin Etkisinin ve Duyarlılığının İyileştirilmesi: Bir inkretin hormon olan GLP1, yemek sonrası insülin salgılanmasını uyarabilir. Dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) GLP1'i parçalayan bir enzimdir. Yapılan çalışmalar, klorojenik asit, epikateşin ve siringik asit gibi polifenollerin bağırsak L-hücrelerinden GLP1 salgılanmasını uyarabileceğini, DPP4'ü inhibe ederek GLP1'in yarı ömrünü artırdığını, β -hücrelerinden insülin salgılanmasını uyarabileceğini, insüline karşı periferik direnci azaltabileceğini ve sonuçta GLP1-insülin ekseninin genel etkilerini iyileştirebileceğini göstermektedir (Dominguez Avila vd., 2017; Duarte vd., 2020).

- Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkiler: Oksidasyon ve inflamasyon oluşumuna yanıtların, T2D'nin ortaya çıkması veya ilişkili komplikasyonlar ile ilgili nedensel bir ilişki kurulabilir. Oksidasyonun ve inflamasyonun artması insülin direncine yol açabilir veya hiperglisemik durum tarafından oksidasyon ve inflamasyon artabilir (Halim ve Halim, 2019).

Literatürde, klorojenik asit, ellagik asit, kurkumin, resveratrol, apigenin, kuersetin, naringenin, kateşin gibi moleküllerin oksidasyonun ve/veya inflamasyonun sinyal yollarını baskılayarak insülin direncini ve diyabetik komplikasyonları iyileştiren fitokimyasallar olduğu gösterilmiştir (Gothai vd., 2016; Ahangarpour vd., 2019).

Fitokimyasalların sadece diyabeti tedavi etmekle kalmayıp, aynı zamanda T2D ile ilişkili komplikasyon riskini de azaltması onları gelecekteki ilaç öncül adayları olarak çok önemli bir konuma getirir.

2.2. Alzheimer Hastalığı

Dünya çapında etkili olan bir diğer hastalık ise Alzheimer hastalığıdır (AD), bu hastalık adını Alman psikiyatrist Alois Alzheimer'den alan ilerleyici bir nörodejeneratif beyin hastalığıdır. AD, bunamanın en yaygın nedenidir, tüm bunama vakalarının %80'ini oluşturur ve dünya çapında önemli bir ölüm nedenidir. 65 yaş üstü yaşlılarda sık görülür ve tüm dünyada heterojen dağılım gösterir, en yaygın olarak Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da görülürken, Sahra Altı Afrika bölgesinde daha az görülür.

Hastaların davranışsal ve sosyal yeteneklerindeki bozulmalar ve dalgalanmalar ile hafıza kaybı gibi farklı semptomlarla karakterizedir. Kişilerin günlük rutinlerini gerçekleştirmede ciddi sorunlara sebebiyet verir. Dünya çapında 44 milyondan fazla kişiyi etkileyen bu hastalığın yaşlı nüfus artışıyla en sık görülen nörodejeneratif hastalıklarından biri olması beklenmektedir.

Hem çevresel hem de genetik faktörler AD patogenezi konusunda önemli rol oynamaktadır. AD'nin nasıl oluştuğuyla ilgili farklı hipotezler vardır. Bunlar; amiloid-beta oligomer hipotezi, kolinerjik hipotez, tau hipotezi ve oksidatif stres ile iltihaplanma kaynaklı oluşabileceği hipotezleridir. Bu görüşler AD'ye karşı yeni terapötik yaklaşımları belirlemeyi amaçlamaktadır.

2.2.1. Asetilkolinin Alzheimer hastalığındaki rolü:

Multifaktöriyel bir hastalık olan Alzheimer hastalığının etyopatogenezinin altında yatan moleküler mekanizmayı anlamak için ilk ortaya atılan hipotez kolinerjik hipotezdir. Bu hipotez AD'nin sebebinin kritik bir nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) eksikliği olduğunu öne sürmektedir. Bu düşünce, ACh'deki azalmaları yansıtan kolinerjik sistemdeki işlev bozukluğu ile bilişsel kapasite, öğrenme ve bellekteki düşüş arasında güçlü bir bağlantı tespit eden prelinik ve klinik çalışmalardan elde edilen birçok veri ile desteklenmiştir.

ACh, mitokondri tarafından sağlanan kolin ve asetil-koenzim A'dan (asetil-CoA) sentezlenir. Bu süreç sitoplazmadaki kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından katalize edilir. Sentezden sonra ACh, veziküler ACh taşıyıcı (VACHT) tarafından kolinerjik nöronların sinaptik veziküllerine taşınır, periferik ve merkezi sinir sistemi (MSS) boyunca dağılır. ACh sentezindeki hız sınırlayıcı adımlar, kolin ve asetil-CoA'nın mevcudiyetidir. Neredeyse tüm beyin yapıları ve bölgeleri, internöronların bir parçası olarak ya da beyin çeşitli bölümlerine yayılan ve onları birbirine bağlayan nöron projeksiyonları olarak kolinerjik nöronlar tarafından innerve edilir. Özellikle, en yüksek kolinerjik innervasyona sahip beyin bölümleri omurilik, arka beyin, medial habenula, mezopontin bölge, bazal ön beyin, striatum, koku alma tüberküülü ve Cajella kompleksi adalarıdır (Armstrong vd. 1983; Lucas Meunier vd. 2003).

Beyindeki kolinerjik nöronların bolluğu göz önüne alındığında, kolinerjik sistemin dikkat, öğrenme, hafıza, stres tepkisi, uyanıklık ve uyku, duygusal tepkiler ve davranış gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynaması şaşırtıcı değildir. Bu nedenle kolinerjik nöronlardaki hasar AD'nin gelişiminde önemli bir role sahiptir.

Kolinerjik hipotezin arkasındaki ana fikir, düşük beyin ACh seviyesinin AChE'nin artmış aktivitesinin bir sonucu olduğudur. Çeşitli bileşikler beyindeki ACh seviyesini etkileyebilir. Örneğin, ACh antagonisti skopolamin ile tedavi, kolinerjik aktivitenin bloke edilmesiyle, genç deneklerde yaşlılarda gözlenene benzer bir bellek azalmasına yol açacağını göstermiştir (Craig vd. 2011). Buna karşılık, AChE inhibitör (AChEI) uygulamasının AD'li insanlarda dikkat, biliş, hafıza ve entelektüel yetenekleri iyileştirdiği gösterilmiştir. (Singh vd. 2013).

2.2.2. Kolinesteraz enzimleri:

Kolin esteraz (ChE), kolin esterlerini parçalayan ve her yerde bulunan bir serin hidrolaz sınıfıdır. İki farklı ChE formu vardır (iki farklı gen tarafından kodlanır). Bunlar, nörotransmitter asetilkolini hidrolize eden asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesterazdır (BuChE). Her iki enzimatik form da benzer katalitik aktiviteler sergilese de iyonik veya hidrofobik etkileşimler açısından farklılık gösterirler (Lionetto

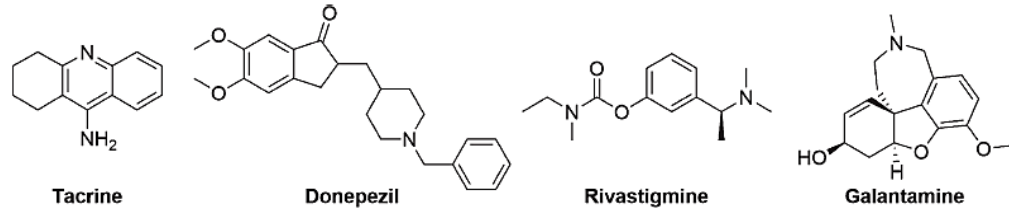
vd. 2013). AChE yapısal olarak bir aktif katalitik bölge (CAS), periferik anyonik bölge (PAS) ve geçit bölgesinden (gorge region) oluşur. CAS bölgesine dar bir geçit bölgesinden geçilerek ulaşılır ve yaklaşık 5 Å genişliğinde ve 20Å derinliğindedir. Geçit bölgesinin yüzeyi, yaklaşık % 70'ini oluşturan korunmuş, aromatik amino asit yan grupları ile kaplıdır. CAS bölgesi, hidroliz reaksiyonunun gerçekleştiği yerdir ve bir katalitik üçlü (H440-E327-S200) ve kritik aromatik kalıntılar, W84 ve F330 içerir. PAS bölgesi, geçidin girişine yakın bir yerde bulunur ve bu bölgenin temel bileşenleri olan Y70, Y121 ve W279 aromatik kalıntılarından oluşur. PAS Bölgesi ise, ACh'nin iletilmesi ve geçitteki substrat özgüllüğünün kontrol edilmesi için gerekli olan düşük afiniteli bir bağlanma bölgesidir (Silman ve Sussman 2008; Xu vd. 2017; Eckroat vd. 2020).

Spesifik olmayan kolinesteraz olarak da bilinen BuChE, süksinilkolin gibi daha büyük substratları ve özellikle bütirikolini hidrolize edebilir. AChE'a benzer şekilde, BuChE yapısal olarak altı aromatik amino asit kalıntısı, bir CAS bölgesi ve bir PAS bölgesi ile kaplı 20 Å bir geçitten oluşur; katalitik triad geçidin alt kısmında bulunur ve S226, H466 ve E353'ten oluşur. AChE'nin aksine, BuChE'de kolin bağlama bölgesi Ala (A328) ile değiştirilmiş ve periferik bölge sadece iki kalıntıya (D70 ve Y332) indirgenmiştir. Bu değişiklikler muhtemelen BuChE'nin substrat karakteristiğinin aktivasyonundan sorumludur. AChE'nin açıl cebinde, Phe kalıntıları daha az hacimli alifatik kalıntılarla (L286 ve V288) değiştirilmiştir; BuChE'de, kesenin hacmini artırarak daha büyük substratların barındırılmasına izin verilir (Darvesh vd. 2003; Johnson ve Moore 2012; Li vd. 2017).

2.2.3. Alzheimer hastalığının tedavisi için mevcut ilaçlar

Günümüzde Alzheimer hastalığının kesin nedeni ve patogenezi hala bilinmemektedir. Tarihsel olarak, Alzheimer tipi demansın tedavisi için onaylanan ilk reçeteli ilaç takrin olmuştur. Yüksek hepatotoksitesi nedeniyle takrin artık çoğu ülkede kullanım dışıdır. Şu anda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından AD semptomlarını tedavi etmek için onaylanmış beş reçeteli ilaç bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan üçü aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmış ve molekül yapıları şekil 2.5'te verilmiştir (Samuel ve Davis 1997).

Donepezil: 1990'larda Alzheimer tipi hafif ve orta dereceli demansın palyatif tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Donepezil, FDA onaylı ikinci kolinesteraz inhibitörü olarak piyasaya sürülmüştür (Aricept-Eisai/Pfizer). İlk formülasyonlar, 5 ve 10 mg, 1996 yılında hafif ve orta şiddette AD için FDA onayı almış ve 2010 yılında orta ve şiddetli AD tedavisi için 23 mg'lık bir doz onay almıştır. Günümüzde hastalığın tüm evrelerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Şu anda dünyanın birçok yerinde kullanım dışı olan ağır hepatotoksik takrinin aksine (Cavalli vd. 2008), donepezil bu toksik potansiyele sahip değildir. Günde bir kez uygulanabilir ve karaciğer fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesini gerektirmez, bu nedenle ilk basamak tedavi olarak doğru seçimi temsil eder. IC₅₀ değeri 23,1 nM olan güçlü bir AChE inhibitörü olan donepezil, ACh seviyesini doğrudan etkiler (Bolognesi vd. 2007). Donepezil ile tedavi üzerine kolinerjik sinapslarda ACh konsantrasyonundaki artış birincil etkisidir (Cummings vd. 2016; Shahrivar-Gargari vd. 2021).



Şekil 2.5. Geleneksel kolinesteraz inhibitörlerinin moleküler yapısı

Çizelge 2.2. Günümüzde Alzheimer hastalığında sıklıkla kullanılan FDA tarafından onay alan ilaçların etki mekanizmalarını ve yan etkilerini göstermektedir.

İlaç Grubu	İlaç Adı/Firma	Etki Mekanizması	Yan Etkileri	Günlük Alım Dozu	Kaynak
Kolinergik ilaçlar	Donepezil (Aricept)	AChE inhibitörü; asetilkolini yıkan enzimi bloke eder ve sinaptik boşlukta nörotransmisyonu artırır.	Bulantı, ishal, uykusuzluk, baş dönmesi	5-10 mg/gün	Cummings vd. 2016
	Rivastigmin (Exelon)	AChE ve BChE inhibitörü; asetilkolin yıkımını azaltır ve belleği destekler.	Bulantı, kusma, ishal, anoreksiya	1,5-6 mg/gün (formülasyona göre değişiklik gösterebilir 8-24 mg/gün (formülasyona göre değişiklik gösterebilir))	Tseng vd. 2012
	Galantamin (Razadyne)	Asetilkolin seviyelerini artırır; nikotinik reseptörleri aktive eder.	Bulantı, baş dönmesi, uykusuzluk		Prvulavic vd. 2010
Glutamat sistemine dayalı ilaçlar	Memantin (Namenda)	NMDA reseptör antagonistidir; aşırı glutamat aktivitesini engeller.	Baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, kabızlık	5-20 mg/gün	Emre vd. 2010
Kombine ilaç sistemleri	Donepezil + Memantin (Namzaric)	AChE inhibitörü ve NMDA reseptör antagonistinin birleşimidir	Bulantı, baş ağrısı, yorgunluk	28 mg + 10 mg/gün	Ghosh vd. 2020
Yeni araştırma aşamasındaki ilaçlar	Aducanumab (Aduhelm)	Beta-amiloid plaklarını hedef alır ve birikimini azaltır.	Baş ağrısı, beyin ödemi, düşme	10 mg/kg (ayda bir)	Sevigny vd. 2016
	Lecanemab (Leqembi)	Amiloid beta proteinlerini azaltmayı amaçlar.	Baş ağrısı, beyin ödemi	10 mg/kg (ayda bir)	Van Dyck vd. 2023

Galantamin: Galantamin, ilk olarak 2000 yılında Razadyne® (Janssen Pharmaceuticals) ticari adı altında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanıtılmıştır. Sadece oral formlarda mevcuttur ve önerilen başlangıç dozu 8 mg/gün olup, 4 hafta sonra 16 mg/gün idame dozuna çıkmaktadır. Galantamin hafif ve orta dereceli Alzheimer hastalığında bilişsel gerilemeyi tedavi etmek için kullanılır. Alkaloid norbelladinden türetilmiş bir benzazepindir. Galantamin, *Amaryllidaceae* adlı bir bitki ailesinde, ağırlıklı olarak galanthus cinsine ait türlerde bulunur. Sentetik olarak da üretilbilmektedir. Galantamin parasempatomimetik ve geri dönüşümlü bir kolinesteraz inhibitörüdür (Hussain vd. 2018). Donepezil gibi, demasin altında yatan sürecin seyrini değiştirmede çok az etkisi olan sadece hastalık modifiye edici bir ajandır. Diğer AChE inhibitörleri gibi galantamin de terapötik etkisini ağırlıklı olarak kolinerjik fonksiyonu artırarak gösterir. Ancak, diğer ilaçlardan farklı olarak galantamin, hem zayıf bir AChE inhibitörü ($IC_{50} = 2 \mu M$) hem de nAChR'nin allosterik güçlendirici bir ligandı olarak hareket etmesi ve bu reseptörlerdeki agonistlerin (asetilkolin gibi) etkisini güçlendirebilmesi nedeniyle iki işlevli bir anti-AD ilacı olarak işlev görür (Prvulavic 2010).

Rivastigmin: Oral rivastigmin (Exelon-Novartis Pharmaceuticals Corporation) 2000 yılında hafif-orta şiddette Alzheimer demansının tedavisi için ve daha sonra (2006) hafif-orta şiddette Parkinson demansının tedavisi için 6-12 mg/gün optimal terapötik doz ile FDA onayı almıştır. O dönemde sadece kapsül (1,5 mg, 3 mg, 4,5 mg ve 6 mg dozlarında) ve oral solüsyon (2 mg/mL) olarak mevcuttu. Transdermal yama formülasyonu 2007 yılında piyasaya sürülmüştür. Rivastigmin hem bütirilkolinesterazı hem de asetilkolin esterazı inhibe eden bir kolinesteraz inhibitörüdür (Kandiah vd. 2017). Rivastigminin antikolinesteraz aktivitesi, periferik dokulardakilere kıyasla beyin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz için nispeten spesifiktir. Bir karbamat türevi olarak, yapısal olarak disostigmin ile ilişkilidir ancak donepezil ve takrin ile ilişkili değildir. Donepezil ve galantamine benzer şekilde, rivastigminin kesin mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Yine de rivastigminin geri dönüşümlü olarak beyindeki asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesterazı etkisiz hale getirerek asetilkolinin hidrolizini önler ve böylece kolinerjik sinapslardaki konsantrasyonunun artmasına neden olur. IC_{50} değeri $3 \mu M$ olan rivastigmin, AChE'nin donepezilden belirgin şekilde daha zayıf bir inhibitörüdür (Tseng vd. 2012).

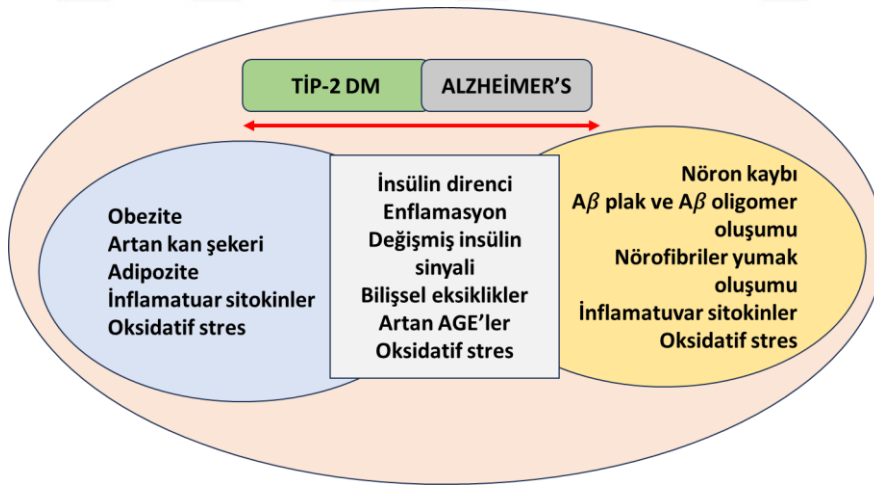
İlaçların yan etkileri: Donepezil, galantamin ve rivastigminin yan etki profili diğer AChE inhibitörlerinin etkilerine çok benzemekte olup, gastrointestinal semptomlar en dikkat çekici ve en sık gözlenen semptomlardır: bulantı, kusma, iştah kaybı ve bağırsak hareketlerinin sıklığında artış. Bu ilaçların kalp hastalığı, kardiyak iletim bozuklukları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, astım, ciddi kardiyak aritmiler ve sinüs sendromu olan kişilerde dikkatli kullanılması gerektiğini gösteren çalışmalar da vardır (Hansen vd. 2008). Ayrıca, peptik ülser hastalığı olan kişiler, gastrointestinal kanama riskinin artması nedeniyle bu ilaçları dikkatli kullanılmalıdır. Bu yaygın etkilerin yanı sıra, donepezilin yan etkileri arasında uyku güçlüğü ve kas krampları bulunmaktadır. Daha ciddi olarak, rivastigmin kullanımı, FDA Advers Olay Raporlama Sistemi veri tabanında, diğer asetilkolinesteraz inhibe edici ilaçlar olan donepezil ve galantamine kıyasla daha yüksek sıklıkta advers olay olarak ölüm raporları ile ilişkilendirilmiştir.

2.2.4. Tip 2 diyabet ve Alzheimer hastalığının ilişkisi

T2D esas olarak periferik bir hastalık ve AD ise merkezi sinir sisteminin bir bozukluğu olmasına rağmen, her ikisi de kronik ve karmaşık durumlar oluşturmasının yanı sıra uzun prodromal fazlar gibi bazı ortak özelliklere sahiptir (Kubis-Kubiak vd. 2019). Ayrıca, her ikisinde de hastalığın ilerlemesinde kronik oksidatif stres ve inflamasyonun rol oynadığı gösterilmiştir. Yaşın yanı sıra, diğer yaygın risk faktörleri arasında kötü beslenme alışkanlıkları, obezite, kronik stres, genetik profil ve hareketsiz yaşam tarzı yer almaktadır (Chen vd. 2019).

DM vakaları ile AD ve vasküler demans da dâhil olmak üzere tüm demans türlerinin riskinin 89.708 DM'li hasta üzerinde yapılan 28 prospektif gözlemsel çalışmaya dayanan bir meta-analizi, diyabetik hastalarda tüm demans türlerinin riskinde %73 ve AD riskinde %56'lık bir artış olduğunu bildirmiştir (Gudala vd. 2013). Bu veriler, DM'nin AD'ye daha fazla yatkınlığa neden olduğunu ve bunun da nörometabolik bir bozukluk olan tip 3 diyabet (T3D) olarak yeni bir terimin ortaya çıkmasına neden olduğunu göstermektedir (Rorbach-Dolata ve Piwowar 2019).

AD ve T2D arasındaki bağlantıyı açıklamak için bazı hipotezler vardır. Bunlar; nöronal hücrelerde glutamat kaynaklı eksitotoksisteye yol açan hiperglisemi; beyinde amiloid- β birikimine, tau fosforilasyonuna, oksidatif strese, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumuna ve apoptoza katkıda bulunan insülin direncidir. Ancak, AD ve T2D arasındaki bağlantının mekanizmasına dair net bir açıklama halen bulunmamaktadır.



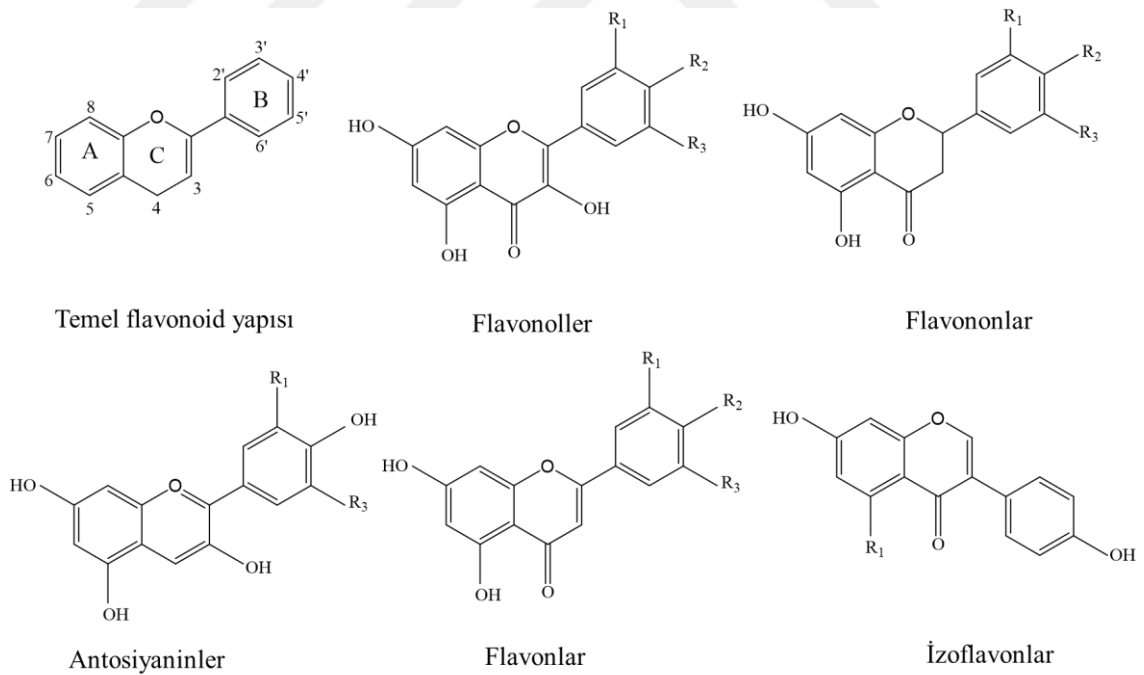
Şekil 2.6. Alzheimer hastalığı ile diyabet arasındaki ortak bağlantıları gösteren bir illüstrasyon.

Beynin serebellum, serebral korteks, hipotalamus, olfaktör ampul ve hipokampus gibi bilişsel alanlarında insülin reseptörleri bulunmaktadır. AD'de insülin sinyalizasyonunda ve beyin glukoz kullanımında bozulmaların yanı sıra beyin omurilik sıvısında (BOS) azalmış insülin seviyeleri, BOS'ta azalmış insülin/plazma insülin oranı, azalmış insülin reseptörü ekspresyonu ve artmış açlık plazma insülin seviyesi vardır.

Bozulmuş insülin sinyalizasyonundan AD patogenezi, tau hiperfosforilasyonu, A β metabolizması ve asetilkolin sinyalizasyonu etkilenir. İnsülin, asetilkolin üretiminden sorumlu bir enzim olan kolin-asetiltransferaz ekspresyonunu artırır. Bu nedenle, AD beyinlerinde düşük insülin seviyeleri veya şiddetli insülin direnci düşük asetilkolin seviyelerine yol açabilir (Alanazi vd. 2023).

2.2.5. Enzim inhibitörleri olarak fenolik bileşikler ve Alzheimer hastalığındaki rolleri

Fenolik bileşikler, bitki metabolizması sırasında oluşan heterojen bir ikincil metabolit grubudur. Sağlığa yararlı etkileri nedeniyle fenolik bileşikler, özellikle gıdalardaki varlıkları ile çeşitli uzmanların ilgisini çekmiştir. Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubunun bağlı olduğu en az bir aromatik halka içerir ve aromatik veya alifatik olabilirler. Flavonoidler ve flavonoid olmayanlar iki tür fenolik bileşiktir (Bravo, L. 1998). Flavonoidler, heterosiklik bir piran halkası (C halkası) aracılığıyla bağlanan iki benzen halkasından (A ve B halkaları) oluşan on beş karbonlu bir iskelete (C6-C3-C6) dayanmaktadır. Flavonoidler, hidrojenasyon durumuna ve heterosiklik ikame kimliklerine bağlı olarak flavonoller, flavononlar, antosiyaninler, flavonlar ve izoflavonlar olarak ayrılabilirler (Şekil 2.7). Bu bitki ikincil metabolitleri, genellikle çeşitli glikozitler şeklinde bulunabilir ve ultraviyole (UV) radyasyona ve fitopatojenlere karşı koruma, nodülasyon sırasında sinyalizasyon, oksin taşınması ve tozlayıcıları çekmek için çiçeklerin renklendirilmesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik işlevlerden sorumludur.



Şekil 2.7. Başlıca flavonoid gruplarının genel yapısı (Ambriz-Pérez vd. 2016).

Reçeteli ilaçlar genellikle hastalık mekanizmalarında yer alan bileşiklerin inhibitörleri olarak hareket etmek üzere tasarlanmıştır. Tasarlanmış enzim inhibitörlerinin neden olduğu zararlı yan etkilere ilişkin endişeler, doğal kaynaklardan elde edilen yeni etkili ve koruyucu inhibitörlerin araştırılmasına yol açmıştır.

Bitkisel fenolik bileşikler, biyolojik etkilerinin muazzam kapsamı nedeniyle en yaygın olarak araştırılan gruplar arasındadır. Fenolik bileşiklerin ağır insan hastalıklarında rol oynadığı bilinen çeşitli proteinlere karşı kimyasal inhibitör kapasitelerini incelemek için geniş kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Makarewicz vd. 2021). Enzimler, çeşitli fizyolojik yolaklarda önemli ölçüde yer aldıkları için insan hastalıklarının tedavisinde ilaç bazlı inhibitörlerin belirlenmesi için belki de en iyi odak noktasıdır (Rich 2005).

Temel insan gıda kaynaklarında bulunan belirli bileşiklerin inhibitör olarak kullanımı incelenmiş ve bunların hipertansiyon, metabolik sorunlar, enfeksiyonlar ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir. Hepatotoksisite, gastrointestinal sorunlar ve ishal ile ilişkili olanlar da dahil olmak üzere çeşitli semptomların tedavisinde tanımlanmış inhibitörleri içeren çeşitli gıda kaynakları rapor edilmiştir (Ambriz-Pérez vd. 2016).

Bhandari ve arkadaşları, *in vitro* bir model kullanarak *Bergenia ciliata*'nın antidiyabetik etkinliğini incelemişlerdir. Etil asetatta çözünür *B. ciliata* ekstraktında bulunan aktif kimyasallar (–)-3-*O*-galloil epikateşin ve (–)-3-*O*-galloil kateşinin, domuz pankreatik amilaz ve sıçan bağırsak maltaz aktivitesinin doz bağımlı bir şekilde önemli ölçüde inhibisyonundan sorumlu olduğu bulunmuştur (53). Genellikle inhibitör gücünü ölçmek için kullanılan yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değeri, enzim aktivitesini %50 oranında inhibe etmek için gerekli olan inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanır. (–)-3-*O*-gallil epikateşin için IC₅₀ değerleri sıçan bağırsak maltaz ve domuz pankreatik α-amilaz için sırasıyla 334 ve 739 µM ve (–)-3-*O*-galloil kateşin için sırasıyla 150 ve 401 µM idi (Bhandari vd. 2008). Bu bileşiklerin α-glukozidaz ve α-amilaza karşı *in vivo* ve *in vitro* inhibitör aktiviteleri, T2D'nin tedavisi için bir potansiyele sahip olduklarını göstermiştir.

Glukozidaz aktivitesini inhibe ederek glukoz emilimini geciktirmek, T2D'nin önlenmesi için potansiyel bir tedavi seçeneğidir. *Terminalia chebula* meyveleri, memeli glukozidazlarına karşı önemli enzimatik inhibitör aktivitesi gösteren fenolik bileşikler içerir, bu da T2D'li hastalarda ciddi yan etkilere neden olmadan kan glukoz seviyelerinin yönetimine katkıda bulunabilir. Kuersetin, kaempferol, luteolin, kuersetagetin ve skutellarein, insan α-amilaz inhibitörleri olarak işlev gören doğal olarak oluşan flavonoidlerdir, bu da onları nişasta sindirimini sınırlamak için ilgi çekici adaylar haline getirir (Ali Asgar 2013).

Flavonoidler (örn. antosiyaninler, epigallokateşin gallat, kuersetin, naringin, rutin ve kaempferol), flavonoid olmayan polifenoller (örn. resveratrol, kurkumin, tanenler ve lignanlar), bitki meyveleri, sebzeler ve diğer ürünleri içeren doğal sağlık maddeleri (örn. sarımsak, yeşil çay, frenk üzümü, üvez, yaban mersini, çilek, kıvılcık, zeytinyağı, susam yağı ve havuç) birincil farmakolojik tedaviye daha güvenli bir alternatif olabilir.

Flavonoidler insan diyetinin temel bileşenleridir ve oksidatif stresin neden olduğu pankreatik beta hücre fonksiyonunun bozulmasını geciktirerek DM yönetimine katkıda bulunabilirler. T2D ile ilişkili komplikasyonları önlemek ve iyileştirmek için gıda takviyesi olarak önerilmektedirler (Blahova vd. 2021).

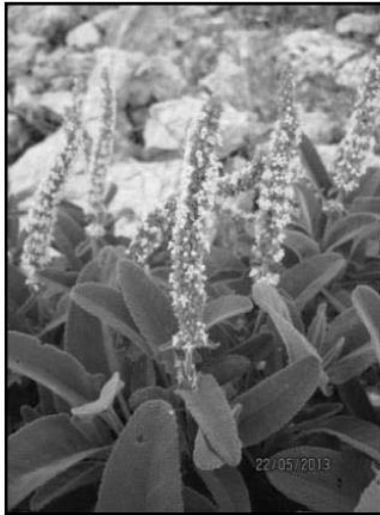
Polifenollerin önemli hücresel olaylar üzerinde etkili olduğu mekanizmalar bugüne kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Fenolik bileşikler, AChE'nin aktif bölgesini oluşturan amino asit kalıntıları ile hidrojen bağları, hidrofobik ve π - π etkileşimleri oluşturmaktadırlar. (Katalinić vd. 2010). Fenolik bileşikteki çoklu hidroksil gruplarının, artan bağlanma kapasitesi nedeniyle AChE'nin inhibisyonunu arttırdığı düşünülmektedir (Falé vd. 2012). Bu inhibitör faaliyetler, çoğu fenolik bileşikle ilişkili fonksiyonel potansiyeli açıklar, ancak hepsi aynı mekanizma ile hareket etmez (Ademosun vd. 2016).

2.5. *D. hastata* Bitkisi ve Özellikleri

2.5.1. Morfolojik özellikleri

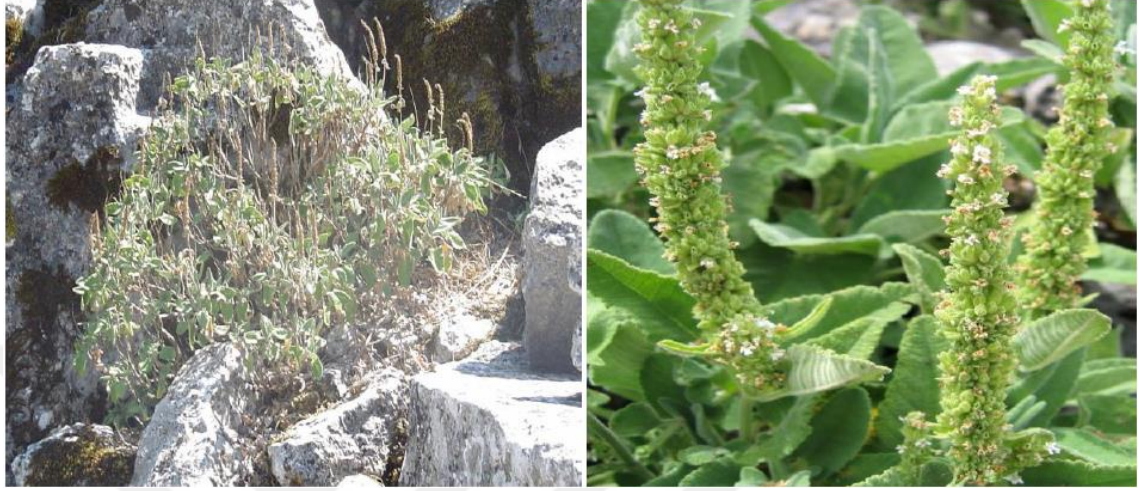
Endemik türlerin dağılımında, Akdeniz Bölgesi Türkiye'nin en öne çıkan coğrafyalarından biridir. Batı Toros dağ silsilesine sahip olan Antalya ili, karmaşık topografyası ve heterojen çevresel koşulları ile bu zenginliğin büyük bir bölümüne sahiptir. Son kaydedilen türlerle birlikte, Antalya florasında toplam 873 endemik takson (tür, alttür ve varyete) bulunmaktadır (Selim ve Mutlu 2016).

Endemizm oranı yüksek olan bu bölgenin florası, aynı zamanda tıbbi ve aromatik bitki çeşitliliğiyle dikkat çekmektedir. Bu bitkiler arasında, *D. hastata* Lamiaceae familyasından Antalya'ya özgü endemik üçüncül relict monotipik bir bitkidir. Lamiaceae familyası yaklaşık 200 cins içerir ve eterik yağ üretimi konusunda oldukça önemli bir familyadır. Cinslerin çoğu terpenoidler, glikozitler ve flavonoidler bakımından zengindir (Erdağ vd. 2010). *D. hastata*, Lamiaceae familyasında monotipik olan *Dorystoechas* cinsindeki tek türdür.



Şekil 2.8. (a) *D. hastata* türlerinin çiçek ve yaprak yapısına genel bir bakış. **(b)** *D. hastata* türlerine genel bir bakış (Selim ve Mutlu 2016).

Şekil 2.8 ve şekil 2.9’da görüldüğü üzere *D. hastata*, 40-100 cm boylarında, odunsu bir çalı formunda olan, tüm kısımları yoğun aromatik özellikler gösteren bir bitkidir. Yaprakları mızraksı formda, yumuşak tüylü, kenarları küçük loplu ve hastat yapıdadır. Mayıs ve Temmuz ayları arasında çiçeklenir ve 650-2000 metre rakımları arasında kaya ve friganaların çevresinde doğal yayılış gösterir. (Selim ve Mutlu 2016).



Şekil 2.9. (a) *D. hastata*'nın (Termessos) vejetatif evresinin genel görünümü. (b) *D. hastata*'nın spikaları (Işık ve Yücel 2017).

Genç köklerde kortikal tabakanın altında kimyasal içerikten dolayı kırmızımsı bir renk vardır. Gövde odunsu yapıdadır, dallanma dipten başlar, ana gövde gözlenemez. Açık alanlarda yetişen gövdeler sferoidal bir forma sahiptir, ancak ışığın az olduğu alanlarda yetişen bazı bireyler sarkıktır. Gövde üzerindeki korteks çok sayıda uzunlamasına yarıklara sahiptir ve kolayca soyulamaz. Spika 6.8-13 cm uzunluğunda, verticillaster 10-25 çiçekli ve spikanın tepesi daha az sayıda çiçeğe sahiptir (Şekil 2.9.b). Pediseller 0.6-0.9 mm olup, kaliksten kolaylıkla ayırt edilemez (Işık ve Yücel 2017).

Antalya çevresinde geniş yayılımı olan bitki yerel halk tarafından “Devren Kekiği, Şalba veya Çalba” diye adlandırılmaktadır ve adaçayı gibi aromatik çay hazırlanmasında kullanılmaktadır. Kurutulmuş veya taze yapraklardan hazırlanan çay, geleneksel tıpta soğuk algınlığı veya grip tedavisinde kullanılır. Ekstraktları ayrıca kanama durumlarında, adet bozukluklarında ve düşüklere karşı kullanılmaktadır (Albayrak 2021).

2.5.2. Antioksidan özellikleri ve biyolojik aktivitesi

Karagözler ve arkadaşları (2008) *D. hastata*'nın yapraklarının farklı polaritedeki çözenler ile farklı sıcaklıklarda ekstraktlarını elde etmişlerdir. Bu ekstraktların fenolik bileşen içeriğini, prolin seviyelerini ve antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar, *D. hastata*'nın zengin bir fenolik bileşen kaynağı olduğunu ve antioksidan potansiyelinin hem radikal süpürme hem de lipid peroksidasyonunu engelleme özellikleriyle öne çıktığını ortaya koymuştur. Geleneksel olarak çay olarak tüketilen *D. hastata*'nın sıcak su ekstraktının yüksek fenolik içeriği ve DPPH radikal süpürme etkinliği, bitkinin bu tüketim yöntemiyle de etkili olduğunu doğrulamıştır.

Erkan ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmada, *D. hastata* bitkisinin su, metanol, etil asetat, aseton ve petrol eteri çözücülerini elde ettikleri ekstraktlardan HPLC-DAD analizi sonucunda ayrıntılı bir fenolik bileşen profili çıkararak bu ekstraktların antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Fenolik asitlerden klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve rozmarinik asit; flavonoidlerden kuersetin, kaempferol, apigenin ve diterpenoidlerden ise karnosik asit ve karnosol tespit etmişlerdir. Çalışmada *D. hastata* ekstraktlarının güçlü antioksidan özelliği DPPH•, ABTS•⁺, TBARS gibi antioksidan testler ile gösterilmiştir. *D. hastata*'nın petrol eteri, metanol ve su ekstraktlarının çok etkili antioksidatif ekstraktlar olduğu bulunmuştur. Tespit edilen fenolik bileşiklerin farklı sınıfları, yani fenolik asitler, flavonoidler ve diterpenoidler ve güçlü antioksidan kapasitesi nedeniyle, *D. hastata* potansiyel bir antioksidatif yenilebilir kaynak olarak tüketilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kan ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada *D. hastata*'nın esansiyel yağla, amino asit ve mineral içeriğini tespit etmişlerdir. Çalışmada *D. hastata*'nın yaprak kısmında öne çıkan esansiyel yağlar 1,8-cineol, borneol, camphor, α -pinen ve β -pinendir. Özellikle 1,8-cineol yaprak yağında %20,6 ile en yüksek oranda bulunmuştur. Bu bileşen, antioksidan ve antimikrobiyal etkileriyle bilinir. Sonuçlar, *D. hastata*'nın uçucu yağlarının bileşimindeki farklılıkların bitkinin kısmına (yaprak,kök,gövde gibi) ve distilasyon yöntemine bağlı olduğunu göstermektedir. Bu bileşenlerin yüksek biyolojik aktiviteleri, bitkinin ilaç ve kozmetik alanlarındaki potansiyel kullanımını desteklemektedir.

Uçar, yaptığı yüksek lisans tezinde (2015), *D. hastata* ekstraktlarının kanser hücreleri olan A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri, HeLa serviks kanser hücreleri ve normal hücre olan insan fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmıştır. *D. hastata*, hücrelerin %44'ünü öldürmeyi başararak antitümoral etki göstermiştir. Bu etkisi fenolik içeriğine ve güçlü antioksidan özelliğine bağlanmıştır.

Albayrak (2021), yaptığı çalışmada, *D. hastata*'nın esansiyel yağının ve metanol ekstraktının bileşen tayinini yapmış ve antioksidan etkileri ile gram pozitif, gram negatif bakteriler ve mayalar dâhil olmak üzere 15 farklı mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etkisini incelemiştir. *D. hastata* kuvvetli bir antioksidan etki ve özellikle bakterilere karşı güçlü bir antibakteriyel etki göstermiştir.

D. hastata bitkisine dair yapılan tüm bu çalışmalar zengin fenolik içeriği sayesinde, ekstraktının α -amilaz, α -glukozidaz ve asetilkolinesteraz enzimleri için iyi birer inhibitör potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Bu da onun diyabet ve Alzheimer hastalıkları için bitki temelli ilaç veya gıda takviyesi olarak kullanılmasını olası kılmaktadır. Bu tez çalışmasıyla, *D. hastata*'nın bu potansiyeli aydınlatılacak ve ileriki aşamalar için gerekli olan *in vivo* çalışmaların temelleri oluşturulacaktır.

2.5.3. Taksonomik isim değişikliği: *Salvia dorystoechas* B.T.Drew (syn. *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. ex Benth.)

D. hastata, Türkiye'nin güneybatısına özgü endemik bir tür olup uzun yıllar boyunca *Dorystoechas* adıyla, monotipik bir cins olarak kabul edilmiştir. Ancak, 2017 yılında Drew ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan filogenetik analizler sonucunda, bu türün *Salvia* cinsi içerisinde sınıflandırılması önerilmiş ve *Salvia dorystoechas* adıyla

yeniden tanımlanmıştır (Drew et al., 2017). Bu taksonomik revizyon, *Salvia* cinsinin monofiletik (tek bir ortak atadan türemiş) bir grup olarak tanımlanmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Drew ve çalışma arkadaşlarının çalışması, *Salvia* cinsinin daha önce ayrı cinsler olarak kabul edilen *Dorystoechas*, *Meriandra*, *Perovskia*, *Rosmarinus* ve *Zhumeria* cinslerini de içine alacak şekilde genişletilmesini önermiştir.

Her ne kadar isim değişikliği 2017 yılında önerilmiş olsa da bilimsel camiada bu tür değişikliklerin yaygınlaşması zaman alabilir. *Dorystoechas hastata* adı, literatürde uzun süre kullanılmaya devam etmiştir. Türkiye'deki resmi floristik kaynaklarda bu değişikliğin yansması biraz zaman almıştır. 2017 yılında yayımlanan "Systematic and Biogeographic Overview of Lamiaceae in Turkey" başlıklı çalışmada *Dorystoechas hastata*'nın taksonomik pozisyonuna dair tartışmalar yer almaktadır. Bu çalışma, Türkiye florasında Lamiaceae familyasının sistematigi ve biyocoğrafyası üzerine kapsamlı bir değerlendirme sunmaktadır. Çalışmada, *Dorystoechas* cinsinin Türkiye'de 100% endemizm oranına sahip tek tür olan *Dorystoechas hastata* ile temsil edildiği belirtilmektedir. Ancak, bu türün taksonomik pozisyonunun hâlâ tartışmalı olduğu ifade edilmektedir. Bu, Türkiye'deki bilimsel çevrelerde isim değişikliğinin hemen benimsenmediğini göstermektedir. Yapılan taksonomik değişiklik, moleküler verilerle desteklenmiş ve *Salvia* cinsinin monofiletik yapısının korunması amacıyla gerçekleştirilmiş olsa da Türkiye'deki bazı bilimsel çevreler, bu değişikliğin yeterince değerlendirilmediğini ve morfolojik özelliklerin de dikkate alınması gerektiğini savunmaktadır. Bu durum, bilimsel literatürdeki isim değişikliklerinin yerel düzeyde benimsenmesinin zaman alabileceğini ve farklı görüşlerin olabileceğini göstermektedir.

Ancak uluslararası veri tabanları artık *Salvia dorystoechas* adını geçerli bilimsel ad olarak kabul etmektedir. Günümüzde, *Salvia dorystoechas* adı, Royal Botanic Gardens, Kew tarafından yönetilen "Plants of the World Online" (POWO) veri tabanında kabul edilmiş ve Türkiye'nin güneybatısına özgü bir tür olarak listelenmiştir. Ayrıca, World Flora Online (WFO), International Plant Names Index (IPNI) ve Global Diversity Information Facility (GBIF) gibi veri tabanlarında da bu isim geçerli isim olarak yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında, güncel taksonomik sınıflandırmaya uygun olarak *Salvia dorystoechas* ismi de eşanlamlı olarak kullanılacaktır. Bilgi bütünlüğü açısından literatür *D. hastata* ismiyle ve *S. dorystoeches* ismiyle birlikte taranmış, bulgular ve tartışma bölümünde de her iki isimle yapılan yayınlara da yer verilmiştir.

2.6. Enzimler ve Enzim Kinetiği

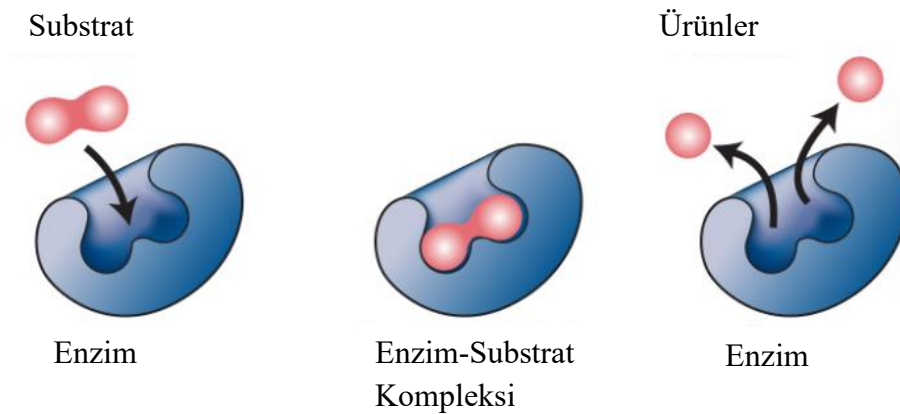
Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve bu süreçlerde katalizör olarak görev yapan biyolojik moleküllerdir. Hayat, güçlü ve spesifik katalizörler olan enzimlere bağlıdır. Birkaç katalitik RNA dışında bilinen tüm enzimler proteinlerden oluşur. Enzimler, kataliz ettikleri reaksiyon türüne göre sınıflandırılır. Tüm enzimlerin resmi E.C. (Enzyme Commission) numaraları ve adları bulunur, ayrıca çoğu yaygın olarak bilinen "trivial" adlara da sahiptir.

Çizelge 2.3. Enzimlerin uluslararası sınıflandırma sistemi (Nelson ve Cox 2008).

Sınıf No	Sınıf İsmi	Katalize Edilen Reaksiyon Türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi-Alkol dehidrogenaz
2	Transferazlar	Grup transfer reaksiyonları-Kinazlar
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları- α -amilaz ve asetilkolinesteraz
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların eklenmesi veya grupların uzaklaştırılmasıyla çift bağların oluşumu-Fumaraz
5	İzomerazlar	Molekül içinde grupların yer değiştirmesiyle izomerik formların oluşumu-Fosfohekza izomeraz
6	Ligazlar	Kondenzasyon reaksiyonlarıyla C—C, C—S, C—O ve C—N bağlarının oluşumu -DNA ligaz

Her enzim, spesifik substratlarla çalışır; bu, enzimin substratına olan yüksek özgülüğünden kaynaklanır. Bu özgülük, enzimin üç boyutlu yapısında bulunan aktif bölge ile ilişkilidir. Aktif bölge, substratın bağlandığı ve kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği yerdir. Enzimler, reaksiyon sırasında değişmeden kalır, böylece tekrar tekrar kullanılabilirler. Bununla birlikte, enzimlerin etkinliği sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu ve inhibitörlerin varlığı gibi çevresel faktörlerden etkilenir.

Enzimler, hücrelerde çok çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda rol oynar. Bu reaksiyon türleri arasında hidroliz, oksidasyon-redüksiyon, izomerizasyon ve sentez reaksiyonları bulunur. Bu nedenle, enzimler metabolik yolların düzenlenmesinde kritik bir öneme sahiptir.

**Şekil 2.10.** Enzimlerin çalışma şekillerinin şematik gösterimi

Enzimlerin etkinliği, çevresel koşullara bağlı olarak değişir ve her enzim, optimum koşullarda maksimum performans sergiler. Enzimlerin çalışma koşullarını etkileyen temel faktörler:

- Sıcaklık: Enzimler, genellikle belirli bir sıcaklık aralığında en iyi şekilde çalışır. Çok düşük sıcaklıklar, enzimin aktivitesini yavaşlatırken, yüksek sıcaklıklar enzimin denatüre olmasına neden olabilir. Çoğu insan enzimi için optimum sıcaklık yaklaşık 37°C'dir.
- pH: Her enzim, spesifik bir pH aralığında maksimum aktivite gösterir. Örneğin, mide enzimi pepsin asidik bir ortamda (pH ~2) çalışırken, pankreas enzimi tripsin nötr bir pH'da (~7.5) aktiftir.
- Substrat Konsantrasyonu: Substrat konsantrasyonu arttıkça reaksiyon hızı da artar, ancak bu artış enzim doygunluğuna ulaştığında durur. Doygunluk noktasında, tüm enzim molekülleri substrat ile bağlanmış durumda olduğundan hız daha fazla artmaz.
- İnhibitörler ve Aktivatörler: İnhibitörler, enzimin aktivitesini geçici (reversible) veya kalıcı (irreversible) olarak azaltırken, aktivatörler enzimlerin aktivitesini artırabilir. İnhibitörler, enzim kinetiği çalışmalarında reaksiyon mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir araçtır.

Enzimlerin bu koşullara olan duyarlılığı, canlı organizmalarda metabolik yolların düzenlenmesine olanak tanır. Hücresel seviyede, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörler genellikle sabit tutulsa da inhibitör ve aktivatörler aracılığıyla enzim aktiviteleri dinamik bir şekilde kontrol edilir.

2.6.1. Michealis-Menten kinetiği ve Lineweaver-Burk grafiği

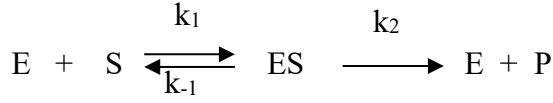
Enzim kinetiği, enzimlerin katalitik aktivitelerini anlamak ve bu aktiviteleri etkileyen faktörleri incelemektir. Bir enzimin substratını ne kadar hızla ürünlere dönüştürebildiğini ve bu süreçte hangi dinamiklerin etkili olduğunu anlamaya yöneliktir.

Enzim kinetiği çalışmalarında, reaksiyon hızlarını anlamak ve modellemek için genellikle Michaelis-Menten kinetiği kullanılır. Michaelis-Menten modeli, enzimatik reaksiyonları iki aşamalı olarak tanımlar:

- Substratın enzime bağlanarak enzim-substrat kompleksi (ES) oluşturmaları.
- Bu kompleksin, ürün ve serbest enzim olmak üzere ayrışması.

Bu modelin önemli bir varsayımı, reaksiyonun kararlı hal (steady-state) koşullarında gerçekleştiğidir. Kararlı hal yaklaşımı, enzim-substrat kompleksinin oluşum hızı parçalanma hızına eşit kabul edildiği için enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonunun zamanla sabit kaldığı durumdur. Bu yaklaşım, reaksiyon kinetiğini anlamamızı kolaylaştırarak Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) gibi önemli kinetik parametrelerin hesaplanmasını mümkün kılar

Michaelis-Menten denkleminin elde edilmesi aşağıdaki adımları içerir:



E: Enzim

S: Substrat

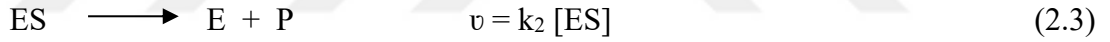
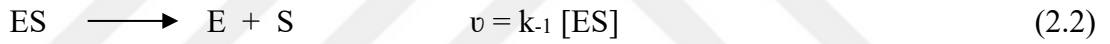
P: Ürün

ES: Enzim-substrat kompleksi

k_1 : Enzim-substrat kompleksini oluşturan tepkimenin hız sabiti

k_{-1} : Enzim-substrat kompleksinin ayrışmasına ait tepkimenin hız sabiti

k_2 : Son reaksiyon ürününü üreten ve serbest enzimi tekrar oluşturan kataliz reaksiyonunun hız sabiti. Bu basamak yavaş basamaktır ve reaksiyonun hızını belirler.



Kararlı hal yaklaşımına göre;

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] \quad (2.4)$$

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (2.5)$$

Ortamdaki toplam enzim $[Et]$ konsantrasyonu şu şekilde ifade edilir;

$$[Et] = [E] + [ES] \quad (2.6)$$

Buradan serbest enzim;

$$[E] = [Et] - [ES] \quad (2.7)$$

şeklinde ifade edilir ve eşitlik 2.5'te yerine yazılırsa;

$$k_1 ([Et] - [ES]) [S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (2.8)$$

eşitlik 2.8 elde edilir ve bu denklem [ES] kompleksi için çözülürse;

$$[ES] = \frac{k_1 [Et] [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (2.9)$$

$$[ES] = \frac{[Et] [S]}{(k_{-1} + k_2) / k_1 + [S]} \quad (2.10)$$

Burada $(k_{-1} + k_2) / k_1$ ifadesi yerine K_m yazılırsa;

$$[ES] = \frac{[Et] [S]}{K_m + [S]} \quad (2.11)$$

eşitliği elde edilir. Reaksiyon hızı, ürün oluşum hızına eşit olduğu için denklem 2.3'te verilen eşitlik denklem 2.11'de [ES] yerine yazılırsa Michaelis-Menten denkleminin genel formu elde edilir.

$$v = \frac{k_2 [Et] [S]}{K_m + [S]} \quad (2.12)$$

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten eşitliği}) \quad (2.13)$$

V_{max} : Maksimum hız ($V_{max} = k_2 [Et]$)

K_m : Substrat konsantrasyonunun, maksimum hızın yarısına ulaşıldığı noktadaki değeri.

- Düşük [S]: $[S] \ll K_m$ olduğunda v yaklaşık olarak şu şekilde olur:

$$v \approx \frac{V_{max} [S]}{K_m} \quad (2.14)$$

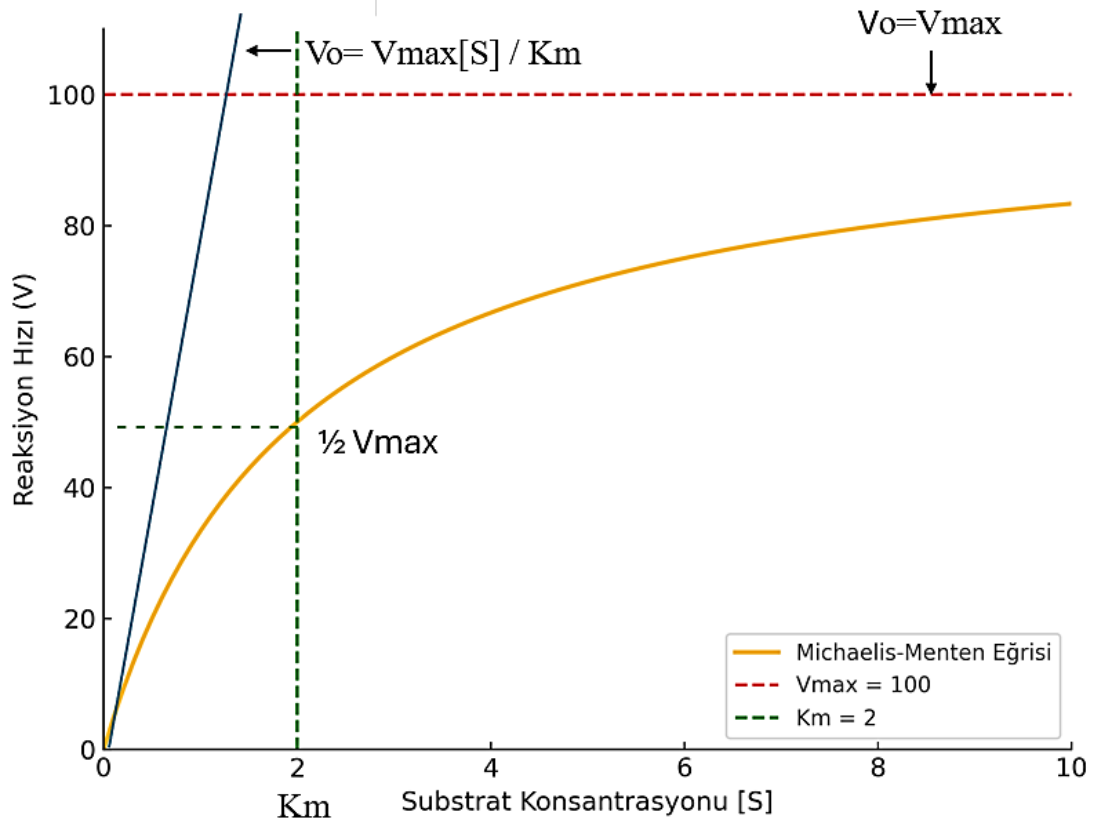
Bu, reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna doğrusal olarak bağlı olduğu bölgedir.

- Yüksek [S]: $[S] \gg K_m$ olduğunda v yaklaşık olarak şu şekilde olur:

$$v \approx V_{max} \quad (2.15)$$

Bu durumda, enzim substrata doymuştur ve hız substrattan bağımsızdır.

Eğer Michealis-Menten denklemini grafiğe geçirirsek şekil 2.11.'de ki grafik elde edilir.



Şekil 2.11. Michealis-Menten denkleminde elde edilen grafik (Nelson ve Cox 2008).

Michaelis-Menten kinetiğini takip eden birçok enzim, oldukça farklı reaksiyon mekanizmalarına sahiptir ve altı veya sekiz belirgin adımı olan reaksiyonları katalize eden enzimler bile aynı kararlı-hal kinetik davranışı sergileyebilir. Her ne kadar denklem 2.13 birçok enzim için geçerli olsa da Vmax ve Km'nin büyüklüğü ve gerçek anlamı enzime göre farklılık gösterebilir. Bu durum, enzim kinetiğinde kararlı-hal yaklaşımının önemli bir sınırlamasıdır.

Herhangi bir enzim için Vmax ve Km değerleri deneysel olarak elde edilebilir; ancak bu değerler tek başlarına, reaksiyondaki adımların sayısı, hızları veya kimyasal doğası hakkında çok az bilgi sağlar. Buna rağmen, kararlı-hal kinetiği, enzimlerin

katalitik etkinliklerini karşılaştırmak ve karakterize etmek için kullanılan standart bir yöntem olarak kabul edilir.

Michaelis-Menten denklemi doğrusal olmadığından parametrelerin doğru bir şekilde belirlenmesi için Lineweaver-Burk dönüşümü kullanılır. Bunun için Michealis-Menten denkleminin çift ters dönüşüm (double reciprocal) uygulanır (2.16 ve 2.17).

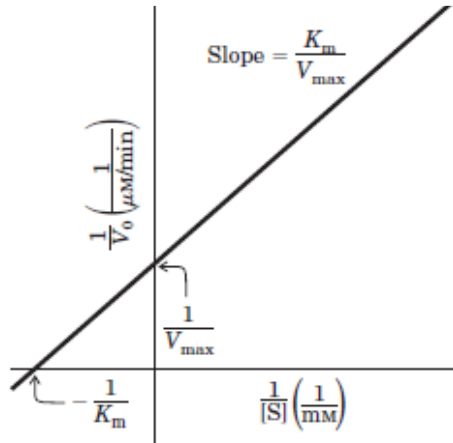
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} \quad (2.16)$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.17)$$

Elde edilen denklemin düzenlenmesi ile eşitli 2.18 yani Lineweaver-Burk grafiği elde edilir.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.18)$$

Bu denklem şekil 2.12.'de görüldüğü gibi grafiğe geçirildiğinde bir doğru verir. Bu doğrunun eğimi (slope) bize K_m / V_{max} değerini verir. Bu değer Michaelis-Menten sabiti ile maksimum hız arasındaki ilişkiyi tanımlar.



Şekil 2.12. Lineweaver-Burk denkleminin elde edilen grafik (Nelson ve Cox 2008).

Doğrunun x eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ değerini verir. Bu değer substratın enzime bağlanma afinitesi hakkında bilgi verir. Küçük bir K_m değeri enzimin substrata yüksek afinitesi olduğunu gösterir.

Doğrunun y eksenini kestiği nokta $1/V_{max}$ değerini verir ve bu değer bize maksimum hız hakkında bilgi verir.

Bu denklemin en önemli avantajı K_m ve V_{max} değerleri doğrudan grafik üzerinden hesaplanabilir. Deneysel verileri doğrusal bir şekilde analiz etmeyi sağlar. Ancak yüksek ve düşük substrat derişimlerinde hata oranı artar ve grafiğin eğimi değişir. Bu yüzden ön çalışmalarla uygun derişim aralıkları belirlenerek çalışılmalıdır.

2.6.2. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin aktivitesinin geçici veya kalıcı olarak engellenmesine enzim inhibisyonu bunu yapan maddelere ise enzim inhibitörü denir. Enzim inhibitörleri iki ana kategoriye ayrılır; reversible (geri dönüşümlü) ve irreversible (geri dönüşümsüz).

İrreversible enzim inhibitörleri enzime kovalent bağlarla bağlanır ve kalıcı bir inhibisyona neden olur. Enzimin aktif bölgesini kalıcı olarak değiştirir. Yeni enzim sentezi olmadan aktivite geri getirilemez.

Reversible enzim inhibitörleri ise enzime kovalent olmayan ikincil bağlarla bağlanır ve bu bağlanma geri dönüşümlüdür. Bu inhibitörler bağlanma yerlerine göre 3 farklı inhibisyon mekanizması gösterirler. Bu inhibitörler ilaç geliştirme ve metabolik kontrol mekanizmalarında kullanılırlar.

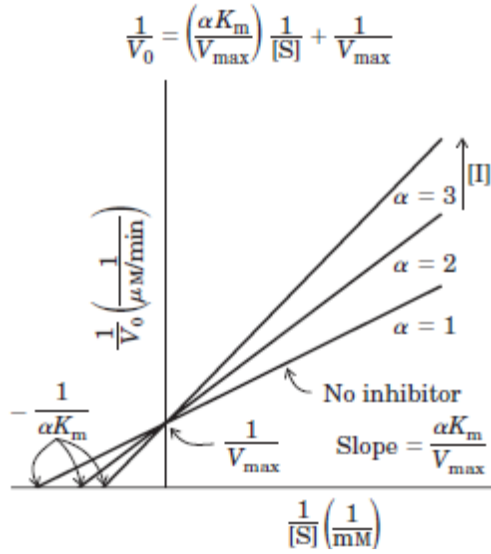
- Kompetitif (rekabetçi) inhibisyon:

Rekabetçi inhibitörler, substratın bağlandığı enzimin aktif bölgesine bağlanır. Substrat ile inhibitör arasında doğrudan rekabet vardır. Bağlanma sadece serbest enzime (E) olur; enzim-substrat kompleksine (ES) bağlanmaz. Bu durumda Michealis-Mentem denklemi şu şekilde yazılır.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (2.19)$$

Burada ; $\alpha = 1 + [I] / K_I$ ve $K_I = [E] [I] / [EI]$ temsil etmektedir.

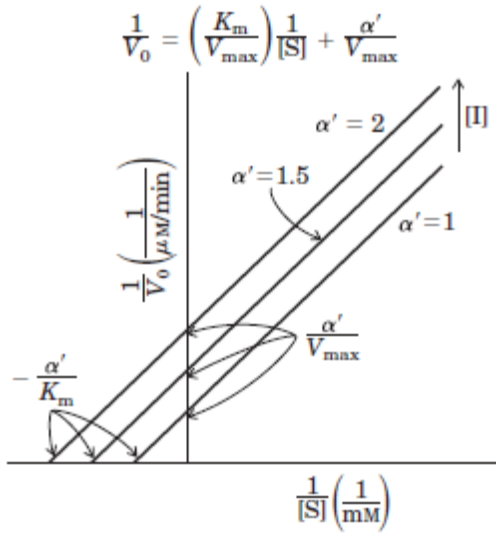
Şekil 2.13'te kompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği gösterilmektedir. Görüldüğü üzere inhibitör varlığında K_m artış gösterir ve substrat, inhibitör ile rekabet ettiği için daha fazla substrat gereklidir. Deneysel olarak belirlenen değişken K_m (αK_m) inhibitörün varlığında gözlemlenen K_m değeri olup, genellikle görünür (apparent) (K_m^{app}) olarak adlandırılır. V_{max} değişmez ve yeterince yüksek substrat konsantrasyonunda inhibitör etkisi aşılabılır.



Şekil 2.13. Kompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).

- Unkompetitif (rekabetçi olmayan) inhibisyon:

Unkompetitif inhibitörler yalnızca enzim-substrat kompleksine (ES) bağlanır. Substrat bağlanması, inhibitör için bir bağlanma yeri oluşturur. Substrat yoksa inhibitör bağlanamaz. K_m değeri azalır inhibitör, enzimin substrata olan bağlanma afinitesini artırır. V_{max} değeri azalır, ürün oluşumunu engeller.

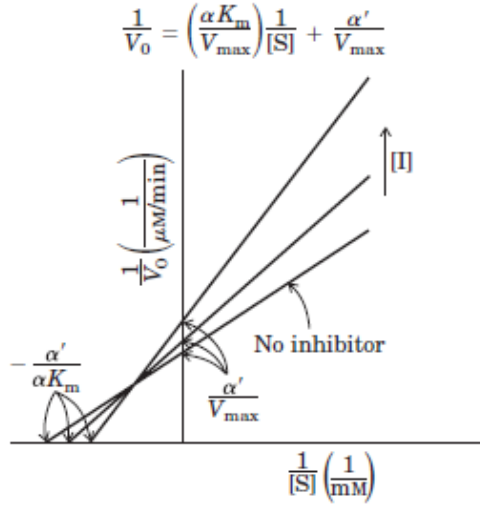


Şekil 2.14. Unkompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).

- Mixed ve nonkompetitif (karışık ve rekabet dışı) inhibisyon:

Mixed inhibitörler, serbest enzime (E) ve enzim-substrat kompleksine (ES) bağlanabilir. Nonkompetitif inhibitörler, özel bir mixed inhibitör türüdür; E ve ES için bağlanma afinitesi eşittir.

Mixed inhibitörlerde K_m değeri inhibitörün bağlanma yerlerine bağlı olarak artabilir veya azalabilir. V_{max} ise her zaman azalır. Nonkompetitif inhibitörlerde ise K_m değişmezken V_{max} azalır.



Şekil 2.15. Nonkompetitif inhibisyon için elde edilen Lineweaver-Burk denkleminin grafiği (Nelson ve Cox 2008).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Yazılım Programları

Bu bölümde deney sırasında kullanılan kimyasallar ve cihazlar üretici firmaları belirtilerek çizelge şeklinde sunulmuştur. Kullanılan yazılım programları ise liste şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Üretici Firma
Metanol	Sigma Aldrich, % 99,9 saflık
Etanol	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Aseton	Merck, % 99 saflık
n-Hekzan	Merck % 95 saflık
Kloroform	Merck, % 99 saflık
Etil Asetat	Merck, % 99,5 saflık
n-Bütanol	J.T. Baker
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck, % 37 saflık
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck, % 99 saflık
Folin-Ciocalteu (FC) Reaktifi	Sigma Aldrich
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck, % 99,9 saflık
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Emboy, % 99,5 saflık
Potasyum Hidroksit (KOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Sodyum Nitrit (NaNO_2)	Merck
Alüminyum Klorür Hekzahidrat ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Riedel
Çözünebilir Nişasta	Isolab
5-5'-Ditiobis-2-Nitrobenzoik Asit (DTNB)	BLDpharm, % 98 saflık

Devamı arkada

Çizelge 3.1'in devamı

Asetiltiyokolin İyodür (ATCI)	BLDpharm, % 98 saflık
Asetilkolin Esteraz Enzimi (AChE)	Sigma Aldrich, from electric eel , 500U
α -Amilaz Enzimi	GLP Bio, from porcine pancreas, 50 kU
Gallik Asit	BLDpharm, % 99,98 saflık
Kuersetin	BLDpharm, % 97 saflık
Potasyum Fosfat Dibasic (K_2HPO_4)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Potasyum Fosfat Monobasic (KH_2PO_4)	Sigma Aldrich, % 99 saflık
Potasyum İyodür (KI)	Isolab, % 99,5 saflık
İyot (I_2)	Merck

Çizelge 3.2. Deneylerde kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Üretici Firma
UV-Visible Spektrofotometre	Cary 100 Bio
Evaporatör	IKA RV10 modeli
Soğutmalı sirkülatör	Julabo, F12 modeli
Etüv	Memmert
Vorteks	VWR International
Terazi	RADWAG , PS 750 R2 modeli
Magnetik Karıştırıcı	Stuart, SB 162-3 modeli
pH Metre	Metler Toledo, Five Easy modeli
Su Banyosu	BIBBY RE 100 B modeli
Vakum Pompası	Edwards, 3 modeli
Ultra Saf Su Cihazı	Veolia, Elga modeli
UHPLC-MS/MS	Thermo Scientific TSQ Fortis,
Kromatografi Kolonu	Hypersil Gold RP C18 (1.9 μ m), 50x2.1 Mm, Thermo Fisher Scientific Inc.

Kullanılan yazılım programları;

Kromatografik analizler	Xcalibur
Molekül yapılarının çizimi	Chemdraw Ultra 12.0
Grafiklerin çizimi	Graphpad prism 10 ve Excel (Microsoft 365 office)

3.2. *D. hastata* Bitkisinin Toplanması ve Hazırlanması

Deneylerde kullanılan *D. hastata* bitkisi Doç. Dr. Naciye Erkan (Akdeniz Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu) tarafından Antalya Fesliken yaylası bölgesinden toplanıp kurutulmuştur. Şekil 3.1’de *D. hastata* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinin kurutulmuş hali gösterilmektedir.



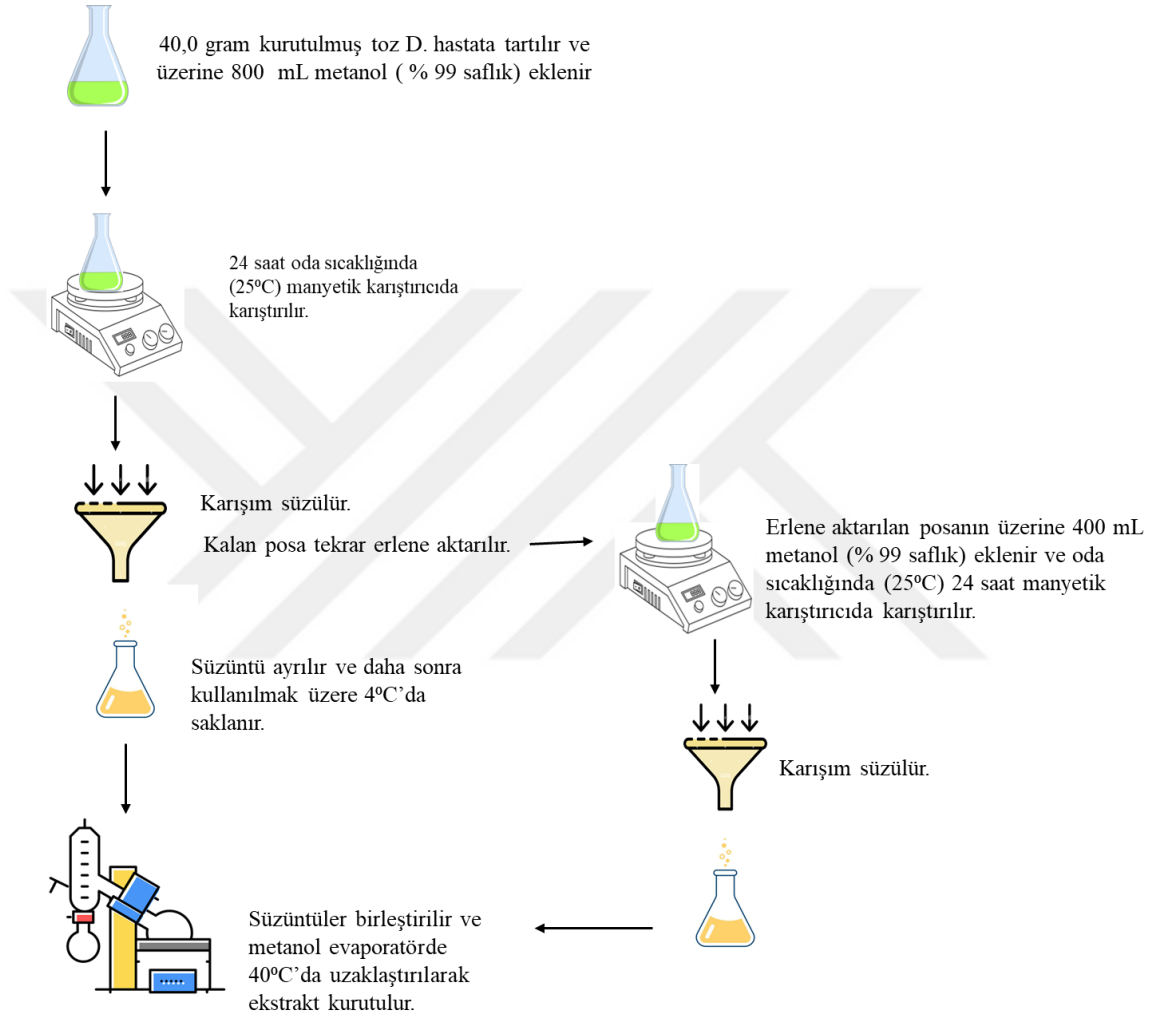
Şekil 3.1. Kurutulmuş *D. hastata* bitkisinin toprak üstü parçaları

Kurutulan bitki karanlık ve serin bir yerde saklanmıştır ve kullanımdan önce odunsu kısımları ayrılıp toz haline getirilerek kullanılmıştır.

3.3. *D. hastata* Bitkisinden Çeşitli Ekstraktların Eldesi

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş *D. hastata* bitkisinin ekstraksiyonu için konvansiyonel metotlardan biri olan maserasyon yöntemi tercih edilmiştir. Ham ekstraktın eldesi ve çeşitli fraksiyonların eldesine ait akış şeması şekil 3.2 ve şekil 3.4’te gösterilmektedir.

Ham metanolik ekstraktın eldesi için 40,0 gram bitki tartıldı ve 800 mL metanol eklenerek 24 saat karıştırıldı. Karışım adi filtre kağıdından süzüldü ve süzüntü daha sonra kullanılmak üzere 4°C’da saklandı. Filtre kağıdında kalan tortu bir kaba alındı ve üzerine 400 mL metanol eklenerek 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu karışım tekrar adi filtre kağıdından süzüldü ve süzüntü ayrıldı. Daha sonra süzüntüler birleştirildi ve evaporatörde 40°C’ , 120 rpm dönüş hızında 200 mmHg basınç ayarlamasında süzüntünün çözgeni uzaklaştırılarak ham metanolik ekstrakt elde edildi.



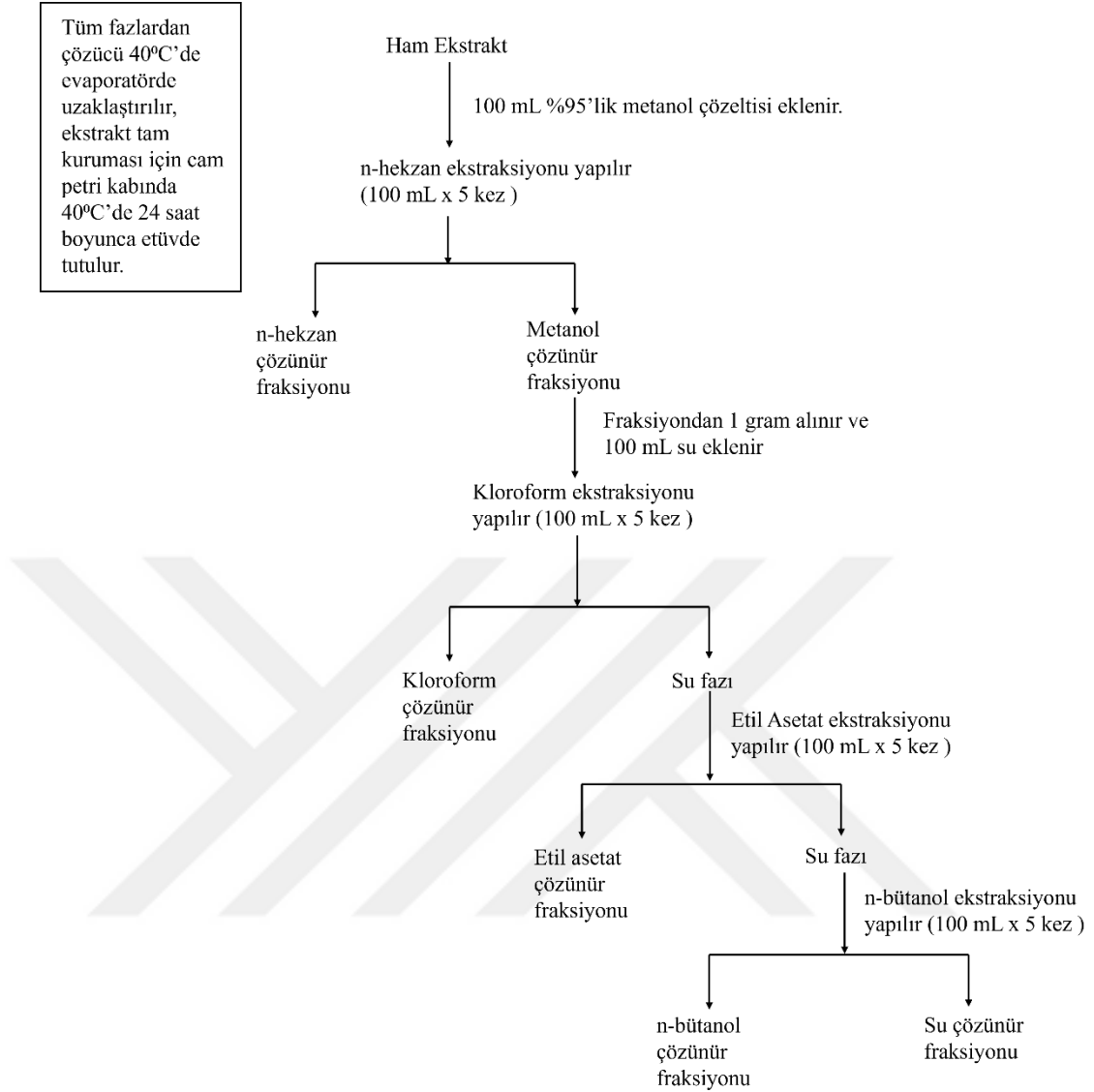
Şekil 3.2. *D. hastata* bitkisinden maserasyon yöntemi ile oda sıcaklığında ham metanol ekstraksiyonuna ait akış şeması.



Şekil 3.3. Elde edilen ekstraktlardan çözücünün uzaklaştırılması için kullanılan evaporatör düzeneği.

Bu aşamadan sonra yukarıda tarif edildiği gibi elde edilen ham metanolik ekstrakta Nernst'ün dağılım yasasına uygun olarak farklı polaritelerdeki çözücüler ile muamele edildi ve alt fraksiyonlar elde edilmiş oldu (Kislik 2012). Bu işlemler şekil 3.4'te verilen akış şemasına göre yapıldı (Otsuka 2005).

Ham metanol ekstraktı önce faz ayrımının daha iyi gözlenebilmesi için % 5 oranında saf su içeren 100 mL metanol çözeltisinde çözüldü ve eşit hacimde n-hekzan ilave edilerek çözelti karıştırıldı. Karışım ayırma hunisine aktarıldıktan sonra 5 dk boyunca kuvvetlice çalkalandı ve 20 dakika boyunca faz ayrımı için beklenildi. Hekzan ve metanol fazı birbirinden ayrıldıktan sonra hekzan fazı bir erlene aktarıldı ve metanol fazının üzerine tekrar 100 mL n-hekzan ilave edilerek ayırma işlemi toplamda 5 kez tekrarlandı. Birleştirilmiş olan n-hekzan ve kalan metanol çözeltilerinden çözücüler evaporatörde 40°C'ye 120 rpm dönüş hızında (n-hekzan için 300 mmHg basınç uygulandı) uzaklaştırıldı. Tam kuruma için 40°C'da 24 saat boyunca etüvde bekletildi. Buradan n-hekzan ve metanol çözünür fraksiyonları elde edildi.



Şekil 3.4. Elde edilen ham metanol ekstraktından metanol, n-hekzan, kloroform, etil asetat, n-bütanol ve su fraksiyonlarının elde edilmesine ait akış şeması.

Elde edilen metanol fraksiyonunun ekstraktı içerisinde 1,00 gram alınarak 100 mL saf suda sonikatör yardımıyla dağıtıldı. Bu su fazına önce 100 mL kloroform eklenerek yukarıda tarif edildiği gibi toplamda 5 kez ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Kloroform fazları birleştirilerek kloroform çözünür fraksiyonu elde edildi. Kalan su fazına sırasıyla etil asetat ve n-bütanol ile de ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bu çözümler ile de çözünür fraksiyonlar elde edildi. En son kalan su fazı ise çözünür su fraksiyonu diye adlandırıldı. Her bir fraksiyon çözeltisinden çözgen uzaklaştırılarak katı ekstrakt elde edildi. Bu ekstraktlar sonraki kullanıma kadar 4°C'da saklandı. Tezin bu bölümünden itibaren elde edilen bu ekstraktlar metanol, hekzan, su, kloroform fraksiyonları olarak isimlendirildi.

3.4. Elde Edilen Fraksiyonların Karakterizasyonu

D. hastata bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların karakterizasyonu için fenolik bileşen içerikleri toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen tayini yapıldı.

3.4.1. UHPLC-MS/MS cihazı ile fenolik bileşen içeriği analizi

D. hastata bitkisinden elde edilen fraksiyonların içerdiği fenolik bileşenlerin analizi UHPLC-MS/MS cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Analiz, Süleyman Demirel Üniversitesi SUDUM biriminden hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

Örneklerin hazırlanması için 20 mg numune % 0,1 (v/v) formik asit içeren 10 mL metanol/asetonitril (50/50) çözeltisinde çözülmüştür. Karışım 5 dakika vortekslendi ve 4000 rpm'de 4°C'da 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant 0,2 µm PTFE membran filtreden geçirilerek UHPLC-MS/MS cihazına enjekte edildi. Toplam analiz süresi 7 dakikadır.

Fenolik bileşiklerin analizi ve miktarının belirlenmesi Thermo Scientific Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Scientific- TSQ Fortis sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin analizleri Xcalibur yazılımı kullanılarak yapıldı. Kromatografik ayırma için kullanılan analitik kolon Hypersil Gold RP C18 (1.9µm), 50x2.1 mm UHPLC kolonudur.



Şekil 3.5. Fenolik bileşen içerik tayinin yapıldığı UHPLC-MS/MS cihazını

Analiz için kullanılan mobil fazlar iki çeşitten oluşmaktadır: organik ve inorganik bazlı. Mobil faz A, %0,1 formik asit ve 4 mM amonyum format içeren 95:5 su ve asetonitril karışımından hazırlandı. Mobil faz B, asetonitril ve suyun % 0,1 formik asit ve 4 mM amonyum format eklenerek 95:5 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Mobil fazın iki farklı çözeltisi kullanılarak fenolik bileşikler analitik kolonun (organik ve inorganik bazlı) gradient akış programı uygulanarak analiz edildi. Konsantrasyonu bilinen 29 adet fenolik bileşik analitik saflık standardı olarak kullanılarak standartların ve numunelerin analiz sonuçları ile karşılaştırıldı. Böylece *D. hastata* bitkisine ait ekstraktların fenolik bileşenlerinin içeriği kantitatif olarak belirlendi. Cihazın tespit limiti 0,05 µg/g'dır.

3.4.2. Toplam fenolik bileşen tayini

D. hastata bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların toplam fenolik bileşen tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre yapıldı (Singleton vd. 1999). Erkan (2011) ve arkadaşlarının belirttiği yöntem bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Bu yöntemde, Folin-Ciocalteu (FC) reaktifinin ortamda bulunan fenolik bileşenler tarafından indirgenmesiyle sarıdan maviye bir renk dönüşümü gerçekleşir ve bu mavi renk takip edilerek ekstraktta bulunan toplam fenolik bileşen miktarı hesaplanır. Yönteme ait tepkime mekanizması şekil 4.5'te verilmiştir.

Bu deney için bir cam deney tüpüne 500 µL fraksiyon çözeltisi (100 µg/mL) ile 500 µL FC reaktifi eklendi ve yaklaşık beş saniye vortekslendi. 3 dakika sonra 500 µL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edildi, tekrar vortekslendi ve çözelti distile su ile 5 mL'ye tamamlandı. Karışım 2 saat boyunca karanlıkta bekletildi ve 760 nm'de absorbansı kaydedildi.

Folin-Ciocalteu reaktifi karanlıkta amber şişede oda koşullarında saklandı ve deneyden hemen önce 1:10 oranında ultra saf su ile seyreltilerek kullanıldı. Na₂CO₃ çözeltisi derişimi % 7,5 (a/h) olacak şekilde ultra saf su ile hazırlandı.

Yöntemde standart olarak gallik asit kullanıldı. Gallik asidin 500 µg/mL (% 95 metanol içerisinde) stok çözeltisi hazırlandı ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Her bir fraksiyondan 1000 µg/mL (% 95 metanol içerisinde) stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltileri çözünmenin iyi gerçekleşmesi için sonikatörde 5 dk boyunca tutuldu. Gerekli seyreltmeler % 95 metanol ile stok çözeltilerinden yapıldı. Deneyde kör olarak % 95'lik metanol çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar 1 gram kuru fraksiyondaki (KF) mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verildi.

3.4.3. Toplam flavonoid bileşen tayini

D. hastata bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların toplam flavonoid tayini AlCl₃ metoduna göre yapıldı (Shraim vd. 2021). Shraim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metodun sınırlamalarını başarılı bir şekilde göstermiştir. Bu metod için literatürde önerilen iki yöntemde denendi ve avantaj ve dezavantajları karşılaştırıldı. Her iki yöntemde de standart olarak kuersetin kullanıldı.

1. yöntem: Bu yöntem verilen kaynağa göre bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Standart kalibrasyon grafiğinin çizilebilmesi için kuersetin stok çözeltisi 1000 µg/mL olacak şekilde (% 95 metanol içerisinde) hazırlandı. Her bir fraksiyondan 1000 µg/mL stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiler hazırlanırken çözünmenin iyi gerçekleşmesi için sonikatörde 5 dk boyunca tutuldu. Gerekli seyreltmeler % 95 metanol ile stok çözeltilerinden yapıldı. Deneyde kör olarak % 95'lik metanol çözeltisi kullanıldı ve sonuçlar 1 gram kuru fraksiyondaki (KF) mg kuersetin eşdeğeri (QE) olarak verildi.

Bir cam deney tüpüne 2,0 mL % 95 metanol çözeltisi eklendi ve üzerine 0,5 mL örnek (kuersetin veya fraksiyon çözeltisi) ve % 10'luk (w/v) AlCl₃ çözeltisinden 0,2 mL (AlCl₃.6H₂O'dan % 95 metanol içerisinde hazırlanmıştır) ilave edildi, karışım vortekslendikten sonra 3 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda 1 M CH₃COONa'tan 0,2 mL ilave edilerek % 95 metanol çözeltisi ile karışım 5,0 mL'ye tamamlandı. Rengin

oturması için tüpler 40 dakika boyunca karanlıkta bekletildi. Karışım UV-Vis spektrofotometrede 250-600 nm dalga boyu aralığında tarandı.

2. yöntem: Bu yöntem de flavonoidler önce HNO_2 ile nitrozilasyona uğrar ve daha sonra Al^{3+} ile kompleks oluşturlar böylece sarıdan pembeye bir renk değişimi gözlenir. Bu komplekse ait pembe renk takip edilerek ekstraktta bulunan toplam flavonoid miktarı hesaplanır. Bu yöntemde de kuersetin ve fraksiyonların çözeltilerinin stokları 1. yöntemle aynı şekilde hazırlandı ve seyreltmeler aynı şekilde yapıldı.

Bir cam deney tüpüne 2,0 mL % 95 metanol çözeltisi eklendi ve üzerine 0,5 mL örnek (kuersetin veya fraksiyon çözeltisi) ilave edildi. Daha sonra üzerine 0,15 mL 1 M NaNO_2 çözeltisi ilave edildi ve vortekslendikten sonra 3 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda 0,15 mL %10'luk AlCl_3 (w/v) ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 'dan % 95 metanol içerisinde hazırlanmıştır) çözeltisi ilave edildi ve tekrar vortekslendikten sonra 3 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda 1 mL 1 M NaOH çözeltisi ilave edildi ve % 95 metanol çözeltisi ile karışım 5,0 mL'ye tamamlandı. Rengin oturması için tüpler 40 dakika boyunca karanlıkta bekletildi. Karışım UV-Vis spektrofotometrede 250-600 nm dalga boyu aralığında tarandı.

3.5. Elde Edilen Fraksiyonların Enzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi

Bu bölümde *Dorystoechas hastata* bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen metanol, kloroform, hekzan ve su fraksiyonlarının enzim inhibisyon aktivitelerini değerlendirmek için kullanılan yöntemler detaylandırılmıştır. Asetilkolin esteraz enziminin inhibisyon mekanizmasını incelemek için Elman metodu, α -amilaz enziminin inhibisyon mekanizmasını incelemek için nişasta-iyot metodu kullanılmıştır. Her iki yöntem de in vitro enzim inhibisyon çalışmalarının doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için yaygın olarak kullanılan, güvenilir ve standart protokollerdir.

3.5.1. Asetilkolinesteraz enziminin inhibisyon çalışmaları

Elman metodu, asetilkolinesteraz enzim aktivitesini değerlendirmek için kullanılan renk değişimine dayalı bir spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntemde, asetilkolinesteraz substratı olarak asetiltiyokolin iyodür (ATCI) kullanılır. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan tiyokolinin, 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girmesiyle sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB) oluşur. Enzim aktivitesi oluşan bu sarı rengin artması üzerinden takip edilir (Ellman vd. 1961; Kapkova 2004).

Ellman metodu için KH_2PO_4 (0,362 g) ve K_2HPO_4 (8,245 g) kullanılarak her seferinde 500 mL 0,1 M pH= 8 fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. Çözeltinin ayarlanması için 1 M KOH ve 1 M HCl çözeltileri kullanıldı ve pH ayarlaması oda sıcaklığında yapıldı. Bu çözelti dolapta 4°C'da en fazla 1 hafta saklanabilir. Kullanmadan önce mutlaka oda sıcaklığına gelmesi beklenmelidir.

Ellman reaktifi olan 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)'nin hazırlanması için 0,396 g DTNB ve 0,15 g Na_2CO_3 tartılıp ultra saf suda çözündürüldü ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti 1,5 mL'lik alikotlar halinde -20°C'da saklandı ve kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

Substrat olan asetiltiyokolin iyodür (ATICI) 0,217 g tartıldı ve saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak derişim 0,075 M olacak şekilde hazırlandı. Çözelti 0,5 mL olarak alikotlandı ve -20°C'da saklandı. Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirildi. ATCI ışığa duyarlı olduğu için çözeltisinin karanlıkta hazırlanmasına dikkat edildi ve deney sırasında da karanlıkta bekletildi.

AChE enziminin hazırlanması için 500 ünite enzim hazırlanan fosfat tamponu içerisinde çözülerek 100 mL'ye tampon çözelti ile tamamlandı. Böylece 5 U/mL konsantrasyonda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 0,8 mL'lik alikotlar halinde - 20°C'da saklandı. Deney sırasında 0,8 mL tampon çözelti ilave edilerek derişim 2,5 U/mL olacak şekilde ayarlandı.

Elde edilen kuru fraksiyonlar %1'lik DMSO çözeltisi içinde çözündürülerek 5 mg/mL olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı ve gerekli seyreltmeler buradan saf su ile yapıldı. DMSO oranı ezim çözeltisinde % 0,01'den büyük olmayacak şekilde ayarlandı.

AChE enziminin kinetik çalışmalarında tüm ölçümler oda sıcaklığında 412 nm'de 420 saniye boyunca her 15 saniyede bir alınmıştır.

Deneyin akışı şu şekildedir;

- Kör çözelti
 - 3,0 mL fosfat tamponu Quartz küvete eklenir
 - 200 µL saf su (enzim ve inhibitör yerine)
 - 100 µL DTNB
 - 20 µL ATCI ilave edilir ve ölçüm alınır.
- Enzim aktivitesi
 - 3,0 mL fosfat tamponu
 - 100 µL saf su (inhibitör yerine)
 - 100 µL AChE
 - 100 µL DTNB
 - 20 µL ATCI ilave edilir ve ölçüm alınır.
- İnhibisyon
 - 3,0 mL fosfat tamponu
 - 100 µL inhibitör
 - 100 µL AChE (15 dk inkübasyon oda sıcaklığında)
 - 100 µL DTNB
 - 20 µL ATCI ilave edilir ve ölçüm alınır.

Asetilkolin estera z enziminin kinetik çalışmalarında başlangıç hızının hesaplanması için eşitlik 3.1 kullanılmıştır. Her bir substrat konsantrasyonu için reaksiyonun ilk aşamasında (0–75 sn-ön çalışmalarla belirlendi) elde edilen zaman-absorbans verileri kullanılarak, doğrusallık gösteren kısmın eğimi hesaplanmıştır. Bu eğim, birim zamandaki absorbans değişimini ($\Delta A/\Delta t$) (1/sn) vermektedir. Elde edilen eğim değerleri aşağıdaki denklemle oluşan TNB miktarına (nmol TNB/dk) dönüştürülmüştür:

$$v_0 = \frac{\Delta A / \Delta t}{\epsilon \cdot d} \cdot 10^9 \cdot 60 \cdot 0,00332 \quad (3.1)$$

Burada:

- $\Delta A / \Delta t$: İlk 75 saniyeye ait regresyon doğrusunun eğimi (1/sn),
- ϵ : 5,5-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) için molar absorpsiyon katsayısı ($13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),
- d: Küvet yol uzunluğu (1 cm),
- 10^9 : mol $\rightarrow$ nmol dönüşüm katsayısı,
- 60: saniyeden dakikaya dönüşüm.
- 0,00332: Reaksiyonun gerçekleştiği toplam hacim (L)

Bu şekilde her bir substrat derişimi için dakika başına oluşan nmol TNB miktarı hesaplanmış ve bu değerler, enzim reaksiyonunun başlangıç hızı (V_0) olarak değerlendirilmiştir.

Fraksiyonların % inhibisyon değerleri ise eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((\text{Kontrolün hızı} - \text{İnhibitörün hızı}) / \text{Kontrolün hızı}) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada kontrol enzimin inhibitör ilave edilmeden hız değerini ifade etmektedir. Bu değer % 100 aktiviteyi gösterir. İnhibitör eklendiğinde enzimin hızındaki değişimin oranı % inhibisyon değerini verir.

DMSO'nun etkisini anlamak için inhibitör yerine DMSO eklenerek % inhibisyon hesaplandı ve çözücünden kaynaklı bir inhibisyonun olup olmadığı incelendi.

3.5.2. α -amilaz enziminin inhibisyon çalışmaları

α -amilaz enziminin inhibisyon çalışmaları için nişasta-iyot metodu seçildi. Bu yöntemde substrat olarak kullanılan nişasta iyot ile mavi renk vererek nişasta-iyot kompleksini oluşturur. Enzim aktivitesi mavi rengin azalması üzerinden takip edilir (Xiao vd. 2006; Oliveira vd. 2019; Ononamadu vd. 2020).

Nişasta-iyot metodu için her seferinde KH_2PO_4 (5,414 g) ve K_2HPO_4 (10,488 g) kullanılarak 500 mL 0,2 M pH = 6,9 olan ve 6mM NaCl (0,175 g) içeren tampon çözelti hazırlandı. Ayarlama işlemi 1 M KOH ve 1 M HCl kullanılarak yapıldı. Bu tampon çözelti 4°C'da buzdolabında en fazla 1 hafta saklanabilir. Kullanmadan önce mutlaka oda sıcaklığına getirilmelidir.

Substrat olarak nişasta her seferinde 50 mL % 1'lik (a/h) konsantrasyonda taze olarak hazırlandı. Nişasta olarak çözünebilir nişasta kullanıldı ve 95°C sıcaklıkta saf suda çözdürülerek hazırlandı. Bu aşamada nişastanın jelleşip çökmemesine özen gösterilmelidir.

Renklendirme ajanı olarak kullanılan iyot çözeltisi 100 mL 5 mM KI ve 5 mM I₂ içerek şekilde hazırlandı. I₂, KI varlığında daha iyi çözünerek KI₃ oluşturur. Bu yüzden çözelti hazırlanırken bir miktar I₂ KI çözeltisine eklendi. Çözünme işlemi uzun sürmektedir. Bu yüzden önce 2 saat sonikatörde daha sonra bir gece magnetik karıştırıcıda bekletilerek çözelti hazırlandı. İyot çözeltisi ışığa karşı duyarlıdır ve karanlıkta hazırlanıp saklanmalıdır. Bu yüzden hazırlanan iyot çözeltisi daha sonra kullanılmak üzere oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

α -amilaz enzimi (65 U / 1 mg katıda) 5 U/mL olacak şekilde fosfat tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlandı. 0,5 mL'lik alikotlar halinde -20°C'da saklandı. Bu stok çözeltiden gerekli seyreltmeler fosfat tamponu ile yapılarak farklı derişimlerde enzim çözeltileri hazırlandı.

α -amilaz enziminin kinetik çalışmalarında tüm ölçümler 620 nm'de alındı. Enzim optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'da farklı sürelerde inkübasyona bırakılarak ölçümler alındı.

Deney akışı şu şekildedir;

- Nişasta kalibrasyonu
 - 500 μ L tampon bir cam deney tüpüne eklenir
 - 500 μ L tampon (enzim yerine)
 - 500 μ L saf su (inhibitör yerine)
 - 500 μ L nişasta çözeltisi (15 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 20 μ L 1 M HCl (reaksiyonu durdurmak için)
 - 100 μ L iyot çözeltisi ilave edilir ve hemen absorbansı okunur.
- Enzim aktivitesi
 - 500 μ L tampon
 - 500 μ L enzim (10 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 500 μ L saf su
 - 500 μ L nişasta çözeltisi (15 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 20 μ L 1 M HCl
 - 100 μ L iyot çözeltisi ilave edilir ve hemen absorbansı okunur.
- İnhibisyon
 - 500 μ L tampon
 - 500 μ L enzim (10 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 500 μ L inhibitör (15 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 500 μ L nişasta çözeltisi (15 dk 37°C'da inkübasyon)
 - 20 μ L 1 M HCl
 - 100 μ L iyot çözeltisi ilave edilir ve hemen absorbansı okunur.

Enzim inhibisyon çalışmalarında % inhibisyon değerinin hesaplanması için eşitlik 3.3 kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(D-A) - (C-B)}{(D-A)} \times 100 \quad (3.3)$$

A = α -amilaz + nişasta + HCl + iyot + tampon

B = α -amilaz + inhibitör + nişasta + HCl + iyot + tampon

C = inhibitör + nişasta + HCl + iyot + tampon

D = nişasta + HCl + iyot + tampon

3.5.3. α -glukozidaz enziminin inhibisyon çalışmaları

Bu çalışmada fraksiyonların α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri, p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG) substratı kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Yöntem, substratın α -glukozidaz enzimi tarafından hidroliz edilerek p-nitrofenol (pNP) oluşturmaya ve bunun 405 nm dalga boyunda absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanır (Tadera vd., 2006).

Reaksiyon ortamı için 0,1 M, pH 6,9 potasyum fosfat tamponu hazırlanmıştır. Bunun için KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 kullanılarak 250 mL tampon çözeltisi hazırlanmış, pH ayarı 1 M KOH veya 1 M HCl ile yapılmıştır. Tampon çözelti 4°C'de buzdolabında saklanmış, kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

Substrat çözeltisi olarak pNPG, 12,5 mM konsantrasyonda ultra saf su ile hazırlanmış ve 1 mL'lik alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Substratın ışığa duyarlılığı nedeniyle karanlıkta muhafaza edilmesine dikkat edilmiştir.

Çalışmada kullanılan α -glukozidaz enzimi (*Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı) potasyum fosfat tamponunda çözülerek stok çözelti halinde hazırlanmış ve -20°C'de 500 μL 'lik alikotlar halinde saklanmıştır. Deneylerde kullanılacak farklı enzim konsantrasyonları fosfat tamponu ile seyreltme yapılarak elde edilmiştir.

Tüm deneyler 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve reaksiyonlar toplam 2 mL hacimde düzenlenmiştir. Ölçümler, reaksiyon sonrası oluşan p-nitrofenolün absorpsiyonunun 405 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla yapılmıştır.

Deney akışı şu şekildedir:

- Enzim Aktivitesi :
 - 1,3 mL fosfat tamponu
 - 500 μL enzim (tampon ile seyreltilerek hazırlanmış stok çözeltiden) (15 dk inkübasyon 37°C'da)
 - 100 μL su (inhibitör yerine) (15 dk inkübasyon 37°C'da)
 - 100 μL pNPG substrat çözeltisi (12,5 mM stok çözeltiden) (30 dk inkübasyon 37°C'da)
 - Absorpsiyon ölçümü hemen yapılır (405 nm)

- İnhibisyon:

- 1,3 mL fosfat tamponu
- 500 µL enzim (tampon ile seyreltilerek hazırlanmış stok çözeltiden) (15 dk inkübasyon 37°C’da)
- 100 µL inhibitör (1 mg/mL stok çözeltisinden saf su ile hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltilerde) (15 dk inkübasyon 37°C’da)
- 100 µL pNPG substrat çözeltisi (12,5 mM stok çözeltiden) (30 dk inkübasyon 37°C’da)
- Absorbans ölçümü hemen yapılır (405 nm)

α-glukozidaz enzimin inhibisyon sonuçları eşitlik 3.4’te verilen denklemlle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100 \quad (3.4)$$

A: α-glukozidaz + pNPG + tampon

B: pNPG + tampon

C: α-glukozidaz + inhibitör + pNPG + tampon

D: inhibitör + pNPG + tampon

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

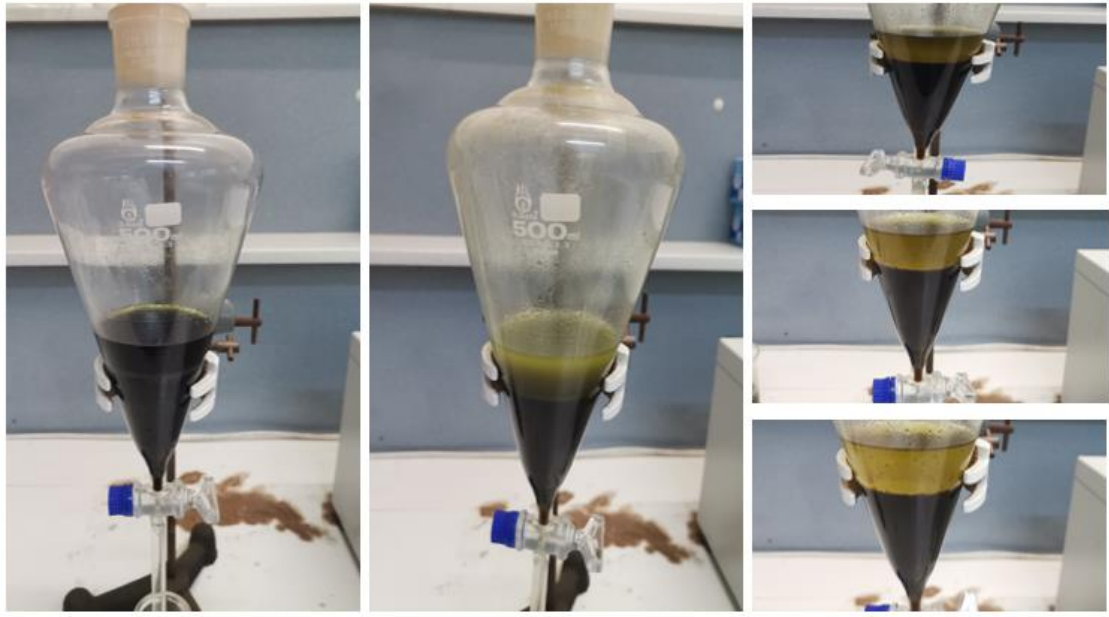
Bu tez çalışmasında, *Dorystoechas hastata* bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen farklı fraksiyonların (metanol, hekzan, kloroform, su) fenolik bileşen içerikleri, toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid bileşen miktarları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca, asetilkolinesteraz (AChE), α -amilaz ve α -glukozidaz gibi önemli enzimler üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilmiştir.

Bu bölümde, elde edilen sonuçlar gösterilmiş ve literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırılarak tartışılmıştır. Böylelikle *D. hastata*'nın biyokimyasal potansiyeli ortaya konulmaya çalışılmıştır. Özellikle, enzim inhibisyonu ve fenolik bileşen içeriği arasındaki ilişkiler detaylı olarak analiz edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarının, bitkisel temelli terapötik yaklaşımlara ve biyoteknolojik uygulamalara yönelik katkıları vurgulanmıştır.

4.1. *D. hastata* Fraksiyonlarının Fenolik Bileşen Profili

Fraksiyonların elde edilmesinde kullanılan çözügenlerin polarite sıralaması çok polardan az polar yönünde şu şekildedir; su, metanol, n-bütanol, etil asetat, kloroform ve hekzan. Su en polar çözügen olmasına rağmen fenolik bileşiklerin başarılı bir şekilde bitkiden ekstrakte edilmesi için metanol çok daha uygun bir çözücüdür. Bunun nedeni fenolik bileşiklerin yapısında hem polar hem de apolar grupların bulunmasıdır. Fenol halkası apolar karakter gösterirken hidroksil (-OH) grupları polar karakterlidir ve hidrojen bağı yapabilirler. Metanol suya kıyasla daha düşük bir polariteye sahip (dielektrik sabiti ≈ 32.6) olmasına rağmen bu iki özelliğe de uyum sağlayan bir çözücü olduğu için fenolik bileşikler sudan daha iyi çözülür. Bu yüzden bitkide bulunan fenolik bileşikler verimli bir şekilde ekstrakte etmek için önce iyi çözündükleri metanolü kullanmak ve daha sonra fraksiyonlamak oldukça önemlidir.

D. hastata bitkisinden elde edilen ham metanol ekstraktına Nernst'ün dağılım prensibinden yararlanarak artan polariteye sahip çözügenlerle sırasıyla sıvı sıvı ekstraksiyonu uygulanmıştır. Bu işlemin yapılmasındaki amaç, elde edilen ham ekstraktan bileşenlerin polaritelerine göre ayrışmaları ve fenolik bileşen açısından daha zengin fraksiyonlar elde edilmesidir. Şekil 4.1'de hekzan ekstraksiyonuna ait 5 aşama görülmektedir. Elde edilen ham ekstraktın önce hekzan ile muamele edilmesi hekzanın apolar bir çözücü olması nedeniyle dir. Hekzan lipofilik molekülleri oldukça iyi çözer, bu yüzden ekstraktta bulunan klorofilleri ve yağları başarılı bir şekilde ham ekstraktan uzaklaştırabilir. Bu işleme yağsızlaştırma veya yağdan arındırma da denir. Her aşama da n-hekzan fazının renginin giderek açıldığı ve yeşilden sarıya döndüğü net bir şekilde görülmektedir. Bu işlem sayesinde ekstrakt yağlardan arındırıldığı için tamamen kurutulabilmektedir. (Otsuka vd. 2006).



Şekil 4.1. Ham metanolik ekstrakta n-hekzan ekstraksiyonun uygulanma aşamaları.

40,0 g öğütülmüş kuru bitki parçaları ile yola çıkılarak hazırlanan ham metanolik ekstrakt çözeltisinden çözgenin uzaklaştırılması sonucunda 4,706 g kuru ekstrakt elde edilmiştir. Buradan hekzan muamelesi yapıldıktan sonra hekzan fazından elde edilen ekstrakt 0,615 g ve metanol fraksiyonundan elde edilen ekstrakt ise 2,980 g'dır. Aradaki kütle farkı hekzan muamelesi sonucu klorofil ve yağların uzaklaştırılması ile oluşmaktadır. Sonraki işlemler için metanol ekstraktının 1 gramı kullanılarak 0,895 g kloroform ve 0,097 g su ekstraktları elde edilmiştir. n-bütanol ve etil asetat fraksiyonlarından elde edilen madde miktarı oldukça az (<0,005 g) olduğu için çalışma kapsamından çıkarılmışlardır.

Elde edilen metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının karakterizasyonu için fenolik bileşen profilleri elde edilerek incelenmiştir. Bu inceleme UHPLC-MS/MS cihazı ile yapılmıştır. 29 adet standart bileşik kullanılarak fraksiyonların fenolik içeriği analiz edilmiş ve 21 adet bileşik tespit edilmiştir. Yani, 8 adet bileşik incelenen fraksiyonlarda belirlenememiştir. Bunların yanı sıra, iki bileşik sadece metanol fraksiyonunda çok düşük miktarda belirlenebilmiştir. Varlıkları belirlenen bileşiklerin miktarları $\mu\text{g} / \text{g}$ KF cinsinden çizelge 4. 1' de verilmiştir.

D. hastata bitkisi Lamiaceae ailesine ait monotipik endemik bir türdür. Lamiaceae ailesi üzerine yapılan önceki araştırmalar, polifenolik bileşimlerini kapsamlı bir şekilde ortaya koymuştur. Bu aileyi karakterize eden temel polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Fenolik asitlerin, Lamiaceae ailesi içerisindeki farklı cinsler arasında geniş bir dağılım gösterdiği ve türlerine ve bolluğuna göre çeşitlilik sergilediği belirtilmiştir. (Hossain vd. 2010; Ahn vd. 2020; Spréa vd. 2022; Moshari-Nasirkandi vd. 2023). En sık rapor edilen fenolik asit bileşikleri arasında şunlar yer alır; kafeik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, ferulik asit, gallik asit, rosmarinik asit, vanilik asit, p-kumarik asit.

Özellikle, klorojenik asit ve kafeik asit, Lamiaceae ailesindeki farklı cinsleri ayırt etmek için önemli kemo taksonomik belirteçler olarak önerilmiştir (Mišić vd. 2015).

D. hastata bitkisi de bu aileye ait bir tür olduğu için ekstraktlarında literatürde gösterilen fenolik bileşiklerin varlığı beklenmektedir. Erkan ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada en geniş fenolik bileşen yelpazesini elde etmek için *D. hastata*'nın metanol, etil asetat, su, aseton ve petrol eteri ekstraktlarını elde etmişler ve içerdikleri fenolik bileşiklerini analiz etmişlerdir. Çalışmada analiz edilen serbest fenolik asitler arasında klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve rosmarinik asit bulunmaktadır. Serbest flavonoidler olarak kuersetin, kaempferol, apigenin ve mirisetin belirlenmiştir. Ayrıca, abietan diterpenoid sınıfına ait serbest fenolik bileşiklerden olan karnosik asit ve karnosolün varlığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.1'de listelenmiş olan fraksiyonların fenolik bileşen içerik sonuçları literatürle oldukça uyumludur. Tüm fraksiyonlarda en çok gözlenen bileşikler karnosol, karnosik asit, rutin, ferulik asit ve rosmarinik asittir. Fenolik bileşenlerin miktarları fraksiyonlara göre farklılık göstermiştir. Şekil 4.2 'de fenolik bileşiklerin fraksiyonlara göre dağılımı yığılmış sütun grafiği şeklinde verilmiştir. Özellikle metanol ve su fraksiyonları fenolik içerik açısından oldukça zengin bulunmuştur. En dikkat çekici bileşenlerden bazıları ve fraksiyonlara göre miktarları şu şekildedir:

Karnosik asit, fraksiyonlar içerisinde en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşen olmuştur. Sadece hekzan fraksiyonunda ikinci en yüksek miktarda bulunan madde olmuştur. Metanol fraksiyonunda 5622,18 µg/g KF ile maksimum değere ulaşmıştır. Karnosol, karnosik aside benzer şekilde yüksek miktarda bulunmuş ve metanol fraksiyonunda 2790,19 µg/g KF olarak ölçülmüştür. Bu iki bileşen, özellikle antioksidan aktivite, antikanser, anti-enflamatuvar ve nöroprotektif etkileri ile bilinmektedirler (Mantzourani vd. 2023).

Rutin bileşiği ise, metanol fraksiyonunda 2272,38 µg/g KF ile üçüncü en bol bulunan fenolik bileşen olarak tespit edilmiştir. Hekzan (1447,20 µg/g KF), kloroform (1118,01 µg/g KF) ve su (570,29 µg/g KE) fraksiyonlarında da önemli miktarlarda rutin bulunmuştur. Rutin, literatürde anti-enflamatuvar, antikanser ve antidiyabetik etkileri ile bilinmektedir (Negahdari vd. 2021). Ferulik asit, metanol fraksiyonunda 585,71 µg/g KF ile yüksek bir miktarda bulunmuş ve su fraksiyonunda (288,17 µg/g KF) da dikkate değer miktarlarda tespit edilmiştir. Bu bileşen, serbest radikal temizleme kapasitesi ve nöroprotektif etkileri ile öne çıkmaktadır (Kumar ve Pruthi, 2014). Kaempferol bileşiği, tüm fraksiyonlarda tespit edilmiştir ve en yüksek miktarı metanol fraksiyonunda (166,50 µg/g KF) bulunmuştur. Rosmarinik asit, metanol fraksiyonunda 128,87 µg/g KF ve su fraksiyonunda 54,51 µg/g KF olarak ölçülmüştür.

Erkan ve arkadaşları (2011) *D. hastata* bitkisine ait 10 adet fenolik bileşen göstermişlerdir ve bu bileşenlerin tamamı elde ettiğimiz analiz sonuçlarında da görülmektedir. Bununla birlikte bu tez çalışmasında ilk kez *D. hastata* bitkisinde rutin, gallik asit, kaftarik asit, kateşin, epigallokateşin gallat, epikateşin gallat, epikateşin, siyanidin ve delfinidin bileşiklerinin varlığı gösterilmiştir.

Fraksiyonlarda özellikle rutin karnosik asit ve karnosoldan sonra en çok bulunan bileşen olduğunun gösterilmesi *D. hastata*'nın biyolojik aktivitelerini ve potansiyelini anlamak için oldukça önemlidir.

Çizelge 4.1. *D. hastata* bitkisinin metanolik ekstraksiyonunun metanol, hekzan, kloroform, su fraksiyonlarına ait UHPLC-MS/MS cihazı ile elde edilmiş fenolik bileşen analiz sonuçları.

<i>D. Hastata</i> 'da bulunan fenolik bileşenlerin oranı (µg / g KF) ^(a)				
Fenolik Bileşen	Metanol	Hekzan	Kloroform	Su
Apigenin	41,76	6,47	20,13	37,21
Butein	T.E. ^(b)	T.E.	T.E.	T.E.
Delfinidin	50,12	9,06	21,20	22,00
Epikateşin	15,32	2,68	7,21	16,92
Epikateşin gallat	1,13	0,21	0,48	0,50
Epigallokateşin	0,08	T.E.	T.E.	TE
Epigallokateşin gallat	0,90	0,18	0,40	0,72
Ferulik asit	585,71	90,67	264,74	288,17
Gallik Asit	19,15	3,24	8,39	15,41
Gallokateşin	0,07	T.E.	T.E.	T.E.
Kafeik asit	10,49	1,98	4,98	4,74
5-Kafeoilquinik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Kaftarik asit	158,17	28,53	77,82	75,13
Kaempferol	166,50	31,10	77,75	78,42
Karnosik Asit	5622,18	987,25	2175,78	3625,56
Karnosol	2790,19	431,92	1180,25	1972,77
Kateşin	21,69	3,67	10,22	12,40
Klorojenik asit	53,21	10,02	29,83	22,51
Kriptoklorojenik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Kuersetin	17,75	13,37	8,36	6,87

Devamı arkada

Çizelge 4.1'in devamı

Naringenin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Luteolin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
p-Kumarik asit	51,81	7,68	21,92	22,74
Rosmarinik asit	128,87	24,07	60,18	54,51
Rutin	2272,38	1447,20	1118,01	570,29
Sirinjik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Sinamik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
Siyanidin	82,75	14,53	32,03	37,32
Vanilik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

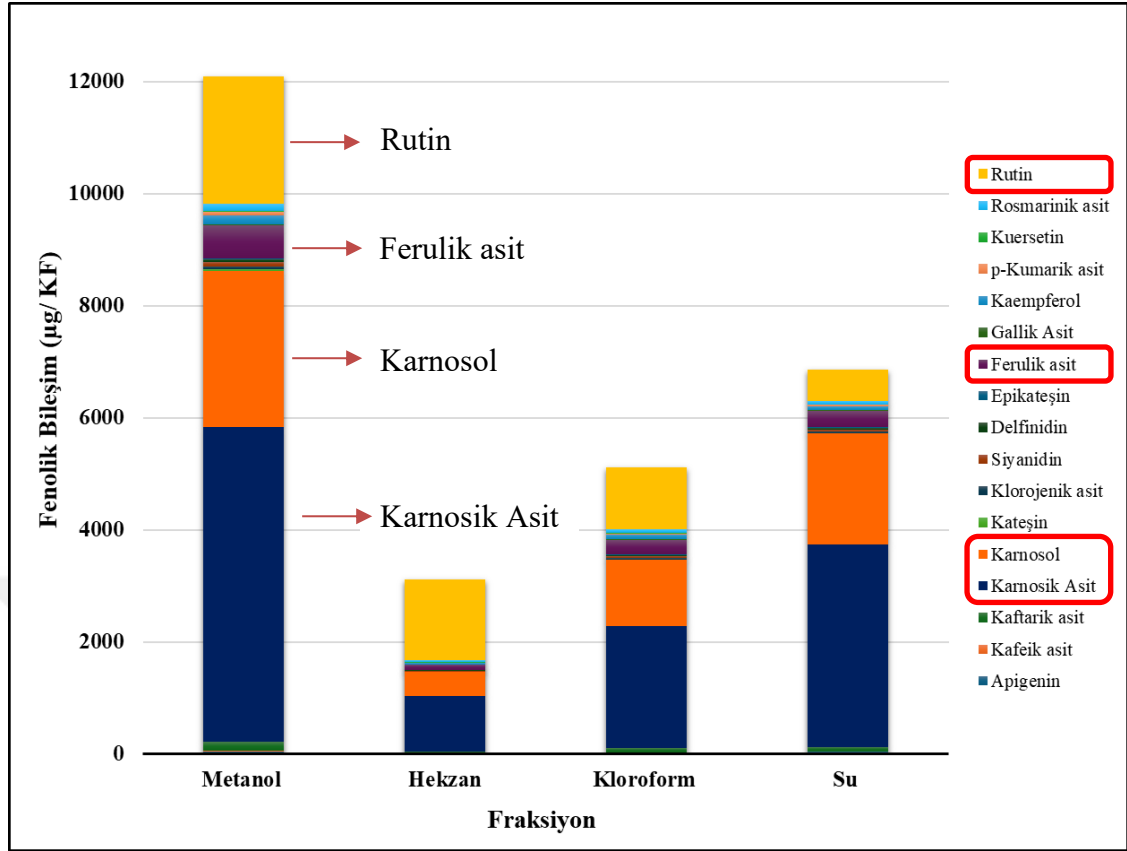
(a): Sonuçlar 1 gram kuru fraksiyondaki μg bileşen olarak verilmiştir.

(b): T.E. tespit edilemedi. Tespit limiti $<0,05 \mu\text{g/g}$

Fenolik bileşiklerin metanol, hekzan, kloroform ve su çözücülerindeki dağılımı şekil 4.2'te verilen grafikte görselleştirilmiştir. Genel dağılım ve çözücü tercihlerine bakıldığında; bileşiklerin çözünürlüğü açısından metanol > su > kloroform > hekzan sıralaması görülmektedir. Metanol, birçok fenolik bileşiğin en yüksek miktarda bulunduğu çözücü olmuştur. Bunun nedeni metanolün hem polar hem hafif apolar bileşikler çözebilmesidir. Su, özellikle karnosik asit, karnosol ve ferulik asit gibi bazı bileşikler yüksek miktarlarda içererek metanolden sonra ikinci sırada yer almıştır. Hekzan, apolar bir çözücü olduğu için genel olarak düşük çözünürlük gösterir ancak rutin gibi lipofilik karakteri daha yüksek bileşikler çözümüştür. Kloroform, orta polariteye sahip bileşikler belirli seviyelerde çözöbilmektedir.

Öne çıkan bileşikler ve çözücü dağılımlarını incelediğimizde;

- Karnosik Asit ve Karnosol: Bu bileşikler hem metanol hem de suda yüksek konsantrasyonda bulunmuştur. Bunun nedeni, fenolik halkalar ve lipofilik bölgeler içermeleri nedeniyle su ve metanolde çözünürlüğünün yüksek olması olabilir.
- Ferulik Asit: Metanol ve su çözücüler bu bileşiği en iyi çözen çözücülerdir. Fenolik asitlerin genellikle polar çözücülerde çözünmesi beklenmektedir.
- Rutin: Metanol > Hekzan > Kloroform > Su sıralaması görölüyor. Bu bileşiğin hafif lipofilik ve flavonoid yapıda olması, hem metanol hem de apolar çözücülerde çözünmesini sağlamıştır.



Şekil 4.2. *D. hastata* bitkisine ait fenolik bileşenlerin farklı çözücülerdeki dağılımı

Şekil 4.3'te ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin molekül yapıları gösterilmektedir. Bu çizimler Chem Draw Ultra 12.0 programı ile çizilmiştir. Moleküllerin yapılarını inceleyince sahip oldukları -OH ve -COOH grupları sayesinde polaritelerinin arttığını söyleyebiliriz ancak birçoğu uzun karbon zincirlerine ve siklik yapıya sahiptir bu da onlara apolar özellik de kazandırmaktadır. Bu sayede ekstrakta bir arada durduklarında birbirleriyle yaptıkları ikincil etkileşimler sayesinde birlikte çözünebilirler ve bu nedenle aynı molekül polaritesi farklı olsa bile birden fazla çözgüde gözlemlenebilir.

Farklı polaritedeki çözücülerle fraksiyonlama işlemi sonucunda, *D. hastata* ekstraktının her fraksiyonunda aynı moleküllerin farklı miktarlarda bulunması, fenolik bileşiklerin kimyasal özellikleri ve ekstraksiyon dinamikleriyle ilişkilidir. Bu durumu açıklamak için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır:

- Fenolik Bileşiklerin Yapısal Özellikleri:

Fenolik bileşikler, yapılarındaki aromatik halkalar ve hidroksil grupları nedeniyle hem polar hem de apolar özellikler gösterebilirler. Bu amfipatik yapı, onların farklı polaritedeki çözücülerde çözünmelerine olanak tanır. Örneğin, flavonoidler ve fenolik asitler gibi bileşikler, hem su hem de organik çözücülerde belirli oranlarda çözünürler (Shi vd. 2022).

- Çözücü Polaritesi ve "Benzer Benzeri Çözer" Prensi:

Ekstraksiyon işlemlerinde, "benzer benzeri çözer" prensibi geçerlidir; yani, bir bileşik, polaritesi kendisine yakın olan bir çözücüde daha iyi çözünür ancak fenolik bileşikler karmaşık yapıları nedeniyle, tek bir çözücüde tamamen çözünmeyebilirler ve bu da onların birden fazla çözücüde kısmi çözünmelerine yol açar (Zhang vd. 2018).

- Nernst Dağılım Yasası ve Dağılım Dengesi:

Fenolik bileşikler, farklı polaritedeki çözücüler arasında belirli bir dağılım dengesi kurarlar. Nernst Dağılım Yasası'na göre, bir bileşiğin iki karışmayan çözücü arasındaki dağılımı, belirli bir sıcaklıkta sabit bir orana sahiptir. Bu nedenle, aynı bileşik, farklı çözücülerde farklı konsantrasyonlarda bulunabilir (Bock vd. 2021).

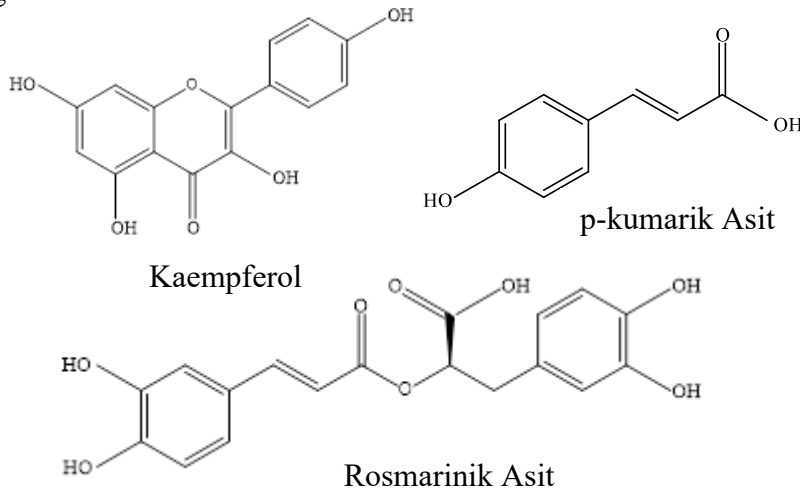
- Zayıf İntermoleküler Etkileşimler ve Hidrojen Bağları:

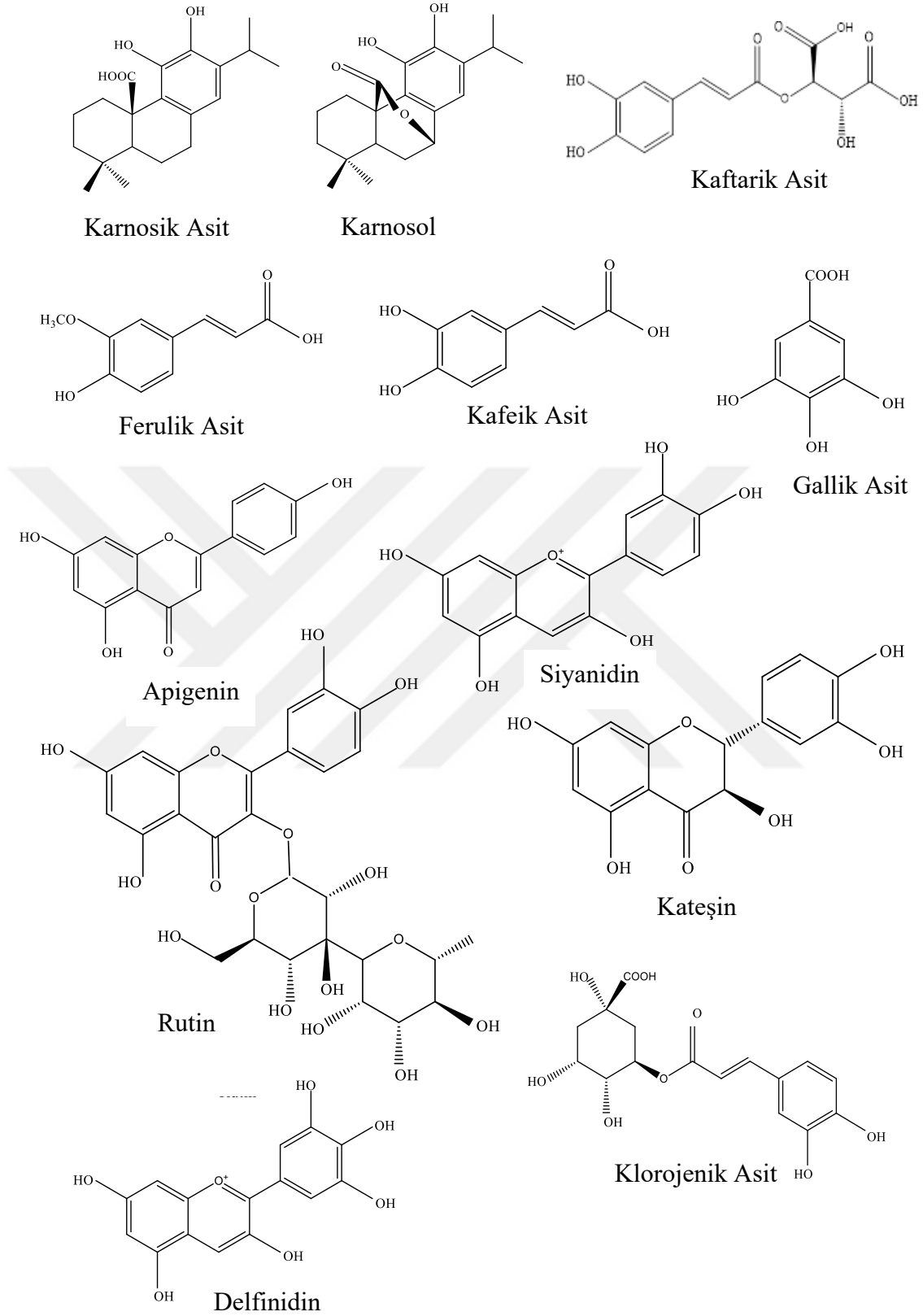
Fenolik bileşikler, çözücülerle hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri gibi zayıf intermoleküler etkileşimler kurabilirler. Bu etkileşimler, bileşiklerin birden fazla çözücüde çözünmesine katkıda bulunur (Khoddami vd. 2013).

- pH ve İyonizasyon Durumu:

Fenolik bileşiklerin iyonizasyon durumu, çözücünün pH'ına bağlı olarak değişir. Bu da onların farklı çözücülerdeki çözünürlüklerini etkiler. Örneğin, fenolik asitler, pH değişikliklerine duyarlıdır ve bu nedenle farklı çözücülerde farklı çözünürlük davranışları sergileyebilirler (Shi vd. 2022).

D. hastata ekstraktının farklı polaritedeki çözücülerle fraksiyonlanması sonucunda, aynı fenolik bileşiklerin her fraksiyonda bulunması, bu bileşiklerin yapısal özellikleri, çözücü polaritesi, dağılım dengesi ve pH gibi faktörlerle açıklanabilir. Bu durum, fenolik bileşiklerin ekstraksiyon ve fraksiyonlama süreçlerinde dikkate alınması gereken önemli bir husustur.

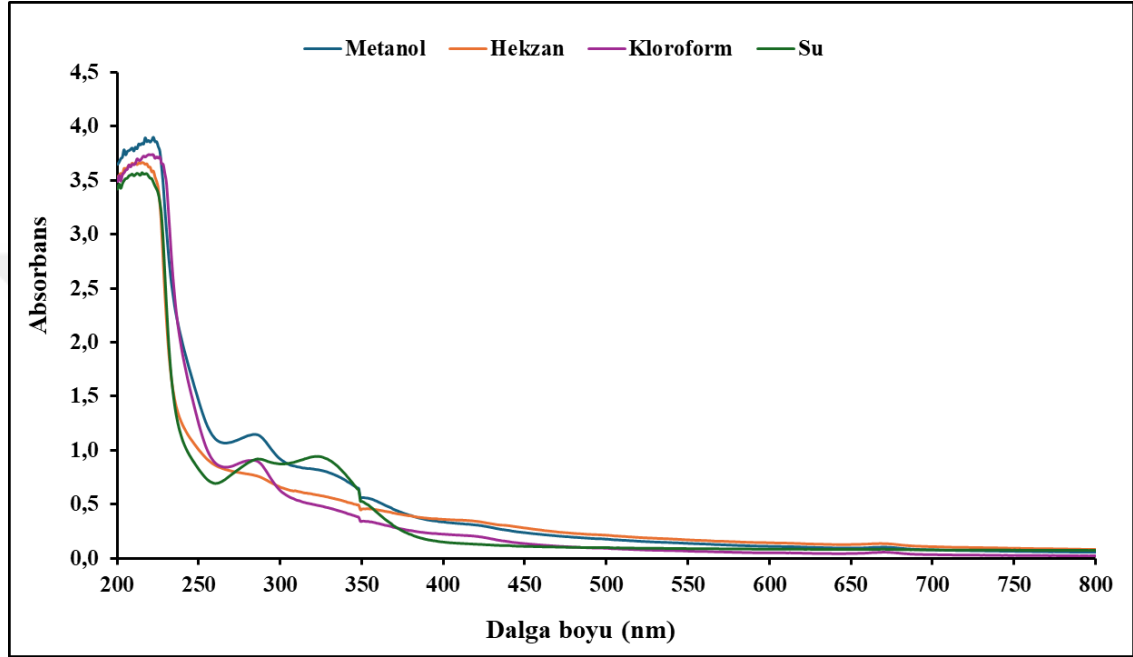




Şekil 4.3. Fraksiyonlarda tespit edilen 15 adet fenolik bileşiğin molekül yapıları. Kateşin türevleri için temsilen kateşin molekülü çizilmiştir (ChemDraw Ultra 12.0 ile çizilmiştir).

4.1.1. Fraksiyonların UV-Vis Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının spektral özelliklerini belirlemek ve biyolojik aktivite ölçümlerinde olası spektrofotometrik girişim riskini değerlendirmek amacıyla UV-Vis spektrofotometrisi ile 200–800 nm dalga boyu aralığında tarama yapılmıştır (Şekil 4.4). Fraksiyonlar öncelikle %10 DMSO içinde çözündürülerek 1 mg/mL derişimde stok çözeltiler hazırlanmış, ardından bu stoklardan ultra saf su ile uygun seyreltmeler yapılarak 100 µg/mL son derişime getirilmiştir.



Şekil 4.4. Fraksiyonların 200-800 nm aralığındaki UV-Vis spektrumu

Elde edilen spektrumlar incelendiğinde, tüm fraksiyonların 200–350 nm aralığında belirgin absorbans pikleri gösterdiği tespit edilmiştir. Bu absorbans bölgeleri, literatürde de belirtildiği üzere fenolik bileşikler, flavonoidler ve diğer aromatik yapıların karakteristik emilim bölgeleri ile uyumlu bulunmuştur (Dai ve Mumper, 2010). Özellikle metanol fraksiyonunun bu bölgede en yüksek absorbans değerlerini göstermesi, fenolik içerik açısından zenginliğine işaret etmektedir.

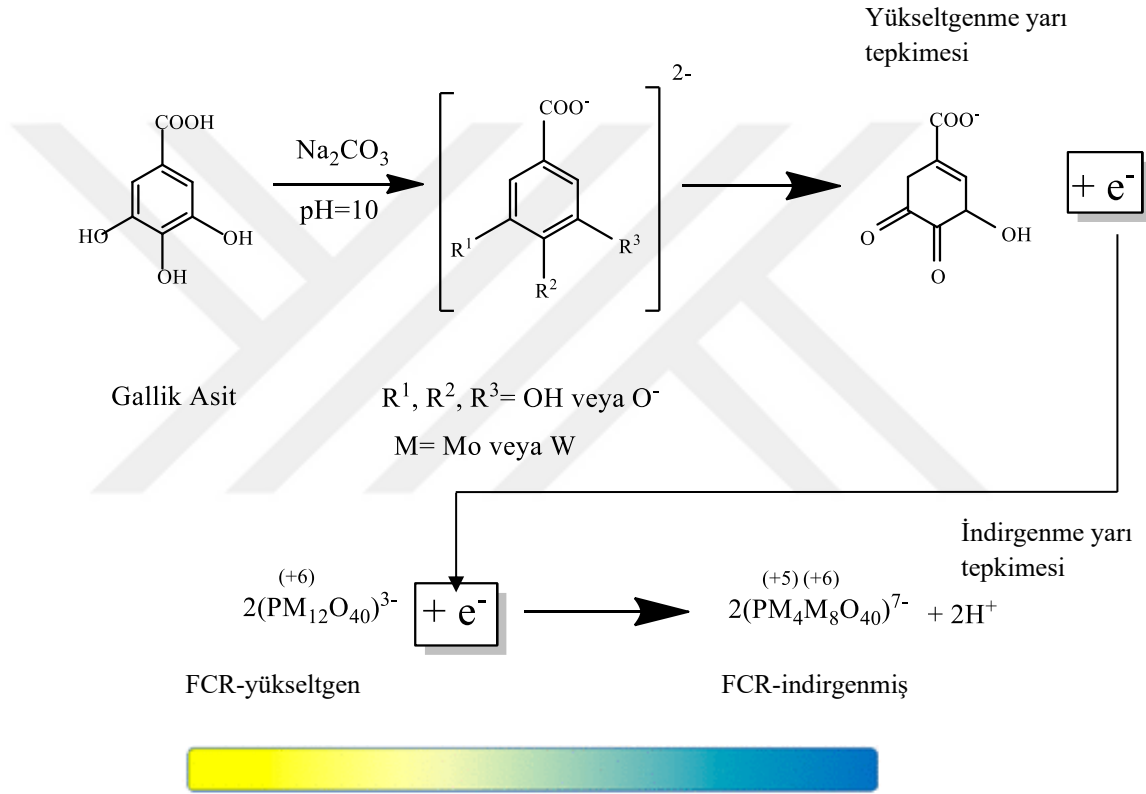
Bununla birlikte, biyolojik aktivite testlerinde ölçüm yapılan dalga boyları olan 405 nm (α -glukozidaz), 412 nm (asetilkolinesteraz) ve 620 nm (α -amilaz) bölgelerinde fraksiyonların kayda değer bir absorbans göstermediği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, deneysel ölçümlerde fraksiyonların kendilerinden kaynaklanabilecek doğrudan spektroskopik girişim riskinin bu derişim için düşük olduğunu ve ölçümlerin güvenilirliğini desteklemektedir.

Sonuç olarak, spektral analizler hem fraksiyonların fenolik bileşikler bakımından beklenen spektral özellikleri sergilediğini hem de biyolojik aktivitelerin değerlendirildiği dalga boylarında anlamlı bir girişim oluşturmadığını ortaya koymuştur. Bu durum, biyolojik aktivite sonuçlarının ekstrakt kaynaklı absorbans etkisinden bağımsız olarak yorumlanabileceğini göstermektedir.

4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Bileşen Tayini

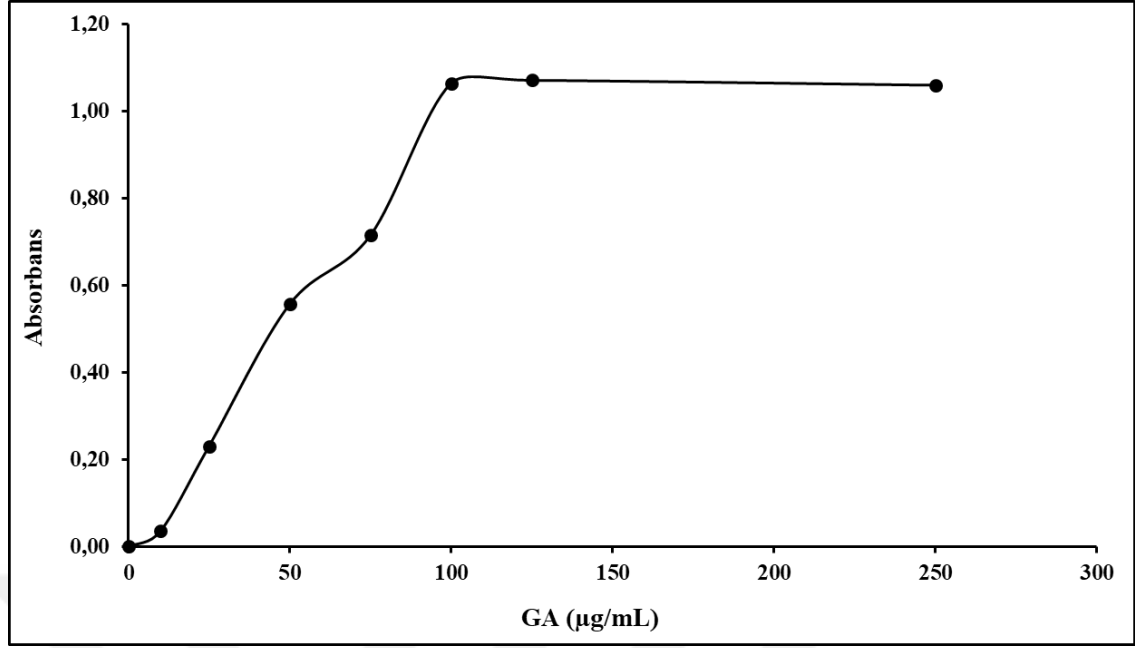
Elde edilen fraksiyonların toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşen tayinleri materyal metot bölümünde ayrıntıları ile verilen sırasıyla Folin-Ciocalteu ve AlCl_3 yöntemlerine göre yapılmıştır. Şekil 4.5 ve şekil 4.8’de bu yöntemlere ait reaksiyon mekanizmaları ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Şekil 4.5’te de gösterildiği gibi toplam fenolik bileşen tayininde bir redoks tepkimesi gerçekleşir. Bu tepkime fenolik bileşenlerde bulunan $-\text{OH}$ ve $-\text{COOH}$ gruplarının yükseltgenmesini ve FC reaktifinin indirgenmesini içerir. Buda UV-Visible spektrofotometre de sarıdan maviye değişen bir renkle takip edilir (Perez vd. 2023).



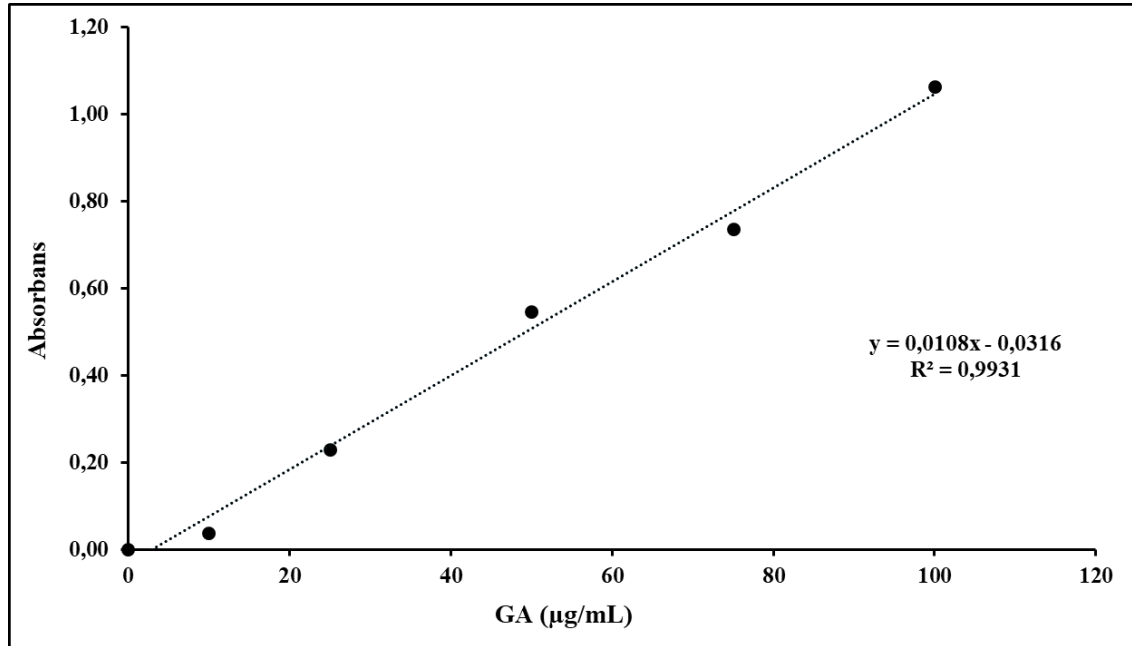
Şekil 4.5. Toplam fenolik bileşen tayininde Folin-Ciocalteu metoduna ait reaksiyon mekanizması (Perez vd. 2023).

Toplam fenolik bileşen tayininde fraksiyonların içerdiği fenolik bileşenler belirlenen bir standart fenolik bileşene göre hesaplanır. Bu çalışmada standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asidin standart bileşik olarak seçildiği yöntemin doğrusallığının belirlenmesi için artan GA derişimine karşı absorbans grafiği çizilmiştir. Şekil 4.6’da verilen grafikte gallik asit derişiminin artışıyla Lambert-Beer yasasından sapma oldukça belirgin bir şekilde görülmektedir. Bunun için 0-250 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında sekiz derişim çalışılmış ve 125 $\mu\text{g/mL}$ derişiminden itibaren doğrusallıktan sapma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. Farklı derişimlerdeki gallik asidin 760 nm'deki absorbands değerleri

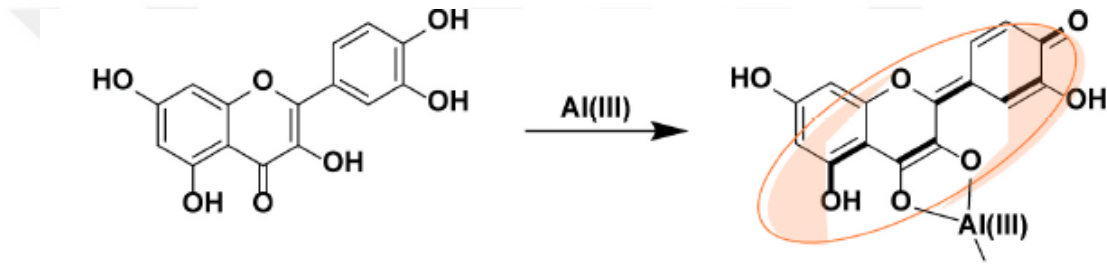
Bu sonuçtan yararlanarak çizilen şekil 4.7'de verilen standart kalibrasyon grafiği 0-100 µg/mL aralığındaki 5 derişim değeri kullanılmış ve doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Elde edilen grafiğin R^2 değeri 0,9931'dir. Bu değer bu grafiğin standart kalibrasyon grafiği olarak kullanılabileceğini gösterir. Doğru denklemi $y = 0,0108x - 0,0316$ olarak belirlenmiştir. Buna göre, ölçümleri yapılan çeşitli fraksiyonlardan elde edilen absorbands değerleri denklemde yerine konularak gallik asit eşdeğeri cinsinden 1 g kuru fraksiyondaki toplam fenolik bileşen değeri hesaplanmıştır.



Şekil 4.7. 760 nm'de gallik asidin standart kalibrasyon grafiği.

Elde edilen sonuçlar çizelge 4.2’de verilmiş ve toplam flavonoid değerleri ile birlikte yorumlanmıştır.

Bitkilerdeki toplam flavonoid içeriği (TFC) genellikle kolorimetrik yöntemle belirlenir. Bitki ekstraktlarında TFC’nin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, Al(III)’ün bir kompleksleşme ajanı olarak kullanıldığı alüminyum klorür kolorimetrik testidir. Bu test, 1960 yılında Christ ve Müller tarafından ilaçlardaki flavonol türevlerinin belirlenmesi amacıyla önerilmiştir (Christ ve Müller, 1960). Yöntem, Al(III)-flavonoid şelatlarının oluşumuna dayanmaktadır. Çok sayıda oksijen ve hidroksil grubu içermeleri nedeniyle, flavonoidlerin Al(III) gibi metal iyonlarına bağlanma eğilimleri yüksektir ve bu bağlanma genellikle 1:1 oranında gerçekleşir. Bu oran, pH değeri gibi deneysel koşullara bağlıdır (Kasprzak, Erxleben ve Ochocki, 2015; Pyrzynska ve Pękal, 2011).

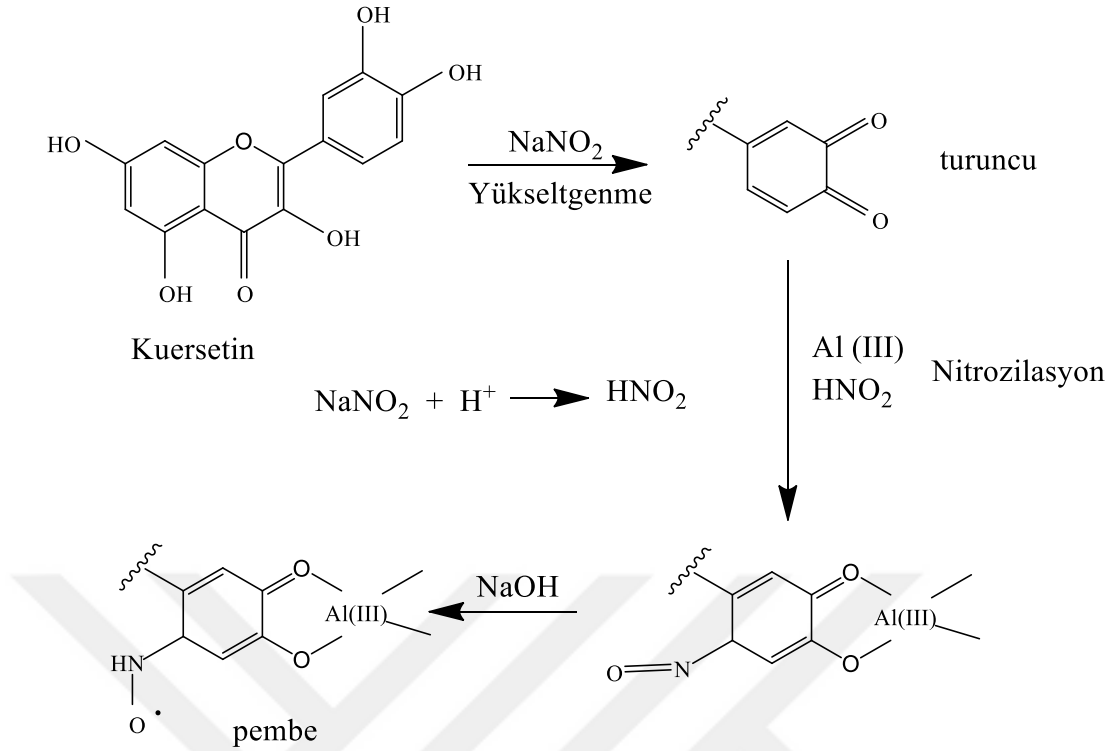


Şekil 4.8. Kuersetin-Al(III) kompleksine ait bir illüstrasyon (Shraim vd. 2021).

Şekil 4.8’de kuersetinin Al(III) ile oluşturduğu komplekse ait bir illüstrasyon ve şekil 2.7’de ise flavonoidlerin genel yapısı yer almaktadır. Flavonoidlerin metal bağlanma bölgeleri genellikle şu üç noktadadır;

- 3-hidroksi – 4-karbonil grupları (3–4 bölgesi, B halkasında),
- 5-hidroksi grubu (A halkasında) – 4-karbonil grubu (C halkasında) (4–5 bölgesi),
- 3’,4’-dihidroksi grupları (3’–4’ bölgesi, C halkasında) (Şekil 4.8) (Shraim vd. 2021).

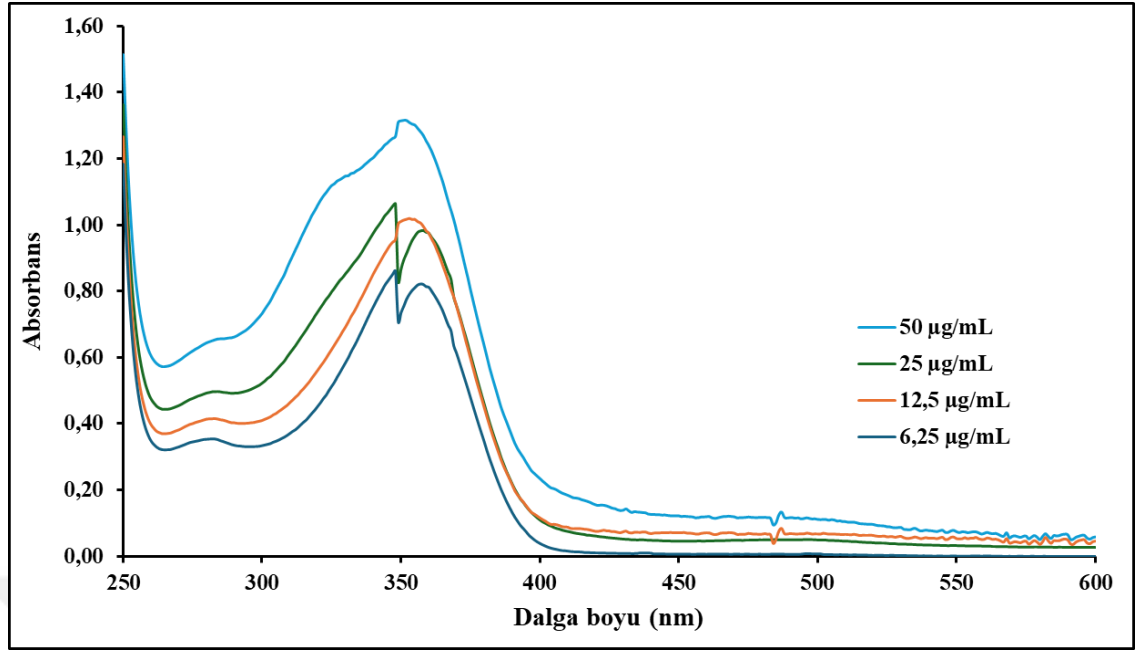
Şekil 4.9’da Al(III) iyonlarının kuersetin ile oluşturduğu komplekse ait nitrozilasyon basamağını da içeren reaksiyon mekanizması görülmektedir. Sarıdan pembeye doğru bir renk değişimi izlenir ve pembe renk komplekse aittir. Böylece ekstraktta bulunan toplam flavonoid bileşen miktarı kuersetin eşdeğeri üzerinden hesaplanabilir (Mekonnen ve Desta 2021).



Şekil 4.9. Toplam flavonoid bileşen tayininde AlCl_3 metoduna ait reaksiyon mekanizması (Mekonnen ve Desta 2021).

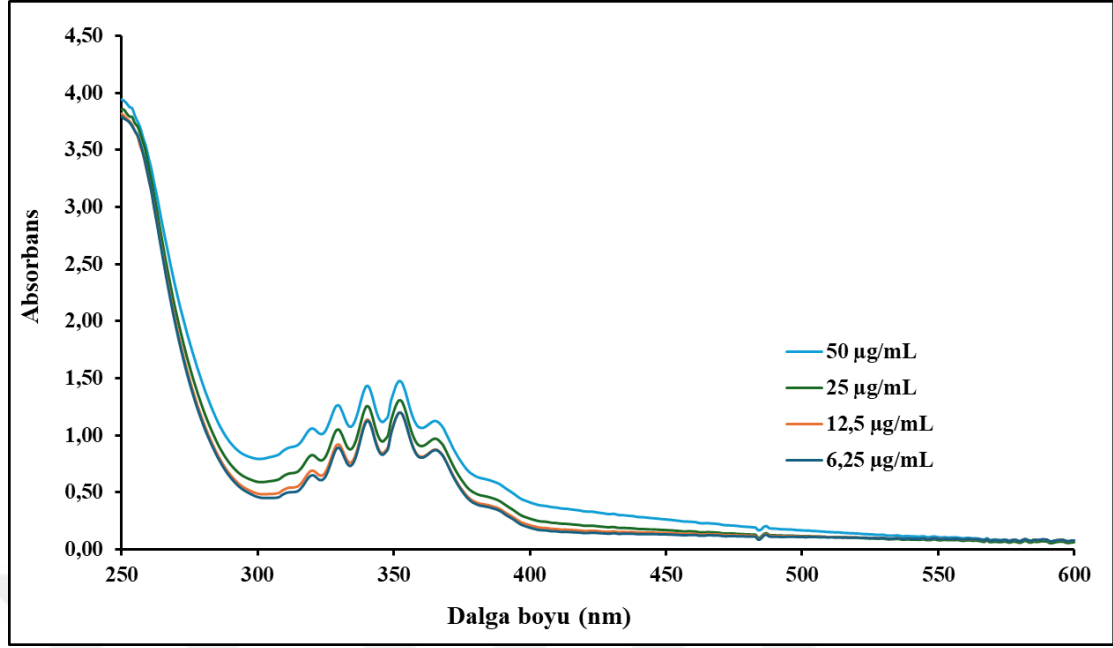
Toplam flavonoid bileşen tayininde standart bileşik olarak kuersetin seçilmiştir. Ancak AlCl_3 metodunda birden fazla yöntem kullanılmaktadır ve bu yöntemler seçilen standarda, çözücüye, ortamın pH'ına ve NaNO_2 ile nitrozilasyon yapılıp yapılmamasına göre değişir ve farklı dalga boylarında okuma yapılır. Bu nedenle uygun olan yöntemi bulabilmek için önce şekil 4.8'de mekanizması gösterilen NaNO_2 ilavesiyle olan yöntem daha sonra CH_3COONa ilavesiyle olan yöntem denenmiştir.

Şekil 4.10'da kuersetinin NaNO_2 varlığında 250-600 nm dalga boyu aralığında taranmasına ait spektrum gösterilmektedir. Ortama henüz AlCl_3 ilavesi yapılmadığı için kompleksleşme gözlenmez. Buradaki amaç farklı derişimlerdeki kuersetin ile elde edilen spektrumdan λ_{max} değerini ve Al(III) eklenmesi sonrasında kuersetinin oluşturduğu kompleksin λ_{max} değerini varsa λ_{max} 'daki kaymayı belirleyebilmektir. Lambert-Beer yasası gereği derişim arttıkça absorbans da artar, yani derişim absorbans ile doğru orantılı olmalıdır, ancak şekil 4.10'da görüldüğü üzere 12,5 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerdeki absorbans değerleri üst üste çakışmıştır.



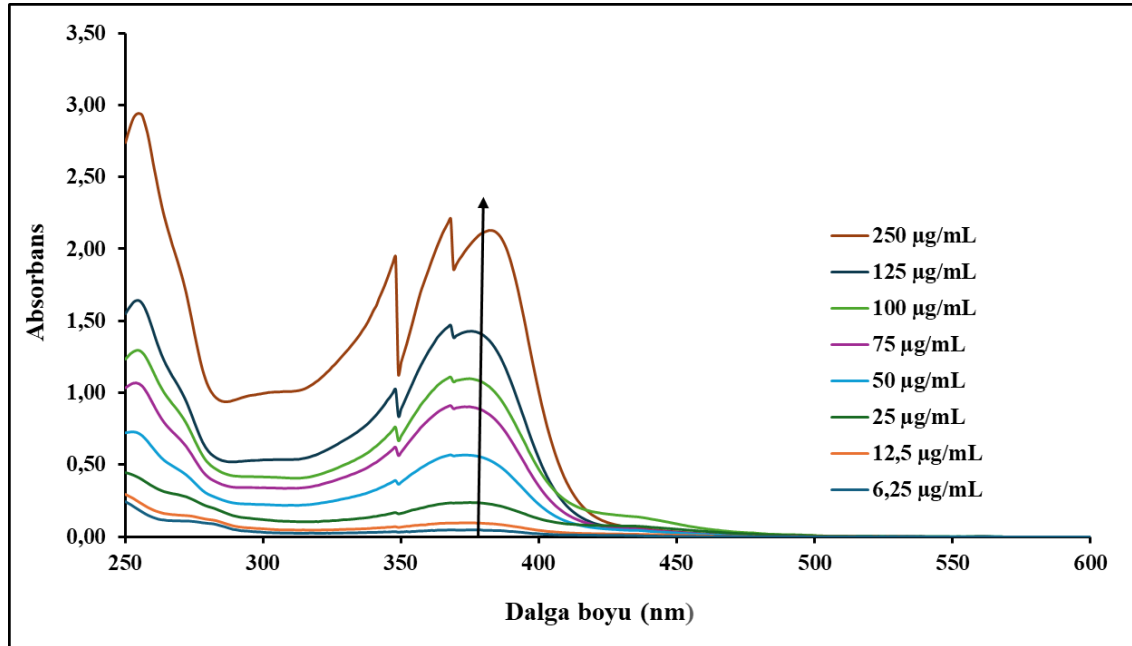
Şekil 4.10. Kuersetinin NaNO_2 varlığında UV-Vis spektrumu.

Şekil 4.11 kuersetinin NaNO_2 varlığında Al^{3+} ile oluşturduğu komplekse ait UV-Visible spektrumunu göstermektedir. Sodyum nitritin ortama AlCl_3 'den önce ilavesi aslında aromatik vicinal diollerin (birbirine komşu hidroksil grupları olan bileşikler) yükseltgenmesini ve uygun pH ortamında Al^{3+} iyonların varlığında hem nitrozillenmesi hem de kompleksleşmesi gerçekleşmektedir. Sonrasında ortamın bazikleştirilmesi ile nitro grubuna dönüşüm gerçekleşince oluşan türevler pembe-kırmızı renge dönüşür (Barnum, 1977). Bu türevler, yaklaşık 500 nm'de yeni bir absorpsiyon bandının ortaya çıkmasıyla karakterize edilir. Bu açıdan şekil 4.10 ve şekil 4.12 karşılaştırıldığında şekil 4.10'da olan fakat şekil 4.12'de gözlenmeyen 450-550 nm aralığındaki pik bu türevlere aittir. Bu pikin şekil 4.10'da varlığı nitrozo grupların nitro grubuna dönüşümü ile kırmızı rengin oluşumunu gösterir ve bu renk oluşumu için kompleksleşmeye gerek olmadığını göstermektedir (Barnum, 1977). Fakat bu pikin absorbansı oldukça düşüktür ve 12,5-25 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde Lambert-Beer'den sapılması, şekil 4.11'de de görüldüğü gibi AlCl_3 ilavesi ile 350 nm bandındaki absorbans pikinin yarılması bu yöntemin güvenilir olmasını engellemiştir. Ancak Shraim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterdikleri gibi eğer standart olarak rutin kullanılsaydı bu kırmızıya kayma daha belirgin bir şekilde gözlenebilirdi. Kuersetinin bu yöntem için en uygun standart bileşiği olmadığına kanaat getirilmiş olsa da birçok araştırmacı tarafından halen kullanılmaktadır.

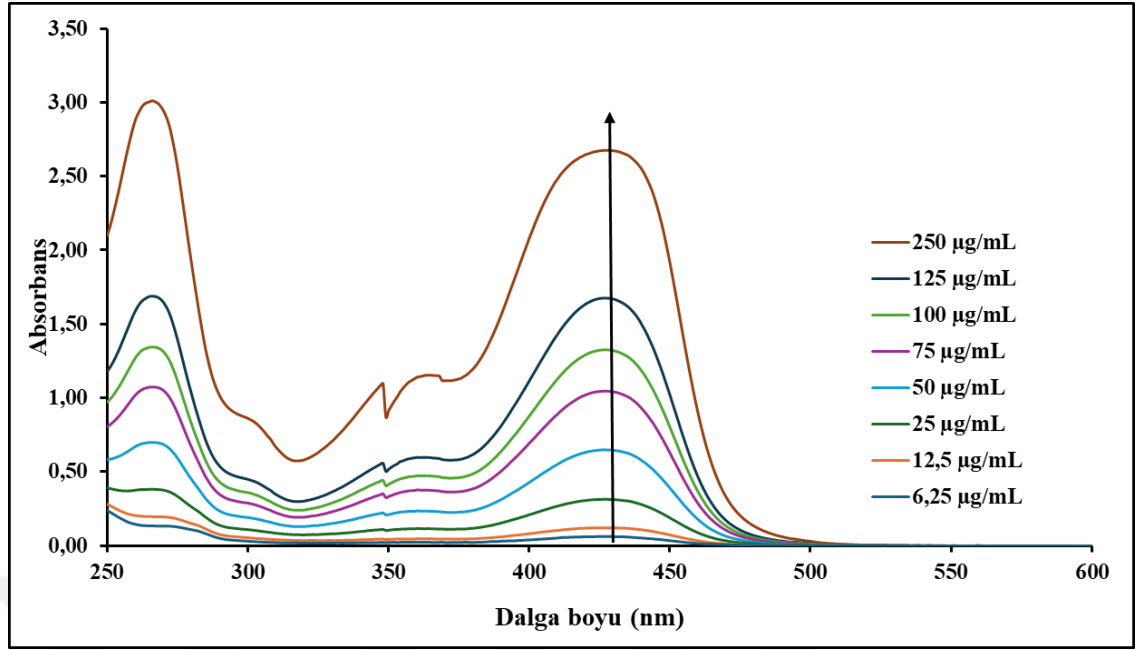


Şekil 4.11. Kuersetinin NaNO_2 varlığında Al^{3+} ile oluşturduğu komplekse ait UV-Vis spektrumu.

Şekil 4.12’de kuersetinin ortamda NaNO_2 olmadan, CH_3COONa varlığında kuersetinin UV-Vis spektrumu 250-600 nm dalga boyu aralığında gösterilmiştir. Shraim ve arkadaşları yaptıkları çalışmada CH_3COONa ’ın λ_{max} üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığını kanıtlamışlardır. Burada 0-250 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olacak şekilde sekiz farklı derişim seçilmiştir. Görüldüğü üzere derişim artışıyla absorbans artışı oldukça uyumludur.

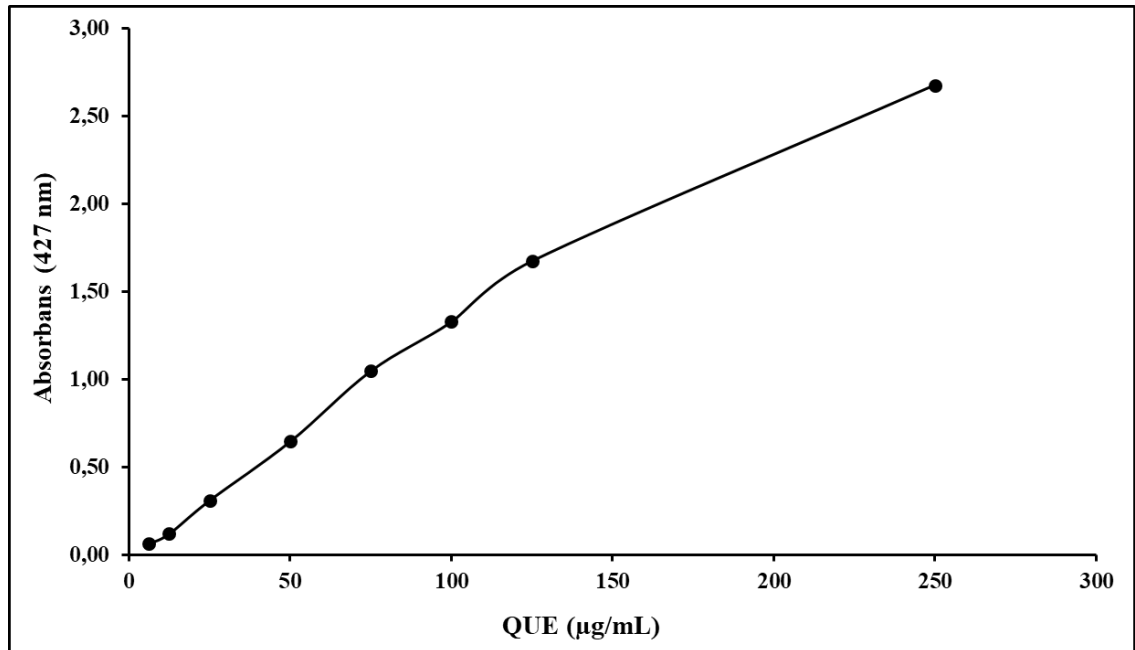


Şekil 4.12. Kuersetinin CH_3COONa varlığında UV-Vis spektrumu.



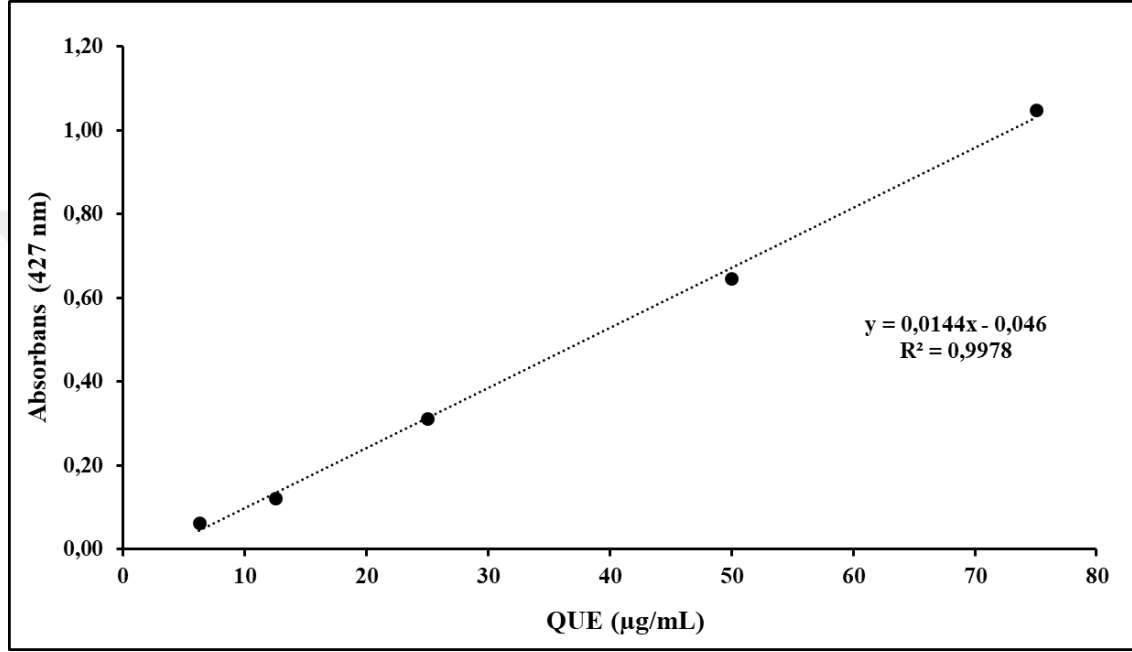
Şekil 4.13. Kuersetinin CH_3COONa varlığında Al(III) ile oluşturduğu komplekse ait UV-Vis spektrumu.

Şekil 4.13’de ise ortama AlCl_3 eklenmesiyle elde edilen UV-Vis spektrumu görülmektedir. Burada kuersetinin 3’,4’-dihidroksi grupları (3’-4’ bölgesi, C halkasında) ile Al(III) ’un yaptığı kompleks nedeniyle λ_{max} değerinde kırmızıya kayma (427 nm) belirgin bir şekilde görülmektedir. Derişim artışıyla birlikte absorbansın artışı ve λ_{max} değerinde derişime bağlı bir kaymanın olmayışı 427 nm’nin kalibrasyon grafiği çizebilmek için en uygun dalga boyu olduğunu gösterir.



Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki kuersetinin 427 nm’deki absorbans değerleri.

Şekil 4.14 kuersetinin 0-250 µg/mL aralığındaki sekiz farklı derişimine ait 427 nm'deki absorbans değerlerini gösterir. Burada görülüyor ki Lambert-Beer'den sapma 100 µg/mL derişim değeri civarında gerçekleşmektedir. Şekil 4.15'te 6,25-12,5-25-50-75 µg/mL derişimlerin kullanımı ile standart kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Grafikten elde edilen doğru denklemi $y = 0,0144x - 0,046$ ve R^2 değeri 0,9978'dir. Bu değeri standart kalibrasyon grafiğı için kabul edilebilir bir değerdir. Doğrunun denkleminde yararlanarak kuersetin eşdeğeri olarak fraksiyonların toplam flavonoid değeri hesaplanmıştır. Ancak elde edilen içerik analizine göre ekstraktta bol miktarda rutin olduğu için bu testin standardının rutin olması daha doğru sonuçlar verecektir.



Şekil 4.15. 427 nm'de kuersetinin $AlCl_3$ ile tespiti için standart kalibrasyon grafiğı.

Çizelge 4.2. Fraksiyonların toplam fenolik ve flavonoid bileşen değerleri (n=3 hata çubukları: $\pm SD$).

Fraksiyon	Toplam Fenolik İçerik		Toplam Flavonoid İçerik	
	mg GAE / g KF	% RSD	mg QE / g KF	% RSD
Metanol	300,93 $\pm$ 7,66	2,54	33,11 $\pm$ 0,12	0,37
Hekzan	82,21 $\pm$ 0,76	0,93	23,28 $\pm$ 0,32	1,36
Kloroform	223,96 $\pm$ 6,88	3,07	40,08 $\pm$ 0,70	1,75
Su	162,99 $\pm$ 3,98	2,44	49,39 $\pm$ 0,22	0,45

Çizelge 4.2.'de verilen toplam fenolik ve flavonoid bileşen değerlerine bakıldığında; *D. hastata* (*S. dorystoechas*) bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların toplam fenolik içerikleri, gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g KF) cinsinden belirlenmiş ve sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu gösterilmiştir ($p < 0,001$). Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonucunda elde edilen F değeri: 841,95 ve p-değeri: $2,44 \times 10^{-10}$, fraksiyonlar arasında ciddi düzeyde farklılık bulunduğunu ortaya koymuştur. Tukey HSD post-hoc analizi ise bu farkların istatistiksel olarak tüm fraksiyon çiftleri arasında anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). Özellikle metanol fraksiyonunun diğer tüm fraksiyonlara göre anlamlı şekilde daha yüksek fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir.

Bu bulgular, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çözücü polaritesinin belirleyici bir etken olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Polar çözücüler, özellikle metanol ve kısmen su, fenolik hidroksil grupları ile güçlü etkileşim kurarak bu bileşiklerin ekstraksiyon verimini artırmaktadır (Sultana vd. 2009). Nitekim literatürde *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, ve *Salvia plebeia* gibi türlerde de benzer şekilde metanol ekstraktlarının yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu ve bu ekstraktların antioksidan aktivitelerinin güçlü olduğu rapor edilmiştir (Tohma vd. 2016; Wojdyło vd. 2007).

Ayrıca, bu çalışmada UHPLC-MS/MS analiziyle metanol fraksiyonunda yüksek oranda karnosik asit (5622,18 µg/g), karnosol (2790,19 µg/g) ve rutin (2272,38 µg/g) gibi fenolik bileşiklerin bulunması, bu fraksiyonun fenolik maddece neden zengin olduğunu açıklamaktadır. Su ve kloroform fraksiyonlarında da anlamlı fenolik içerikler tespit edilmiş olup, özellikle karnosik asit ve rosmarinik asit gibi bileşiklerin su fraksiyonunda yüksek konsantrasyonlarda bulunması dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, *S. dorystoechas* bitkisinin özellikle metanol ekstraktının fenolik bileşikler açısından zenginliği, bu türün antioksidan, antienflamatuvar ve potansiyel nöroprotektif etkiler açısından araştırılmaya değer bir kaynak olduğunu göstermektedir. Ayrıca, polar çözücülerin tercih edilmesi, fenolik madde kazanımı açısından önemli bir ekstraksiyon stratejisi olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur.

Farklı fraksiyonlara ait toplam flavonoid içerikleri kuersetin eşdeğeri (mg QE/g KF) cinsinden belirlenmiş ve elde edilen değerler arasında anlamlı farklılıklar olduğu istatistiksel olarak doğrulanmıştır ($p < 0,001$). (ANOVA sonucu F değeri: 2232,55 p-değeri: $4,98 \times 10^{-12}$)

Tukey HSD post-hoc testi sonuçlarına göre tüm fraksiyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur ($p < 0,05$). Özellikle su fraksiyonunun diğer fraksiyonlara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek flavonoid içeriğine sahip olması, bu bileşiklerin yüksek polariteye sahip çözücülerle daha etkili şekilde ekstrakte edildiğini göstermektedir.

Literatürde *Salvia* cinsine ait türler üzerine yapılan benzer çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir. Örneğin, *Salvia officinalis* ve *Salvia fruticosa* gibi türlerde yapılan ekstraksiyon çalışmalarında, su ve etanol gibi polar çözücülerin metanol ve özellikle apolar çözücülere göre flavonoidleri daha etkin şekilde çözündüğü rapor edilmiştir (Grzegorzcyk-Karolak vd. 2018; Boufadi vd. 2021). Su ekstraktının yüksek flavonoid içeriği taşıması, bu çözücüyle ekstrakte edilen bileşiklerin büyük kısmının

flavonoid karakterli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, flavonoid içeriği yüksek olan bu fraksiyonlar aynı zamanda antioksidan aktiviteyle doğrudan ilişkilendirilmektedir. Flavonoidlerin serbest radikal süpürücü aktiviteleri ve enzim inhibisyon potansiyelleri, bu tür ekstraktların biyolojik aktivite yönünden değerlendirilmesinde önemli bir göstergedir (Tohma vd. 2016; Pérez-Ochoa vd. 2023).

Fraksiyonların fenolik ve flavonoid içeriklerine göre karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldığında; her fraksiyonun toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin her iki parametreye göre de anlamlı derecede farklılaştığı ortaya koyulmuştur. Sonuç olarak, metanol fraksiyonu fenolik bileşik zenginliğiyle, su fraksiyonu ise flavonoid bileşen zenginliği ile öne çıkmaktadır. Kloroform fraksiyonu her iki içeriği dengeli düzeyde taşıması bakımından çok yönlü değerlendirilebilirken, hekzan fraksiyonu ise apolar yapıların hedeflenmesi açısından destekleyici niteliktedir. Bu yönleriyle fraksiyonların farklı farmakolojik uygulamalara yönelik potansiyel taşıdığı düşünülmektedir.

4.3. Enzim İnhibisyon Çalışmalarının Genel Stratejisi ve Önemi

Bu tez çalışmasında asetilkolinesteraz (AChE), α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri seçilerek inhibitör etkinlik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin seçimi, yalnızca bireysel biyolojik rollerine değil, aynı zamanda son yıllarda giderek daha fazla dikkat çeken tip 3 diyabet kavramı çerçevesinde ortaya çıkan çok yönlü patolojik ilişkilere dayanmaktadır. Tip 2 diyabet ile Alzheimer hastalığı arasındaki güçlü epidemiyolojik ve patofizyolojik bağlantılar, "tip 3 diyabet" terimi altında birleştirilmiş ve insülin direnci, hiperglisemi ve nörodejenerasyonun birbirini karşılıklı olarak etkilediği kompleks bir hastalık modeli tanımlanmıştır. Bu modelde, karbonhidrat metabolizmasının regülasyonu (α -amilaz ve α -glukozidaz) ile kolinerjik sinir iletiminin korunmasının (AChE) birlikte değerlendirilmesi, hastalığın hem metabolik hem de nörolojik bileşenlerine müdahale edebilecek çok hedefli tedavi stratejilerinin önemini ortaya koymaktadır.

Bu kapsamda, çalışmada kullanılan bitki fraksiyonlarının hem nöroprotektif hem de antidiyabetik potansiyele sahip bileşenler taşıyabileceği hipoteziyle, üç farklı enzim üzerinde inhibisyon çalışmaları yürütülmüştür. Böylece fraksiyonların çok yönlü biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiş ve potansiyel terapötik kullanımları açısından daha kapsamlı bir analiz yapılmıştır.

Bu bölümde, AChE, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerine karşı elde edilen inhibisyon bulguları sırasıyla sunulmakta ve bu sonuçlar literatür verileri ışığında tartışılmaktadır.

4.3.1. Asetilkolin Esteraz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları

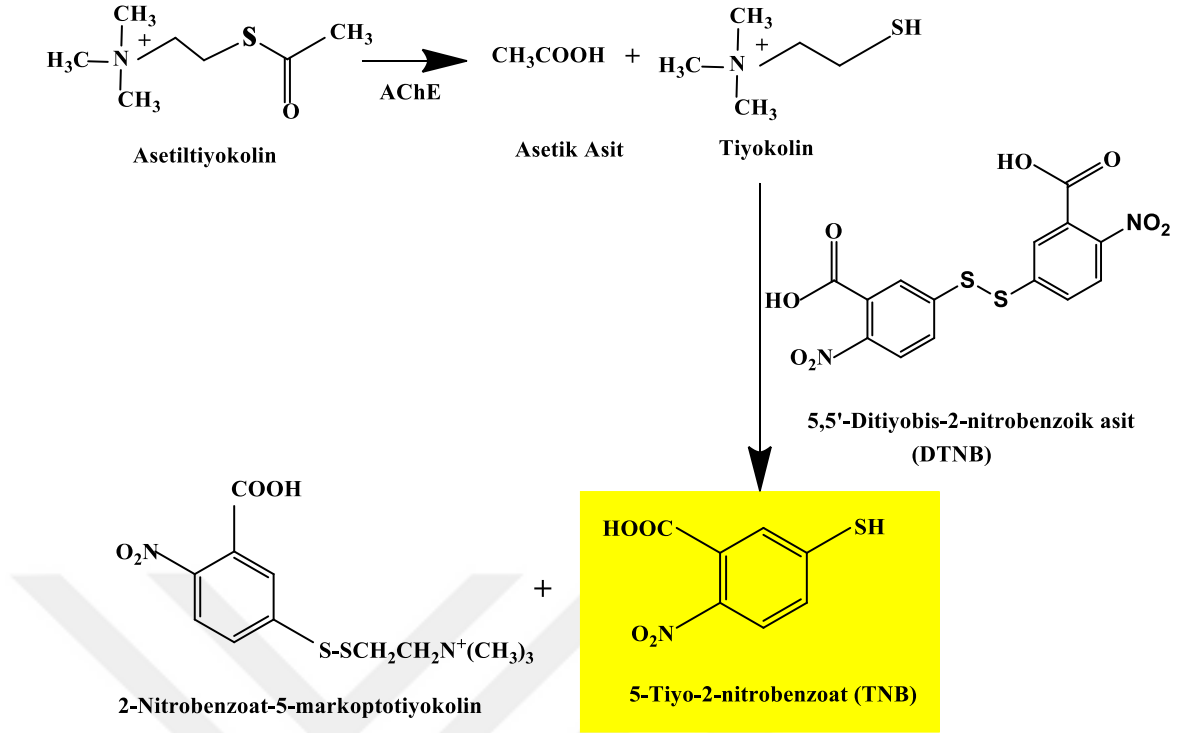
Asetilkolinesteraz (AChE) enzimi, sinaptik boşlukta asetilkolini hızla hidrolize ederek kolin ve asetat ürünlerini oluşturan, böylece sinaptik iletimi sonlandıran hayati bir enzimdir. Alzheimer hastalığında, kolinerjik nöronlardaki dejenerasyon nedeniyle asetilkolin düzeylerinde ciddi bir azalma gözlenmekte ve bu durum bilişsel işlevlerin bozulmasında temel bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, AChE enziminin inhibisyonu yoluyla asetilkolin seviyelerinin korunması, hastalığın semptomatik tedavisinde etkili bir farmakolojik strateji olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde klinikte kullanılan

donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi birçok ilaç, bu prensibe dayalı olarak geliştirilmiştir.

Bu çalışmada asetilkolinesteraz (AChE) enziminin *Electrophorus electricus* (electric eel) kaynaklı formu kullanılmıştır. İnsan AChE proteini (UniProt ID: P22303) ile yapılan BLASTP karşılaştırmasında yaklaşık %90'lık bir dizi eşitliği gözlenmiş olup, fonksiyonel ve yapısal benzerlikler oldukça yüksektir. Enzim aktivitesinden sorumlu olan katalitik triadın (Ser203, His447, Glu334; insan AChE numaralandırması) korunmuş olması, inhibitörlerin bağlanma davranışlarının büyük ölçüde benzer olacağına işaret etmektedir. Ayrıca periferik anyonik bölgedeki Trp86, Tyr337 ve Phe338 gibi bağlanma bölgeleri de hem sekans hem de üç boyutlu yapıda korunmuştur. Literatürde sıkça referans gösterilen bu enzim formu, farmakolojik açıdan insan AChE zerindeki etkileri modellemek için yaygın biçimde kullanılmakta ve inhibitör tarama testlerinde güvenilir bir biyolojik sistem sunmaktadır. Bu nedenle elde edilen inhibisyon verileri, translasyonel biyoyararlılık açısından değerlendirilebilir niteliktedir.

Bu çalışmada, bitkisel kökenli ekstraktların asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri Ellman yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem hem duyarlılığı hem de basit uygulanabilirliği nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Yöntemde, substrat olarak asetiltiyokolin iyodür (ATCI) kullanılmıştır. AChE enzimi bu substratı hidrolize ederek tiyokolin üretir. Oluşan tiyokolin, ortamda bulunan 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek, sarı renkli bir kromofor olan 5-tiyo-2-nitrobenzoatı (TNB) oluşturur. TNB'nin konsantrasyonu, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir (şekil 4.16).

Bu sistemde ölçülen absorbans artışı, doğrudan TNB oluşumunu ve dolaylı olarak enzim aktivitesini temsil etmektedir. İnhibitör varlığında, bu reaksiyonun hızı azalacağından absorbans artışında da düşüş gözlenir. Bu prensip doğrultusunda, test edilen bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları için enzim aktivitesindeki azalma hesaplanmış, inhibitör etkinliği yüzdesel olarak ifade edilmiştir.



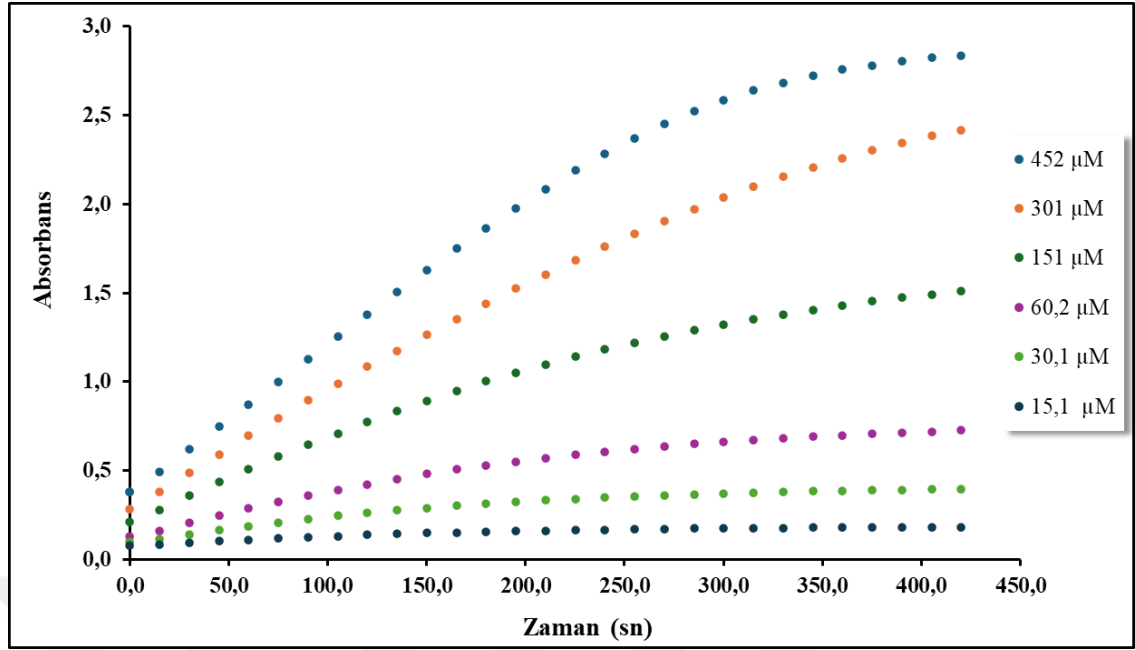
Şekil 4.16. Asetilkolinesteraz enziminin asetiltiyokolini hidrolize etmesi ve tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli TNB oluşturmaya ait reaksiyon mekanizması. (Chemdraw Ultra 12.0 programı ile çizilmiştir) (Kavruk vd. 2013)

- AChE enziminin kinetik analizi:

Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin kinetik özelliklerini belirlemek amacıyla, farklı substrat derişimlerinde (15,1–452 μM aralığında) enzim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresince oluşan ürün miktarı, 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile takip edilmiştir. Ölçümler 15 saniyelik aralıklarla 420 saniyeye kadar sürdürülmüştür.

Her bir substrat konsantrasyonu için elde edilen zaman-absorbans verileri, reaksiyonun ilerleyişini yansıtan kinetik eğrileri ortaya koymuştur (Şekil 4.17). Bu eğrilerde, en yüksek substrat derişiminde (452 μM) en hızlı reaksiyon gözlenirken, substrat derişimi azaldıkça reaksiyon hızı da düşmüştür. Bu durum, enzim kinetiğinin klasik satürasyon davranışını yansıtmaktadır.

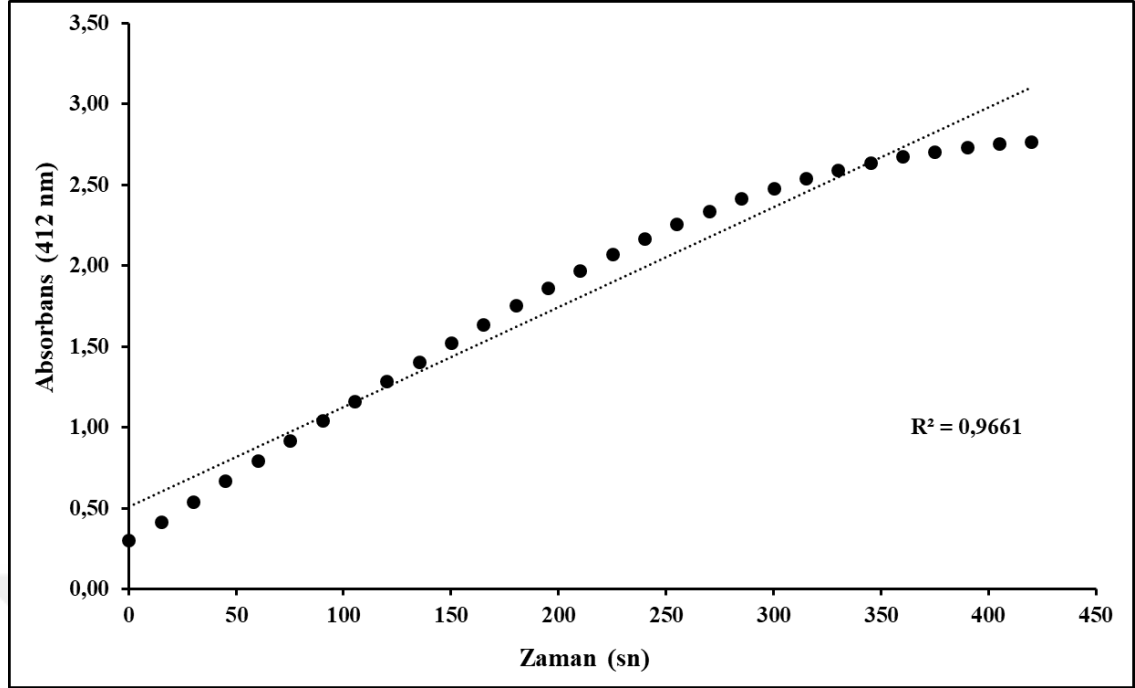
Her eğrinin doğrusal kısmı kullanılarak reaksiyon hızları (V_0) hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak Michaelis-Menten denkleminde dayalı olarak oluşturulan grafiklerde, enzimin maksimum reaksiyon hızı (V_{max}) ve Michaelis sabiti (K_m) hesaplanmıştır. Bu analizler, enzim-substrat etkileşiminin nicel olarak değerlendirilmesini sağlamış ve aynı zamanda olası inhibitörlerin kinetik parametreler üzerindeki etkisini incelemek için temel oluşturmuştur.



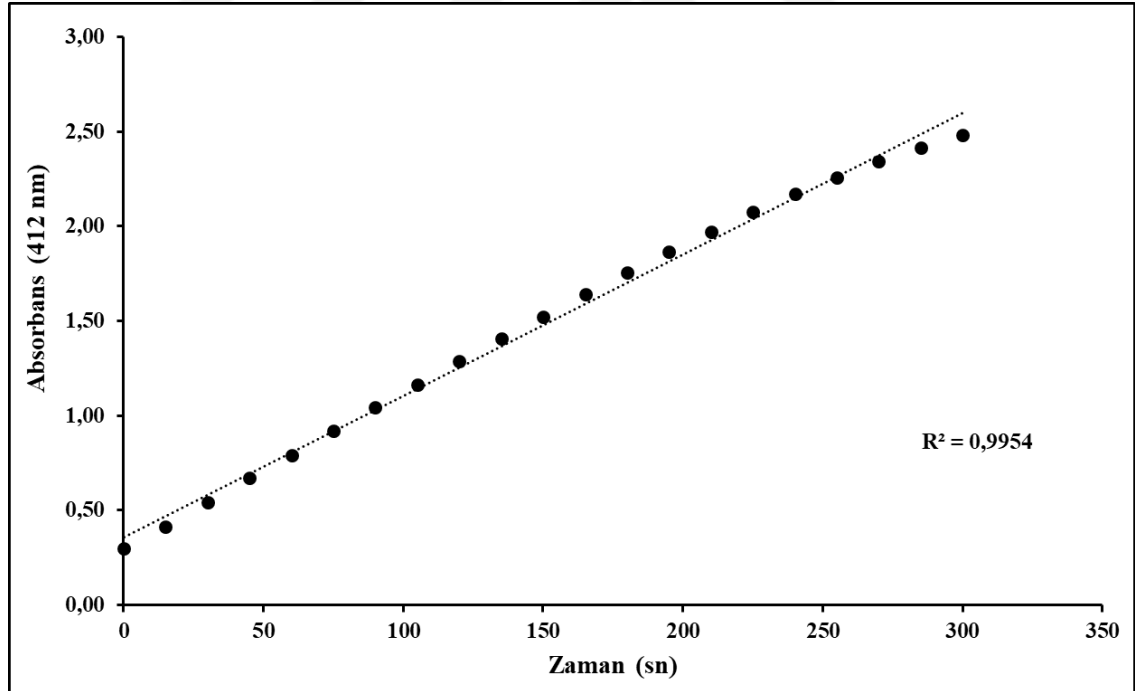
Şekil 4.17. Sabit AChE derişiminde (0,25 U/mL) farklı ATCI konsantrasyonlarından elde edilen zamana bağı absorbens grafiğı.

AChE enzim aktivitesinin kinetik olarak değ erlendirilebilmesi için, ürün derişiminin zamana karşı değ işimi takip edilmiştir. Farklı zaman aralıklarında elde edilen absorbens verileri kullanılarak oluşturulan grafikler, reaksiyon hızının hesaplanacağı en uygun zaman aralığını belirlemek amacıyla karşılaştırılmış tır (Şekil 4.18–4.20).

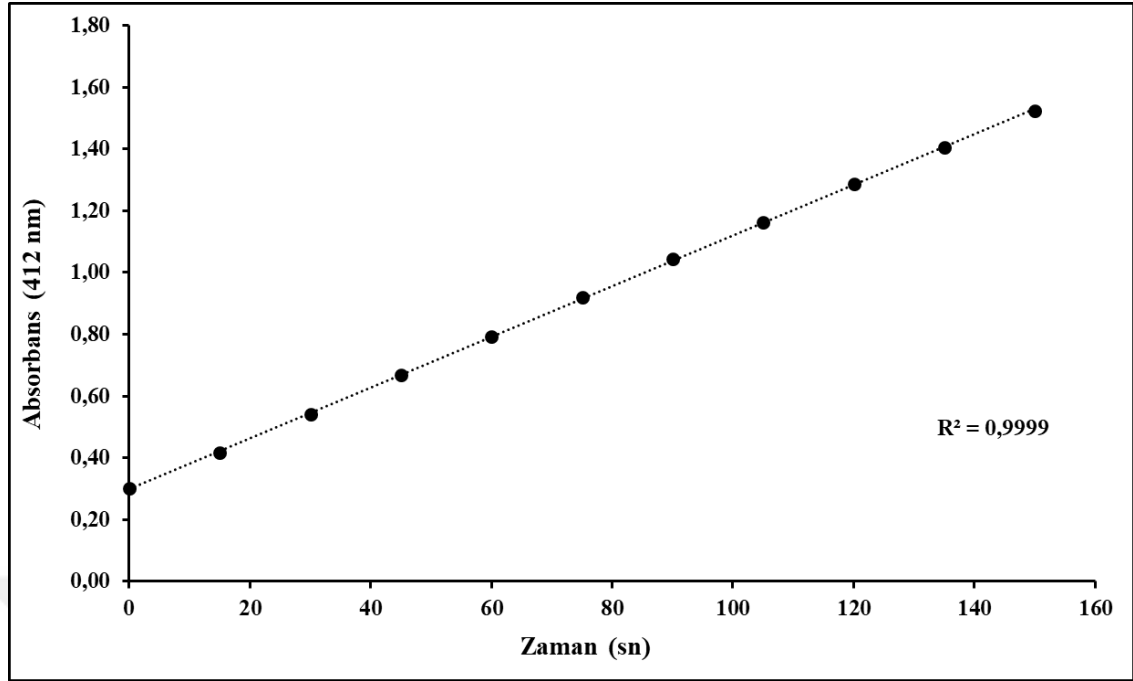
Enzim kinetiğı çalış malarında baş langıç hızının (V_0) doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için, reaksiyonun henüz ürün birikimi, substrat tükenmesi veya enzim inhibisyonu gibi faktörlerden etkilenmediğı doğrusal bölge seçilmelidir. Bu yaklaşım, kararlı hal kinetiğı prensibine dayanmaktadır. Baş langıç fazında, ürün oluşum hızı yalnızca substrat konsantrasyonuna bağıdır ve bu nedenle zaman–absorbans grafiğı doğrusal bir seyir izler. Şekil 4.20’de 0–150 saniye aralığında elde edilen veri seti, $R^2 = 0,9999$ gibi oldukça yüksek bir korelasyon katsayısı göstermiştir ve bu durum, ilgili zaman aralığının yüksek doğrusal karakter taşıdığını kanıtlamaktadır. Buna karşılık, Şekil 4.18 ve 4.19’da izlenen daha uzun süreli eğrilerde, reaksiyon süresi uzadıkça R^2 değ erinin düşmesi ve eğrinin eğiminde azalma gözlenmiştir. Bu durum, reaksiyonun doyunluğa yaklaşması ve hızın sabitliğini kaybetmesiyle açıklanabilir. Bu nedenle, hesaplamalarda kullanılacak zaman aralığı olarak hem baş langıç fazına en yakın hem de yeterli sayıda veri noktası içeren ilk 75 saniyelik periyot seçilmiştir. Bu periyot, hem doğrusallığı koruyarak güvenilir bir eğim (V_0) hesaplaması sağlar, hem de enzimatik reaksiyonun gerçek baş langıç hızı hakkında bilgi verir.



Şekil 4.18. TNB'nin zamana bağlı 412 nm'deki absorbans değerlerinin izlenmesine ait grafik I- 420 sn



Şekil 4.19. TNB'nin zamana bağlı 412 nm'deki absorbans değerlerinin izlenmesine ait grafik II- 300 sn



Şekil 4.20. TNB'nin zamana bağlı 412 nm'deki absorbens değerlerinin izlenmesine ait grafik III- 150 sn

Çizelge 4.3'te verilen bilgiler doğrultusunda ATCI substratının artan konsantrasyonlarında AChE enziminin reaksiyon hızı düzenli olarak artmış ve 452 μM 'de maksimuma ulaşmıştır. Substrat doygunluğuna yakın değerlerde hız artışı yavaşlayarak plato eğilimi göstermiştir. Ölçümlere ait standart sapma (SD) ve standart hata (SE) değerleri düşük düzeyde kalmış; %RSD değerleri ise genellikle %5'in altında seyretmiştir. En düşük substrat konsantrasyonunda (%16,67) gözlenen yüksek RSD, bu düzeydeki ölçümlerde sapmaların daha belirgin olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz (AChE) enzimine ait başlangıç hızlarının (V_0) farklı asetiltiyokolin (ATCI) derişimleri için hesaplanması ve istatistiksel analizleri

Derişim (μM ATCI)	Ortalama Hız (nmol TNB/ dk)	SD ^(a) ($\pm$)	SE ^(b) ($\pm$)	% RSD ^(c)
15,10	8,79	1,46	0,85	16,67
30,10	22,46	1,69	0,98	7,53
60,20	39,55	2,54	1,46	6,42
151,00	72,26	3,69	2,13	5,10
301,00	101,06	5,07	2,93	5,02
452,00	121,57	2,54	1,46	2,09

^(a) SD: Standart sapma ^(b) SE: Standart hata ^(c) %RSD: Yüzde bağıl standart sapma

Bu tez çalışmasında enzim kinetiği analizlerinde, K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerin doğruluğunu artırmak ve grafiksel yorumlamaların güvenilirliğini sağlamak amacıyla birden fazla grafik türü ile analiz yapılmıştır. Bu çalışmada, geleneksel olarak kullanılan Lineweaver-Burk grafiğinin yanı sıra Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee gibi grafik türleri de tercih edilmiştir.

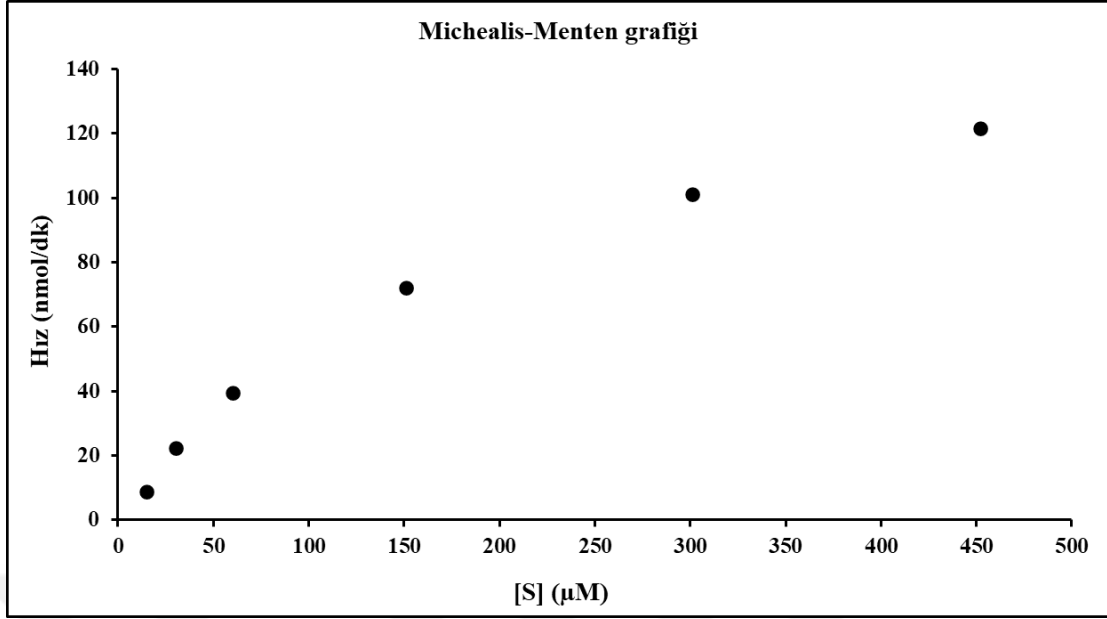
Her bir grafik yöntemi, Michaelis-Menten denkleminde farklı matematiksel dönüşümler uygulanarak elde edilir ve bu dönüşümler, ölçüm hatalarına karşı farklı duyarlılıklar gösterir. Bu nedenle, aynı veri seti kullanılsa bile grafiksel sapmalar, korelasyon katsayıları (R^2) ve elde edilen K_m - V_{max} değerleri değişkenlik gösterebilir.

Bu çeşitlendirilmiş analiz yaklaşımı sayesinde:

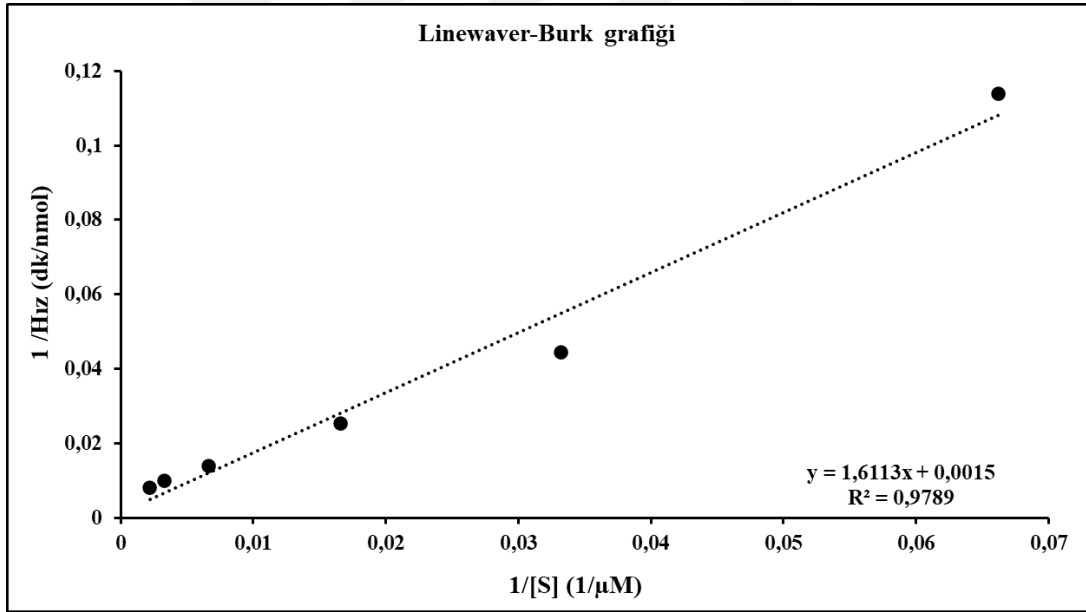
- Lineweaver-Burk'un küçük hata sapmalarını büyütme eğilimi gözlemlenebilir,
- Hanes-Woolf'un düşük derişimlerde hata dağılımını daha eşit yaptığı görülebilir,
- Eadie-Hofstee ise hem K_m hem V_{max} 'ı doğrudan eğim ve kesişimle verdiği için yorum kolaylığı sağlar.

Bu nedenle her üç grafik yöntemi kullanılmış ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırılarak en güvenilir veri seti belirlenmiştir. Ancak düşük substrat konsantrasyonu olan 15,1 μM için elde edilen değerler sapma göstermektedir ve grafiklerin R^2 değerleri oldukça düşüktür (Şekil 4.21-4.24). Bu nedenle kinetik analizlerde yüksek hata oranına sahip düşük derişim değerlerinin dışlanması, sonuçların güvenilirliğini artırmak açısından uygun bulunmuştur. En düşük derişim çıkarılarak beş nokta için grafikler yeniden çizilmiş ve değerler tekrardan hesaplanmıştır. Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27'de gösterilen grafiklerde korelasyon katsayılarının (R^2) belirgin şekilde arttığı (örneğin Lineweaver-Burk grafiğinde $R^2 = 0,9779 \rightarrow 0,9975$) ve regresyon çizgilerinin doğrusal karakter kazandığı tespit edilmiştir. Özellikle Hanes-Woolf ve Eadie-Hofstee grafiklerinde parametrelerin birbirine yakınsaması, bu veri setinin kinetik analiz için daha güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

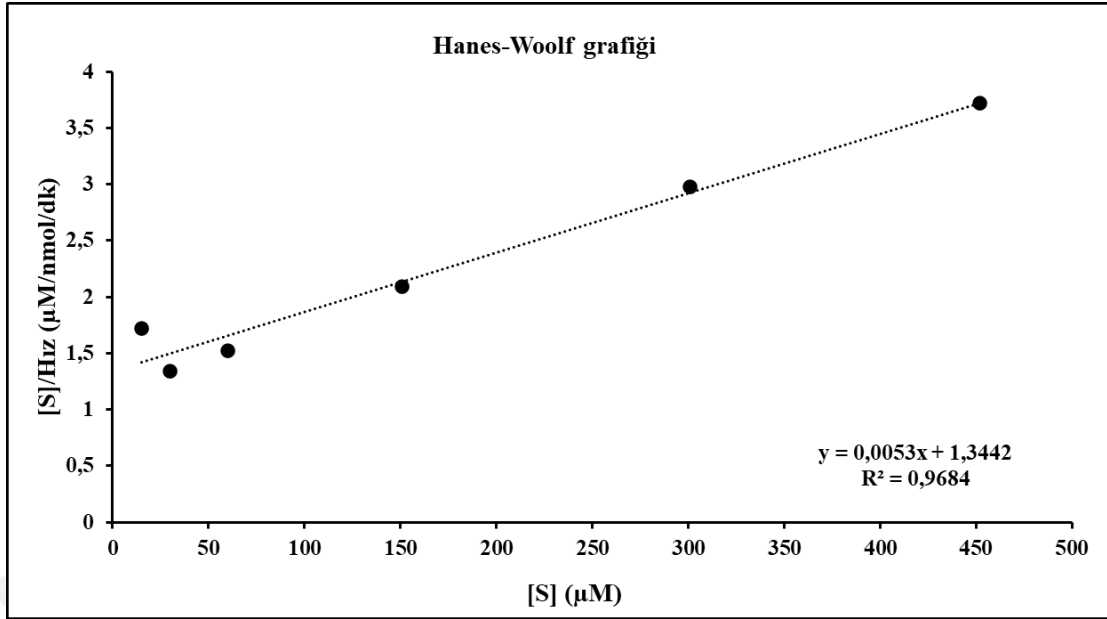
Bu nedenle, çalışmanın devamında K_m ve V_{max} hesaplamalarında, doğrusal bölgeyi daha iyi temsil eden ve ölçüm sapmalarını minimize eden beş veri noktasına dayalı analiz sonuçları kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te hem 6 nokta hem de 5 nokta için hesaplanan kinetik parametreler karşılaştırmalı olarak yer almaktadır



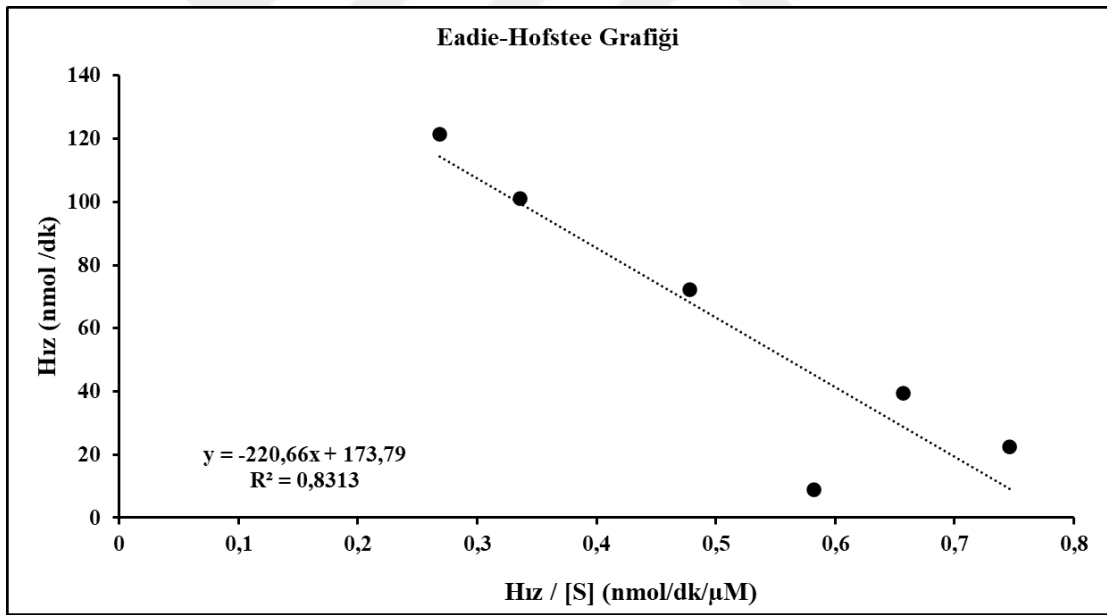
şekil 4.21. AChE enzimine ait Michealis-Menten grafiği



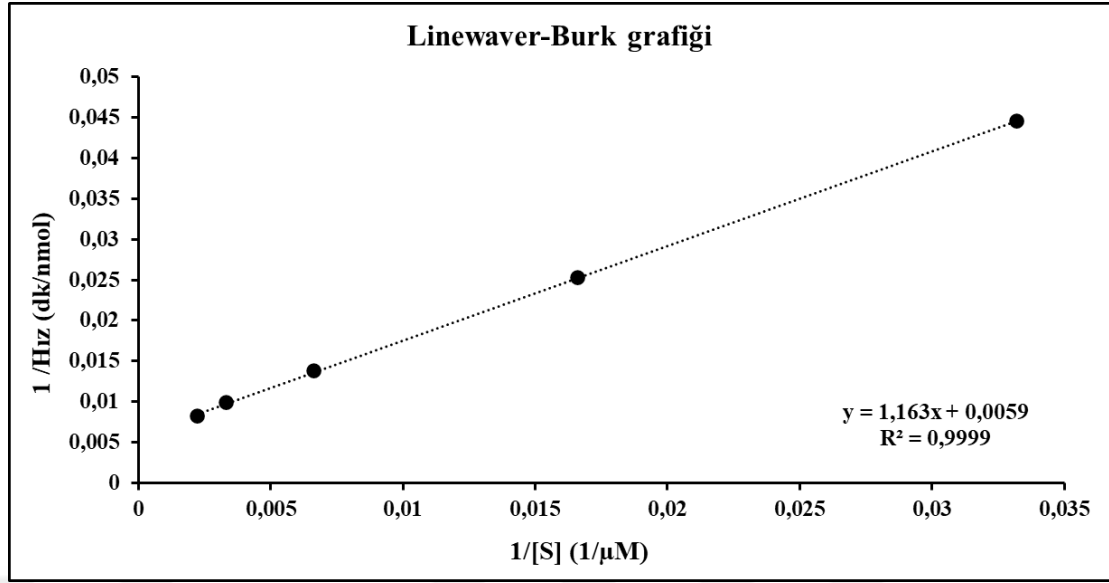
şekil 4.22. AChE enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği- 6 Nokta



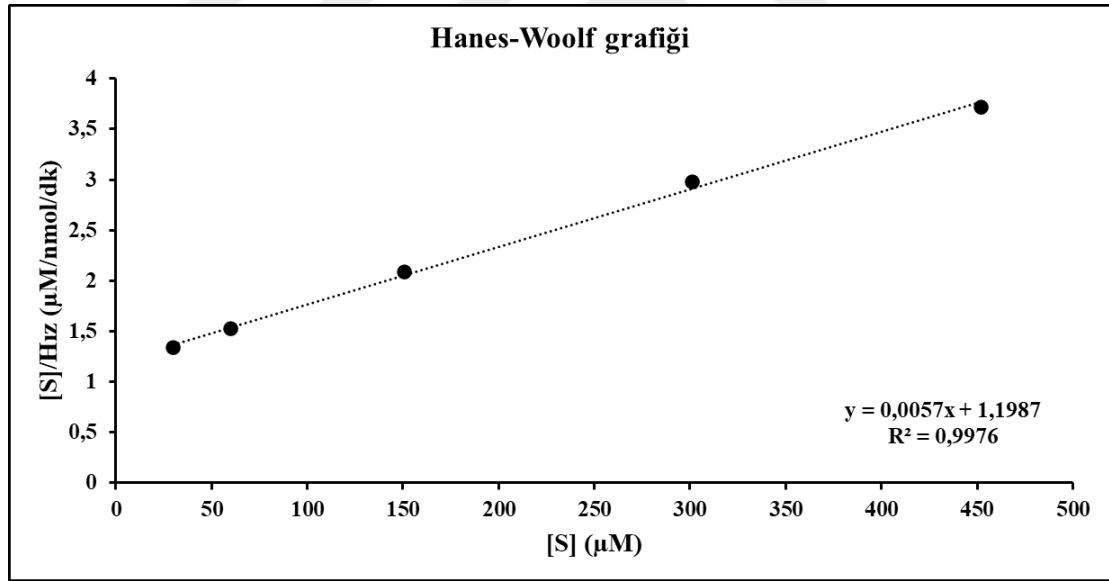
şekil 4.23. AChE enzimine ait Hanes-Woolf grafiği- 6 Nokta



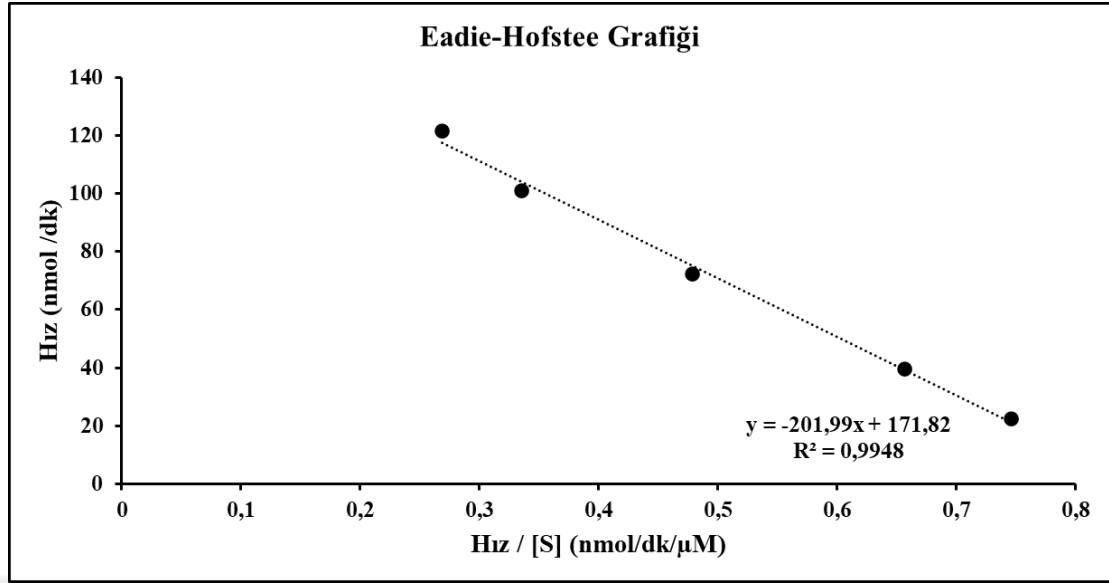
şekil 4.24. AChE enzimine ait Eadie-Hofstee grafiği- 6 Nokta



şekil 4.25. AChE enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği- 5 Nokta



şekil 4.26. AChE enzimine ait Hanes-Woolf grafiği- 5 Nokta



Şekil 4.27. AChE enzimine ait Eadie-Hofstee grafiği- 5 Nokta

Çizelge 4.4. AChE enzimine ait farklı grafiklerden elde edilen kinetik parametreler.

Veri Seti	Grafik Türü	Km	Vmax	Veri Seti	Grafik Türü	Km	Vmax
6 nokta	Lineweaver-Burk	1074,2	666,7	5 Nokta	Lineweaver-Burk	197,1	169,5
	Hanes-Woolf	253,6	188,7		Hanes-Woolf	210,3	175,43
	Eadie-Hofstee	220,6	173,8		Eadie-Hofstee	202,0	171,8

5 noktadan elde edilen Km ve Vmax değerlerinin birbiriyle oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. Kinetik analizler sonucunda hesaplanan Km değerlerinin yaklaşık 200 μ M seviyesinde olması, AChE enziminin asetiltiyokolin substratına karşı orta düzeyde bir bağlanma afinitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Vmax değerlerinin 170 nmol TNB/dk civarında olması ise enzimin yüksek katalitik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

- AChE enziminin inhibisyon çalışmaları:

Bu çalışmada, *D. hastata*'dan elde edilen dört farklı fraksiyonun (metanol, hekzan, kloroform ve su) AChE enzimine karşı inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. Fraksiyonlar, farklı konsantrasyonlarda test edilmiş ve % inhibisyon değerleri spektrofotometrik olarak Ellman yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir fraksiyonun üç tekrarlı ölçümlerine ait ortalama inhibisyon değerleri ve standart sapmalar, çizelge 4.8'de verilmiş ve karşılaştırmalı sütun grafiği ise şekil 4.29'da gösterilmektedir. Elde

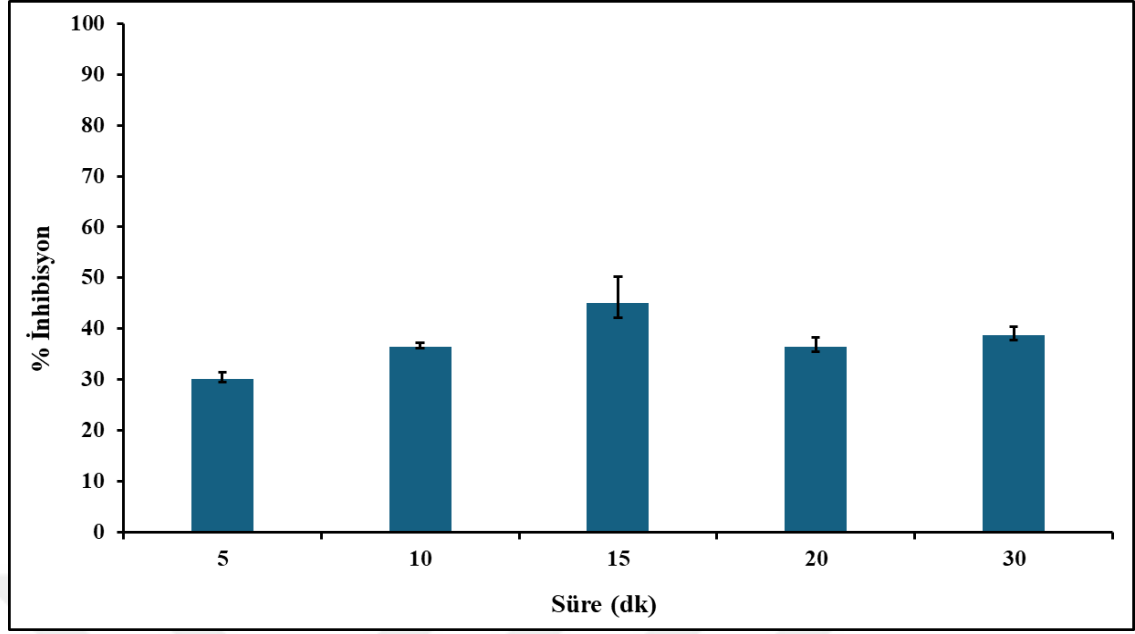
edilen bu sonuçlar, fraksiyonların içerdiği biyolojik aktif bileşiklerin enzime karşı gösterdiği farklılıkları ortaya koymakta ve çalışmanın ilerleyen bölümlerinde detaylı istatistiksel analizlerle tartışılmaktadır.

İnhibisyon çalışmalarında başlangıç noktası olarak inkübasyon süresi-% inhibisyon ilişkisi incelenmiş ve optimum inhibisyon süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Çizelge 4.5'te inkübasyon süresine bağlı olarak elde edilen % inhibisyon değerleri verilmiştir. Şekil 4.28'de ise elde edilen veriler eğilimi daha iyi anlamak için sütun grafiğine dönüştürülmüştür.

Yapılan istatistiksel analizde, farklı inkübasyon sürelerine ait % inhibisyon değerleri üzerinde tek yönlü ANOVA (One-Way ANOVA) testi uygulandı. Bu testin amacı, ortalama inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını test etmektir. (F değeri = 12.56 p-değeri = 0.00065) $p < 0.05$ olduğu için, farklı inkübasyon sürelerinin ortalama inhibisyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Bu sonuç, ekstraktın inkübasyon süresi boyunca enzim inhibisyonu üzerindeki etkisinin süreye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre metanolik fraksiyonun enzim inhibisyon etkisinin 15. dakikaya kadar arttığı, sonrasında ise düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum inhibitör bileşiklerin zamanla degradasyonu, enzimle olan geri dönüşümlü etkileşimleri veya ürün birikimi gibi faktörlerle açıklanabilir. Dolayısıyla optimum inhibisyon süresi 15. dakika olarak belirlenmiştir.

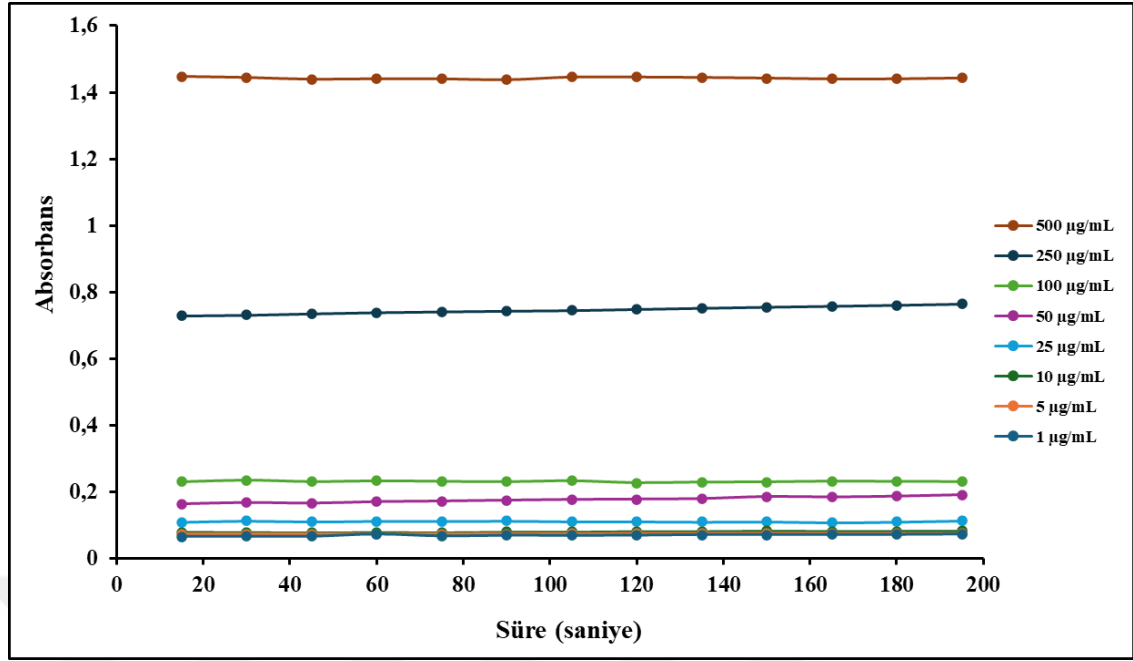
Çizelge 4.5. Metanol fraksiyonunun (100 µg/mL) süreye bağlı % inhibisyon değerleri

İnkübasyon Süresi (dk)	Ortalama % İnhibisyon	SD (±)	SE (±)	% RSD
5	30,22	1,29	0,75	4,28
10	36,57	0,65	0,37	1,77
15	45,15	5,13	2,96	11,36
20	36,57	1,71	0,99	4,68
30	38,81	1,71	0,99	4,41



şekil 4.28. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine metanol fraksiyonunun (100 µg/mL) zamana bağlı % inhibisyonunu gösteren sütun grafiği (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE).

şekil 4.29’da farklı derişimlerdeki metanol fraksiyonunun asetilkolinesteraz (AChE) enzimi bulunmaksızın, sistemdeki substrat (ATCI) ve Ellman reaktifi (DTNB) ile etkileşimi incelenmiş ve elde edilen absorbans verileri zamana bağlı olarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 1–100 µg/mL aralığındaki fraksiyon derişimleri için absorbans değerleri nispeten düşük kalmış ve zaman içinde belirgin bir artış göstermemiştir. Bu durum, bu derişim aralığında ekstraktın kendi başına substratla reaksiyona girerek ölçüm sistemine anlamlı bir etki yapmadığını ve AChE olmaksızın DTNB ile reaksiyon vermediğini göstermektedir.



Şekil 4.29. Farklı derişimlerdeki metanol fraksiyonunun ortamda enzim olmaksızın süreye bağı absorbansı.

Buna karşılık, 250 µg/mL ve özellikle 500 µg/mL derişimlerinde ölçülen absorbans değerlerinin zamana bağı olarak daha yüksek seviyelerde seyrettiğı ve 500 µg/mL örneğinde absorbans değerinin başlangıçtan itibaren ~1,45 seviyesinde sabit kaldığı görülmüştür. Bu durum, yüksek fraksiyon derişimlerinde optik interferans, kendi kendine absorbans (matriks etkisi) veya DTNB reaktifi ile enzim dışı reaksiyonlara bağı sinyallerin artmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, çalışmada kullanılacak inhibitör derişimlerinin üst sınırına dair önemli bir gösterge olup, özellikle 250 µg/mL ve üzerindeki derişimlerinin analiz dışı bırakılmasının veya kontrol gruplarıyla desteklenmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Doğru inhibisyon oranlarının hesaplanabilmesi için, çalışmada 1–100 µg/mL aralığı tercih edilmiştir.

Çalışılacak olan derişim aralığı ve optimum inhibisyon süresi belirlendikten sonra yapılan tekrarlı çalışmalar sonucunda metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonları için 6 farklı derişimde % inhibisyon değerleri belirlenmiş ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

Her fraksiyonun 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında AChE inhibisyon yüzdeleri üçer tekrar üzerinden hesaplanmıştır. Tek yönlü ANOVA testleri sonucunda, her fraksiyonun konsantrasyonlarına göre anlamlı farklar gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.001$). Sonuçlar çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. AChE enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

Fraksiyon	F-değeri	p-değeri
Metanol	13,90	0,00043
Hekzan	17,08	0,00018
Su	27,47	0,00002
Kloroform	149,61	$0,2 \times 10^{-15}$

Bu sonuçlara göre;

- Her dört fraksiyonun da kendi içinde uygulanan farklı konsantrasyonlar istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmaktadır ($p < 0.001$).
- En büyük F-değeri kloroform fraksiyonuna aittir; bu, farklı konsantrasyonların kloroform fraksiyonundaki inhibisyonu üzerinde çok güçlü etkiler yarattığını gösterir.
- Metanol ve hekzan fraksiyonları da anlamlı doza bağlılık göstermektedir; ancak su ve özellikle kloroform fraksiyonları daha keskin farklar göstermektedir.

Bir diğer istatistiksel analizde ise, her konsantrasyon düzeyinde (örneğin yalnızca 10 µg/mL'de) 4 fraksiyonun inhibisyon etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuçlar çizelge 4.7'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

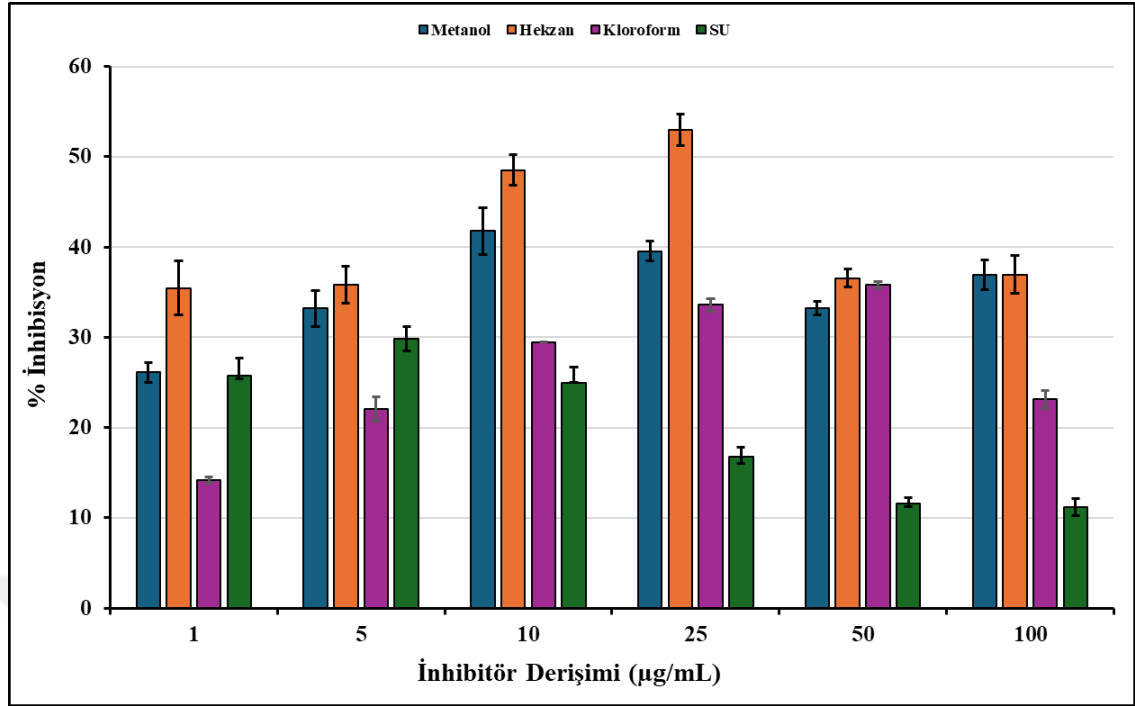
- Tüm konsantrasyon düzeylerinde farklı fraksiyonların inhibisyon kapasiteleri birbirinden anlamlı düzeyde farklıdır.
- Özellikle 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında fraksiyonlar arası fark çok belirgin olup, bu durum fraksiyonların içerdiği bileşik kompozisyonlarının AChE inhibisyon gücünü önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.
- Bu sonuçlar, aynı konsantrasyonda dahi her fraksiyonun farklı inhibitör potansiyel taşıdığını ve içerik çeşitliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7. Farklı fraksiyonların aynı derişimde AChE enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

Konsantrasyon (µg/mL)	F-değeri	p-değeri
1	21,36	0,00036
5	12,15	0,00239
10	37,56	0,000046
25	158,28	$1,84 \times 10^{-7}$
50	270,98	0,0024
100	69,28	$2,21 \times 10^{-8}$

Şekil 4.30' da verilen sütun grafiğinde derişim artışına bağlı olarak gözlenen % inhibisyon eğilimleri, fraksiyonların AChE enzimi ile yaptıkları etkileşim açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Kloroform ve hekzan fraksiyonlarında özellikle 10–50 µg/mL aralığında belirgin bir inhibisyon artışı gözlenmiş, metanol fraksiyonunda ise inhibisyonun daha dengeli bir artış sergilediği görülmüştür. Bu durum, bazı fraksiyonlarda doza bağlı hızlı bir yanıt oluştuğunu, diğerlerinde ise inhibitör bileşiklerin etkisinin daha yaygın ancak daha az keskin olduğunu göstermektedir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon eğrisinin plato çizmeye başlaması, maksimum inhibisyon kapasitesine yaklaşıldığını ve inhibitör doygunluğunun oluştuğunu düşündürmektedir.

Fraksiyonlarda artan derişimle birlikte inhibisyon değerlerinde gözlenen düşüş, muhtemelen fraksiyon içerisindeki polifenolik bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarda enzimle spesifik olmayan etkileşimlere girmesi, sterik engel oluşturması ya da enzim yüzeyinde aglomerasyon yapması gibi fizikokimyasal engellere neden olmasıyla açıklanabilir (Khadem ve Marles, 2010). Bu durum literatürde yüksek derişimlerde inhibitör maddelerin "substrat dışı bağlanma bölgeleriyle" etkileşime girerek enzimin konformasyonunu olumsuz yönde etkileyebileceği yönündeki görüşlerle örtüşmektedir (Colovic vd. 2013). Bu bulgular, fraksiyonların sadece içerdikleri inhibitör varlığı ile değil, bu bileşiklerin türü, yoğunluğu ve sinerjik etkileri açısından da farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.30. Fraksiyonların farklı derişimlerde AChE enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı sütun grafiğı (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE).

Çizelge 4.8’de verilen tüm inhibisyon verileri birlikte değerlendirildiğinde, fraksiyonların biyolojik aktiviteleri arasında belirgin farklılıklar olduğu görülmektedir. Hekzan fraksiyonu, %52,99 ile en yüksek AChE inhibisyonunu 25 μ g/mL konsantrasyonunda göstermiştir. Bu fraksiyonda inhibisyon oranı, 10 μ g/mL’de %48,51 olup doza bağlı güçlü bir artış sergilemiş, yüksek konsantrasyonlarda ise inhibisyon düzeyinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum, olası doygunluk etkisini veya yüksek derişimlerin spesifik olmayan etkilere yol açtığını düşündürmektedir.

Metanol fraksiyonunda ise en yüksek inhibisyon %41,79 ile 10 μ g/mL’de elde edilmiş, bu değer 25 ve 100 μ g/mL’de sırasıyla %39,55 ve %36,94 seviyelerinde seyrederek plato eğilimi göstermiştir. Bu eğilim, enzimatik sistemin inhibitöre karşı doygunluk noktasına ulaştığını ve ilave inhibitör konsantrasyonunun biyolojik yanıtı artırmadığını göstermektedir. Bu durum optimum inhibisyon konsantrasyonunun 10–25 μ g/mL aralığında olduğunu düşündürmektedir.

Kloroform fraksiyonu, %35,82 ile maksimum inhibisyonu 50 μ g/mL’de göstermiş, ancak 100 μ g/mL’de bu oran %23,13’e gerileyerek düşüş sergilemiştir. Bu durum, inhibitör bileşiklerin doza bağlı sınır etkisinin oluştuğuna işaret etmektedir.

Su fraksiyonu ise en düşük inhibitör etkiye sahip fraksiyon olarak belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon %29,85 ile 5 μ g/mL’de elde edilmiş, daha yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuç, su fraksiyonunun AChE üzerinde anlamlı inhibitör etki göstermediğini ve muhtemelen düşük inhibitör yoğunluğuna sahip olduğunu düşündürmektedir.

Genel olarak, metanol ve hekzan fraksiyonları orta konsantrasyon aralıklarında (10–25 µg/mL) maksimum inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu, inhibisyonun doza bağımlı bir şekilde arttığını ancak belirli bir eşiğin ardından doygunluk seviyesine ulaşıldığını göstermektedir. Kloroform fraksiyonunda daha geç tepki gözlenirken, su fraksiyonunun inhibitör etkinliği sınırlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, *S. dorystoechas*'tan elde edilen fraksiyonlar AChE enzimi üzerine anlamlı inhibitör etkiler göstermiştir. Kloroform ve hekzan fraksiyonları özellikle öne çıkarken, metanol fraksiyonu da dengeli ve etkili bir inhibisyon profili sunmuştur.

Elde edilen bulgular, literatürdeki *Salvia* cinsine ait farklı türlerin asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyon potansiyelleri ile karşılaştırıldığında dikkat çekici benzerlikler ve farklar göstermektedir. Özellikle, Mervić ve arkadaşları (2022) tarafından yürütülen çalışmada yedi farklı Akdeniz *Salvia* türünün ultrasonik banyoda alınan % 70 etanolik ekstraktları incelenmiş ve sadece *S. fruticosa*, *S. officinalis* ve *S. verticillata* türlerinin AChE enzimini anlamlı şekilde inhibe edebildiği tespit edilmiştir. Bu türler sırasıyla %80'e varan inhibisyon göstermiş ve IC₅₀ değerleri *S. fruticosa* için 287,02 µg/mL, *S. officinalis* için 268,45 µg/mL ve *S. verticillata* için 1607,87 µg/mL olarak bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise, *S. dorystoechas*'tan elde edilen metanol ve hekzan fraksiyonları, 10–25 µg/mL aralığında %40'ın üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Özellikle hekzan fraksiyonu 25 µg/mL'de %52,99'luk inhibisyon değeriyle en yüksek aktiviteyi sergilemiştir. Bu durum, *S. dorystoechas* fraksiyonlarının bazı *Salvia* türlerine kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda yüksek inhibitör etki gösterebildiğini ve potansiyel olarak daha güçlü inhibitör bileşenler içerdiğini göstermektedir.

Mervić ve arkadaşlarının çalışmasında IC₅₀ değeri 234.77 µg/mL olan rosmarinik asidin AChE inhibitörü olarak etkinliği vurgulanmış ve inhibitör etkiler ile rosmarinik asit ($r = 0.8168$), p-kumarik asit ($r = 0.8727$) ve luteolin-7-O-glukozid ($r = 0.7050$) gibi bileşenler arasında anlamlı korelasyonlar bulunduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmada yer alan tüm fraksiyonlarda rutin, ferulik asit, karnosol ve karnosik asit gibi inhibitör özellikleri literatürce desteklenen fenolik bileşenlerin varlığı, elde edilen inhibisyon verilerini biyokimyasal olarak da desteklemektedir.

Çizelge 4.8. Fraksiyonların farklı derişimlerde AChE enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri

Fraksiyon	Derişim (µg/mL)	% İnhibisyon	SD (±)	SE (±)	% RSD
Metanol	1	26,12	1,94	1,12	7,42
	5	33,21	3,42	1,97	10,30
	10	41,79	4,48	2,59	10,71
	25	39,55	1,94	1,12	4,90
	50	33,21	1,29	0,75	3,89
	100	36,94	2,82	1,63	7,63
Hekzan	1	35,45	5,17	2,99	14,59
	5	35,82	3,60	2,08	10,05
	10	48,51	2,96	1,71	6,11
	25	52,99	2,96	1,71	5,59
	50	36,57	1,71	0,99	4,68
	100	36,94	3,60	2,08	9,74
Kloroform	1	14,18	0,65	0,37	4,56
	5	22,01	2,33	1,35	10,58
	10	29,48	0,00	0,00	0,00
	25	33,58	1,29	0,75	3,85
	50	35,82	0,65	0,37	1,80
	100	23,13	1,71	0,99	7,39
Su	1	25,75	3,42	1,97	13,28
	5	29,85	2,33	1,35	7,81
	10	25,00	2,96	1,71	11,85
	25	16,79	1,71	0,99	10,18
	50	11,57	1,12	0,65	9,68
	100	11,19	1,71	0,99	15,28

Orhan ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında, Türkiye'ye özgü 14 farklı *Salvia* türünden elde edilen petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol ekstraktlarının AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri değerlendirilmiştir. AChE inhibisyonuna yönelik yapılan analizlerde, 200 µg/mL konsantrasyonunda test edilen ekstraktların büyük çoğunluğu anlamlı bir inhibisyon göstermemiştir. Bu çalışmada en yüksek AChE inhibisyonu, 1000 µg/mL konsantrasyonunda, *Salvia albimaculata*'nın petrol eteri ekstraktı ile %89,4 ve *S. cyanescens*'in kloroform ekstraktı ile %80,2 olarak elde edilmiştir. Metanol ekstraktlarının ise bu konsantrasyonda dahi AChE üzerinde etkisiz olduğu rapor edilmiştir.

Bu bulgular, çalışmamızda *S. dorystoechas* türünden elde edilen fraksiyonlarla karşılaştırıldığında dikkat çekicidir. Özellikle hekzan fraksiyonu, yalnızca 25 µg/mL gibi düşük bir konsantrasyonda %52,99'luk AChE inhibisyonu sergileyerek, Orhan ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan 1000 µg/mL gibi yüksek bir derişimde bildirilen bazı ekstraktlarla kıyaslanabilecek düzeyde bir etki göstermiştir. Metanol fraksiyonu ise 100 µg/mL'de %36,94 inhibisyon göstermiştir ve bu değer, Orhan ve arkadaşlarının çalışmasında metanol ekstraktlarının tamamen etkisiz olarak değerlendirildiği göz önünde bulundurulduğunda, oldukça anlamlıdır.

Orhan ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise Türkiye'ye özgü önceki çalışmalarından farklı olan 16 *Salvia* türünden hazırlanan etil asetat ve metanol ekstraktlarının inhibitör potansiyelleri AChE, BChE, TYRO ve LOX enzimlerine karşı 100 µg/mL konsantrasyonunda değerlendirilmiştir. Kolinesteraz enzimlerine karşı genel inhibisyon oranlarının $5,32 \pm 0,81$ ile $44,12 \pm 3,01$ arasında değiştiği bildirilen bu çalışmada, AChE'a karşı anlamlı inhibisyon yalnızca birkaç türde tespit edilmiştir. Etil asetat ekstraktları arasından *S. aytachii*, *S. cerino-pruinosa* var. *cerino-pruinosa*, *S. cassia*, *S. nutans*, *S. sericeo-tomentosa* var. *sericeo-tomentosa*, *S. suffruticosa bracteata* ve *S. tchiatcheffii* türleri 100 µg/mL derişimde AChE'ye karşı %20'ye kadar inhibisyon sergilemiştir. Metanol ekstraktları için ise sadece *S. cadmica* var. *cadmica*, *S. freyniana*, *S. potentillifolia* ve *S. sericeo-tomentosa* var. *hatayica* türlerinin %35'e kadar inhibisyon kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bu bulgular, çalışmamızda *Salvia dorystoechas* türünün ham metanol ekstraktından çözücü polaritesine göre elde edilen alt fraksiyonları ile karşılaştırıldığında dikkat çekicidir. Özellikle metanol fraksiyonu 100 µg/mL'de %36,94 inhibisyon göstererek literatürde bildirilen metanol ekstraktlarıyla benzer veya daha yüksek bir biyolojik etki ortaya koymuştur. Hekzan fraksiyonu ise 25 µg/mL'de %52,99 inhibisyon göstererek, Orhan ve arkadaşlarının çalışmasında yer alan herhangi bir *Salvia* türünün etil asetat ekstraktından daha yüksek inhibisyon kapasitesine ulaşmıştır. Bu durum, *S. dorystoechas*'ın içerdiği lipofilik bileşiklerin AChE inhibisyonu açısından daha güçlü etkiler yaratabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın önemli farklılıklarından biri, kullanılan örneklerin doğrudan ekstrakt değil, ham metanol ekstraktının fraksiyonlara ayrılmasıyla elde edilen çözücü bazlı alt bileşen grupları olmasıdır. Fraksiyonlama işlemi, kompleks bitki ekstraktlarının daha düşük polariteli (hekzan, kloroform) ve yüksek polariteli (metanol, su) bileşenlerine ayrıştırılmasını sağlayarak, biyolojik aktivitenin spesifik fraksiyonlarda yoğunlaşmasını test edilebilir kılmaktadır. Bu yöntem, inhibitör etkiyi maskeleyen çok sayıda inaktif bileşiğin etkisinden kurtularak, inhibitör potansiyeli daha güçlü olan moleküllerin

tespitine olanak sağlar. Nitekim bu çalışmada, fraksiyonlama sayesinde daha düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek inhibisyon düzeyleri elde edilmesi, biyoyönlendirilmiş fraksiyonlamanın farmakolojik etkinliğin artırılmasındaki önemini vurgulamaktadır.

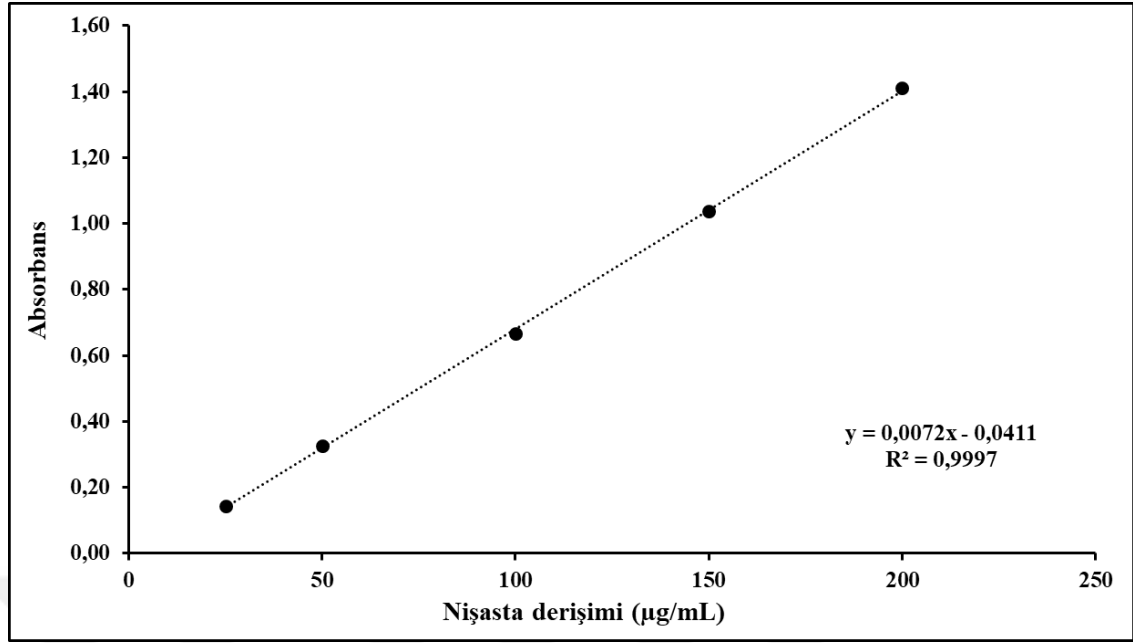
Sonuç olarak, *S. dorystoehas*'tan elde edilen fraksiyonlar, literatürde bildirilen bazı *Salvia* türlerinden ve hatta bazı tam ekstraktlardan daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek AChE inhibisyonu göstermektedir. Bu durum, bu türün biyolojik olarak aktif doğal bileşiklerin zenginleştirilmesinde etkili bir kaynak olabileceğini ve fraksiyonlama tekniğinin fitofarmasötik araştırmalarda ne denli kritik rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

4.3.2 α -amilaz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları

α -amilaz, nişasta ve glikojen gibi kompleks polisakkaritlerin α -1,4-glikozidik bağlarını hidrolize ederek kısa zincirli oligosakkaritlere dönüştüren temel bir enzimdir. Bu enzim hem pankreatik hem de tükürük bezlerinden salgılanarak besinlerin sindiriminde önemli rol oynar. Ancak, α -amilaz aktivitesinin aşırı olması, özellikle karbonhidrat içeriği yüksek diyetlerde, postprandiyal (yemek sonrası) glukoz artışına yol açarak insülin direncinin ve tip 2 diyabetin gelişiminde katkı sağlayabilir. Bu nedenle α -amilazın inhibisyonu, karbonhidrat emilimini geciktirerek ve kan şekerinin daha yavaş yükselmesini sağlayarak diyabet yönetiminde etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda, α -amilaz inhibitörlerine olan ilgi yalnızca sentetik ilaçlarla sınırlı kalmamış, bitkisel kaynaklı doğal inhibitörler de önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bitkisel ekstraktların sunduğu çok bileşenli yapı hem inhibisyon etkinliğini artırabilmekte hem de sentetik inhibitörlerin neden olduğu gastrointestinal yan etkilerin azalmasına katkıda bulunabilmektedir. Bu çalışmada, *D. hastata*'nın farklı fraksiyonlarının α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri değerlendirilmiş; bu etkilerin potansiyel antidiyabetik uygulamalardaki önemi tartışılmıştır. Bulgular hem inhibitör etkinliği hem de bitkisel fraksiyonların biyolojik potansiyeli açısından literatürle karşılaştırılarak ele alınmıştır.

α -amilaz enzimi olarak bu çalışmada *Sus scrofa* (domuz) pankreası kaynaklı form kullanılmıştır. İnsan pankreatik α -amilazı (AMY2A; UniProt ID: P04746) ile yapılan karşılaştırmalar, bu iki enzim arasında yüksek düzeyde sekans homolojisi (%85-90) bulunduğunu göstermektedir. α -Amilazın katalitik aktivitesinden sorumlu olan Asp197, Glu233 ve Asp300 kalıntıları, her iki türde de korunmuş olup, substrat bağlanma olukları yapısal olarak büyük benzerlik göstermektedir (PDB ID: 1PPI vs. 1HNY). Bu durum, domuz α -amilazının inhibitör taramaları ve anti-diyabetik ajanların biyolojik değerlendirmesinde yaygın biçimde kullanılmasının temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen inhibisyon verileri, insan α -amilazı üzerinde beklenen etkiler için güçlü bir ön tahmin potansiyeli taşımaktadır.



Şekil 4.31. Nişastaya ait 620 nm’de çizilen standart kalibrasyon grafiği.

α -amilaz enzim inhibisyon çalışmalarında nişasta-iyot metodu seçilmiştir. α -amilaz enzimi, nişastayı daha küçük şeker moleküllerine (örneğin maltoz) hidrolize eder. Bu süreç sırasında nişastanın iyot ile oluşturduğu kompleksin rengi azalır, bu da 620 nm’deki absorbans değerinin düşmesine neden olur. Nişasta, α -amilaz enziminin doğal substratlarından biridir ve enzim tarafından parçalanarak reaksiyon hızını ölçmek için uygun bir model substrat sağlar.

Şekil 4.31’de ki grafikten elde edilen eğri, belirli bir absorbans değerine karşılık gelen nişasta derişiminin hesaplanmasına olanak tanır. Böylece, α -amilazın aktivitesi (veya inhibisyonu) sonucunda kalan nişasta miktarı doğru bir şekilde belirlenebilir.

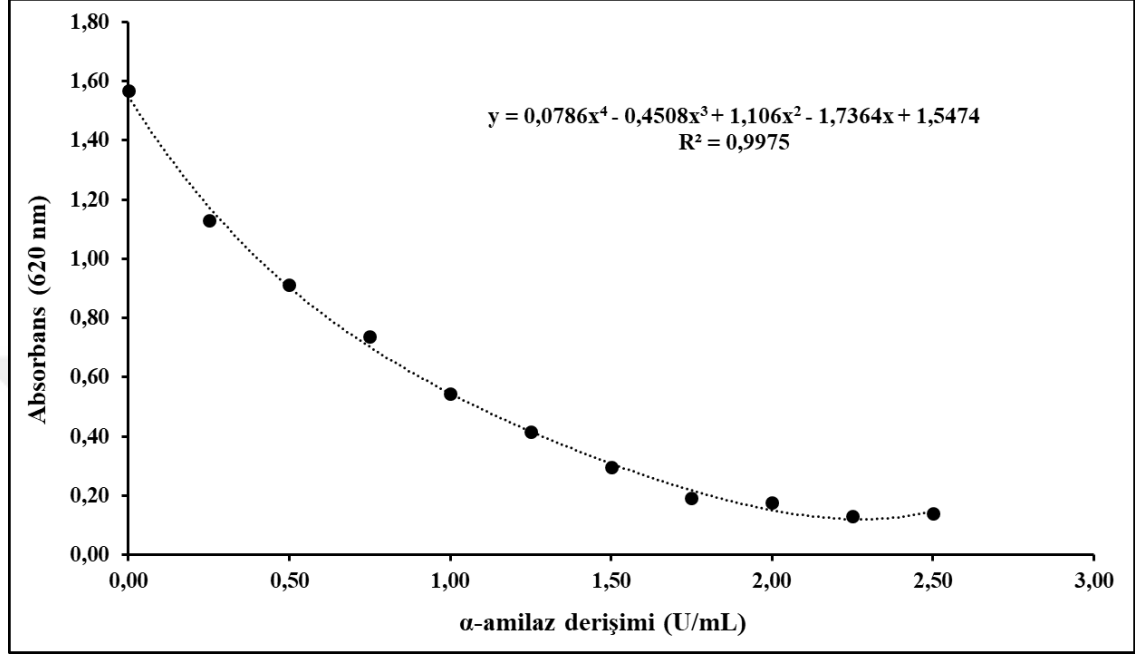
Eğer bir inhibitör eklenirse (örneğin bitki ekstraktları), α -amilaz aktivitesi azalır. Bu, nişastanın daha az parçalanmasına ve 620 nm’deki absorbans değerinin daha yüksek çıkmasına yol açar. Kalibrasyon eğrisi sayesinde bu absorbans değerinden, enzimin inhibitör varlığındaki aktivitesi belirlenebilir.

Grafikte elde edilen R^2 değeri, grafikteki verilerin doğrusal modelle neredeyse mükemmel bir uyum içinde olduğunu göstermektedir. Yani, nişasta derişimi ile absorbans arasında güçlü bir doğrusal ilişki vardır.

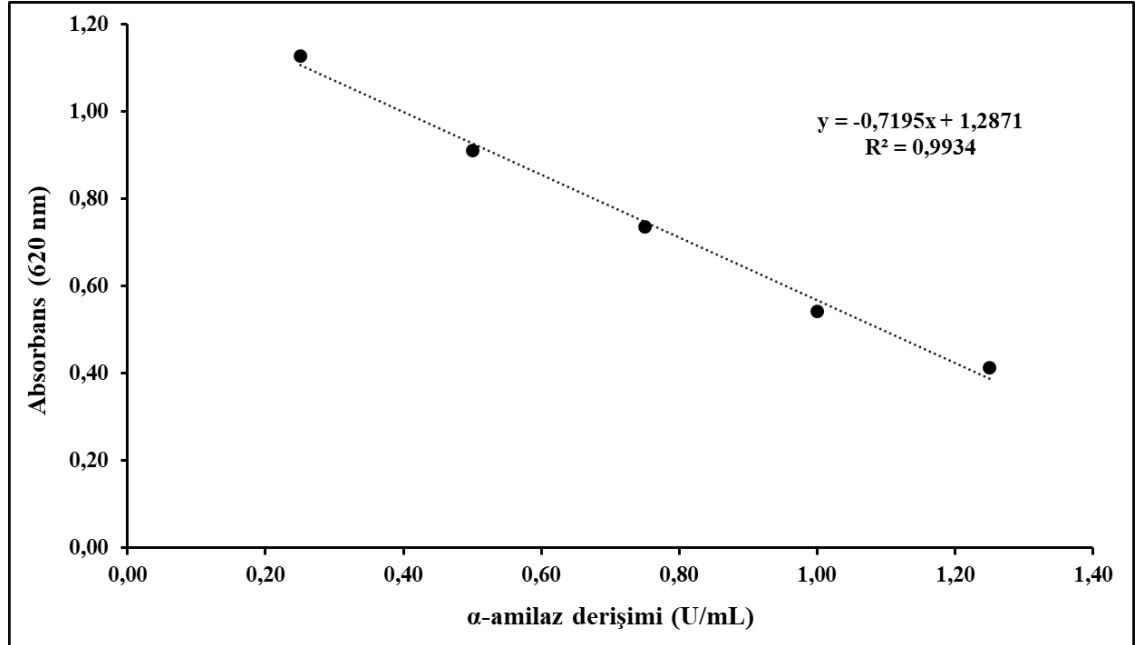
Şekil 4.32’de verilen grafikte, α -amilaz konsantrasyonu arttıkça absorbansın azaldığı gözlemlenmiştir. Bu, nişasta substratının α -amilaz tarafından parçalanması sonucu oluşan daha küçük moleküllerin absorbansta azalmaya neden olduğunu gösterir. Bu moleküller iyot ile kompleks oluşturamadıkları için absorbansta azalma gözlenir.

Substratın enzim tarafından hidrolizi, α -amilaz konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır, ancak yüksek konsantrasyonlarda enzimatik etki plato yaparak sabitlenmektedir. Elde edilen değerler grafikte de görüldüğü üzere 4. dereceden bir polinom eğrisiyle oldukça uyumludur. Bu grafikten yola çıkarak elde edilen şekil

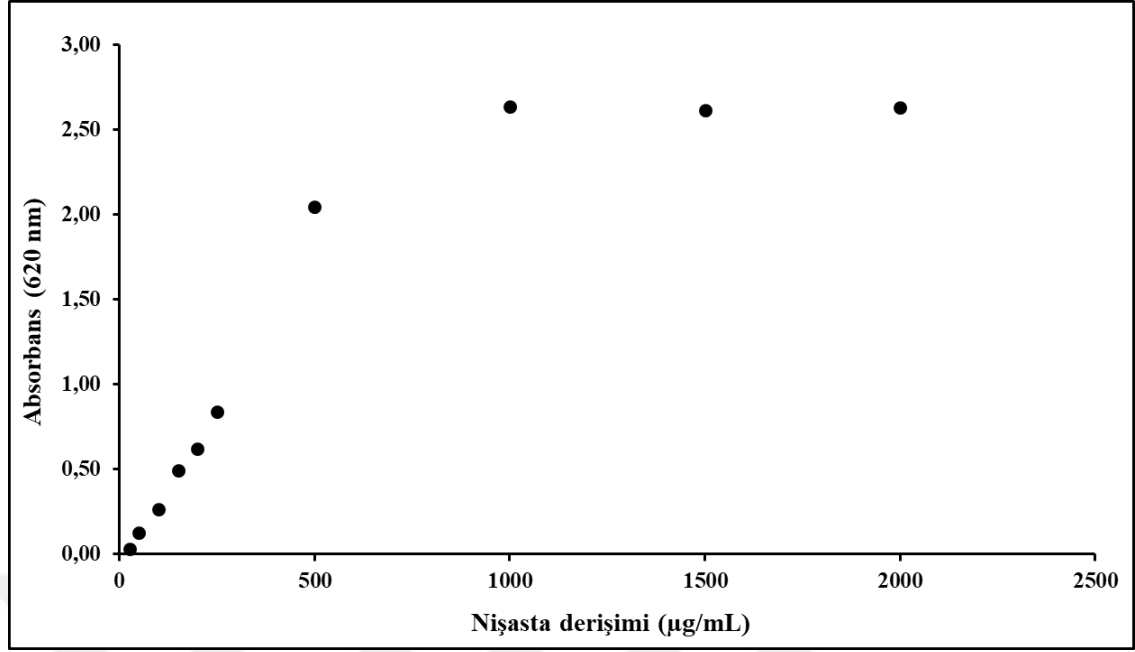
4.33'teki grafik bize çalışmamız gereken α -amilaz aralığını göstermektedir. Yüksek enzim derişimleri nişastanın hızlıca parçalanmasına neden olacağı için UV-Vis spektrofotometresinde ölçüm almak ve güvenilir sonuçlar elde etmek zorlaşacaktır. Düşük enzim derişimlerinde ise ortamda substrat çok fazla olacağı için enzim çalışsa bile ölçümlere bu sonuç güvenilir bir şekilde yansımayacaktır.



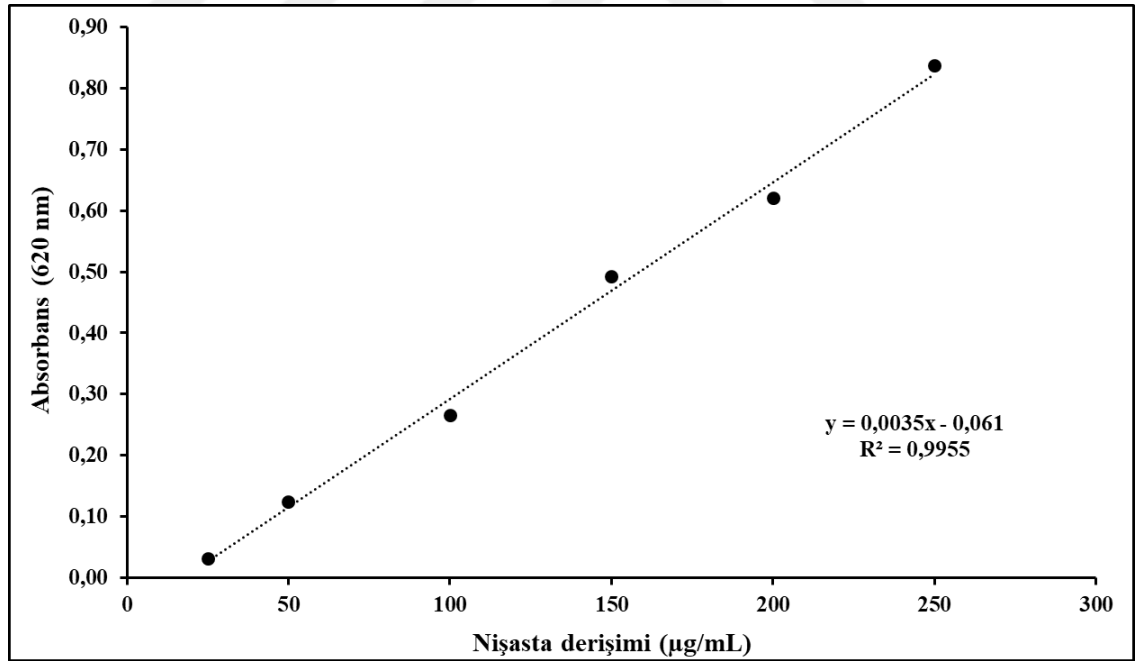
Şekil 4.32. Sabit nişasta derişiminde (1,5 mg/mL) farklı α -amilaz derişimlerinden elde edilen enzim aktivite grafiğı



Şekil 4.33. Sabit nişasta derişiminde (1,5 mg/mL) artan α -amilaz derişiminin enzim aktivitesiyle doğrusal ilişkisini gösteren grafik.

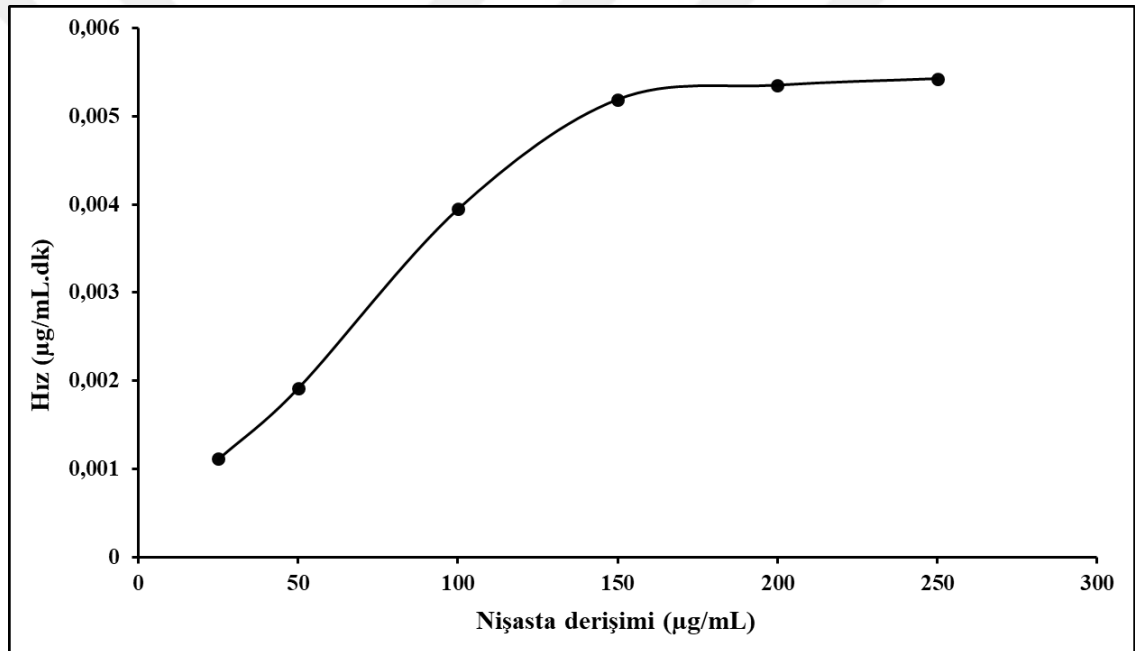


şekil 4.34. Sabit enzim derişiminde (0,625 U/mL) artan substrat derişiminin enzim aktivitesiyle ilişkisini gösteren grafik.



şekil 4.35. Sabit enzim derişiminde (0,625 U/mL) artan substrat derişiminin enzim aktivitesiyle doğrusal ilişkisini gösteren grafik.

Şekil 4.34'te gösterilen grafikte sabit enzim derişimi (0,625 U/mL) altında artan nişasta derişiminin (substrat) α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkisini göstermektedir. Başlangıç bölgesinde (0-500 $\mu\text{g/mL}$) absorbans değerlerinde belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu, enzim-substrat komplekslerinin hızla oluştuğunu ve enzim aktivitesinin substrat artışıyla doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir. 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında absorbans artışı azalmaya başlamış, eğri yavaşça plato çizmiştir. Bu, enzimin aktif bölgelerinin büyük kısmının substrat tarafından doldurulduğunu ve enzim aktivitesinin maksimum hıza (V_{max}) yaklaştığını göstermektedir. 1000 $\mu\text{g/mL}$ üzerinde plato bölgesi gözlenir. Bu noktada absorbans yaklaşık sabit kalmıştır (~2,5–2,6 civarı). Substrat derişimi artsa bile reaksiyon hızı artık artmamaktadır. Bu durum, enzimin aktif bölgelerinin tamamının doymuş hale geldiğini ve sistemin maksimum kapasitesine ulaştığını (V_{max}) gösterir. Başka bir deyişle, substrat fazlası olsa bile enzim daha hızlı çalışmamaktadır. Şekil 4.35 ise 25-250 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığındaki doğrusallığı gösteren grafikdir. Böylece çalışılması gereken substrat derişimi aralığı da belirlenmiştir.

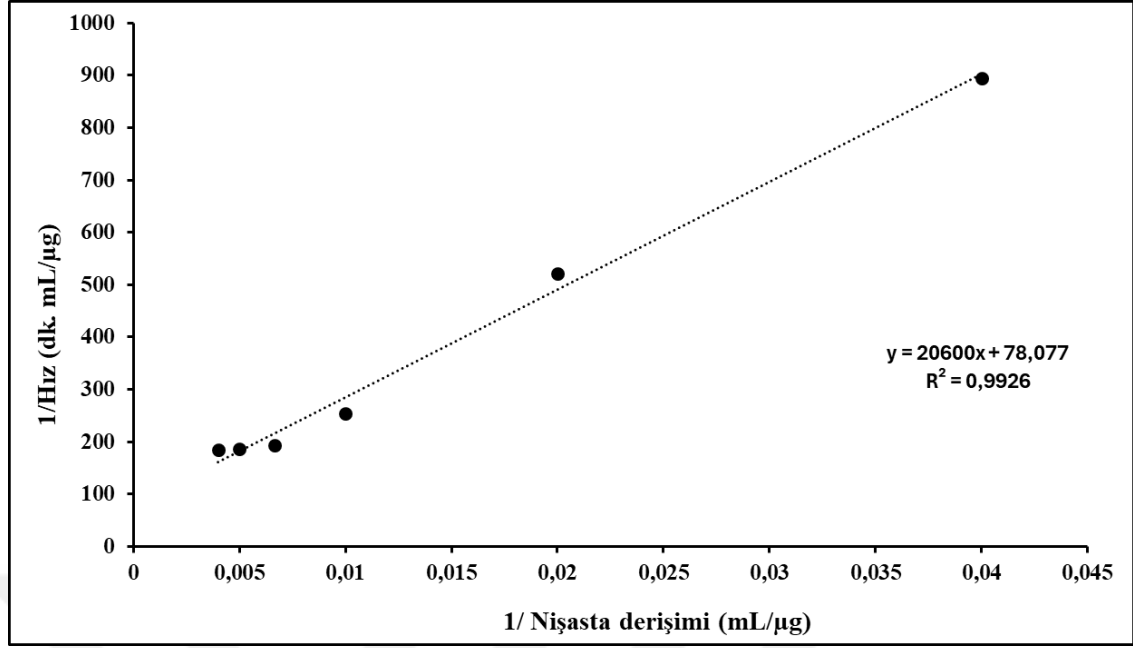


Şekil 4.36. α -amilaz (0,50 U/mL) enzimine ait Michealis-Menten grafiği.

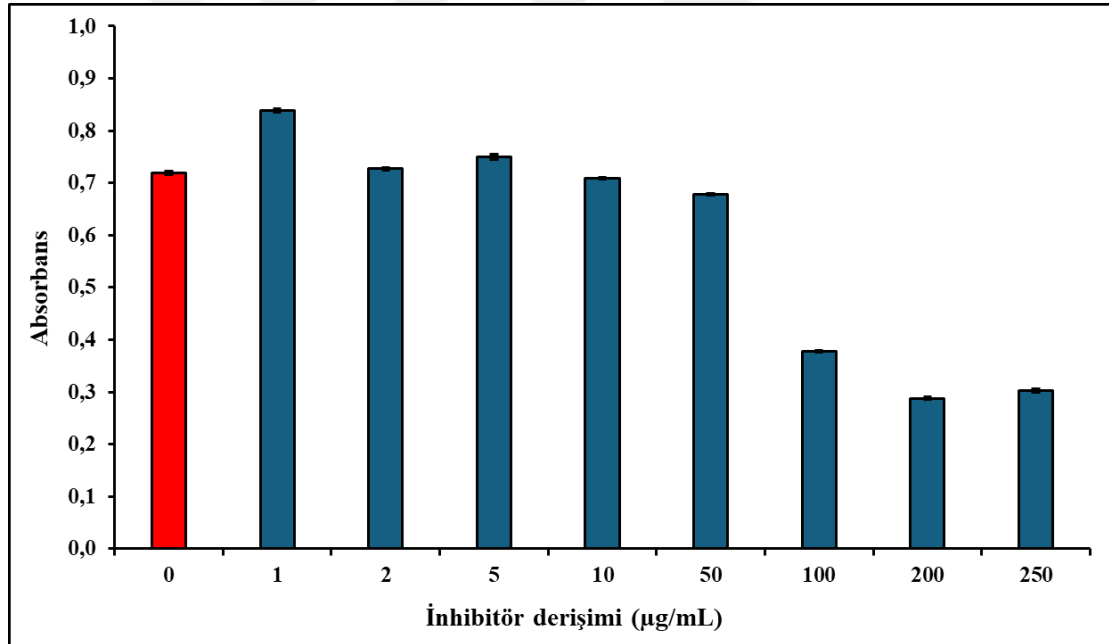
Şekil 4.36'da verilen grafik α -amilaz enziminin 25-250 $\mu\text{g/mL}$ substrat derişimi aralığında 15 dk'lık inkübasyon ile elde edilmiş hız değerlerinden oluşturulan Michealis-Menten grafiğini göstermektedir. Şekil 4.37'de ise bu grafiğin doğrusalltırılması ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği gösterilmektedir. Bu grafikten elde edilen kinetik veriler şu şekildedir:

V_{max} (mg/mL.dk): 0,01311

K_m : 0,2707



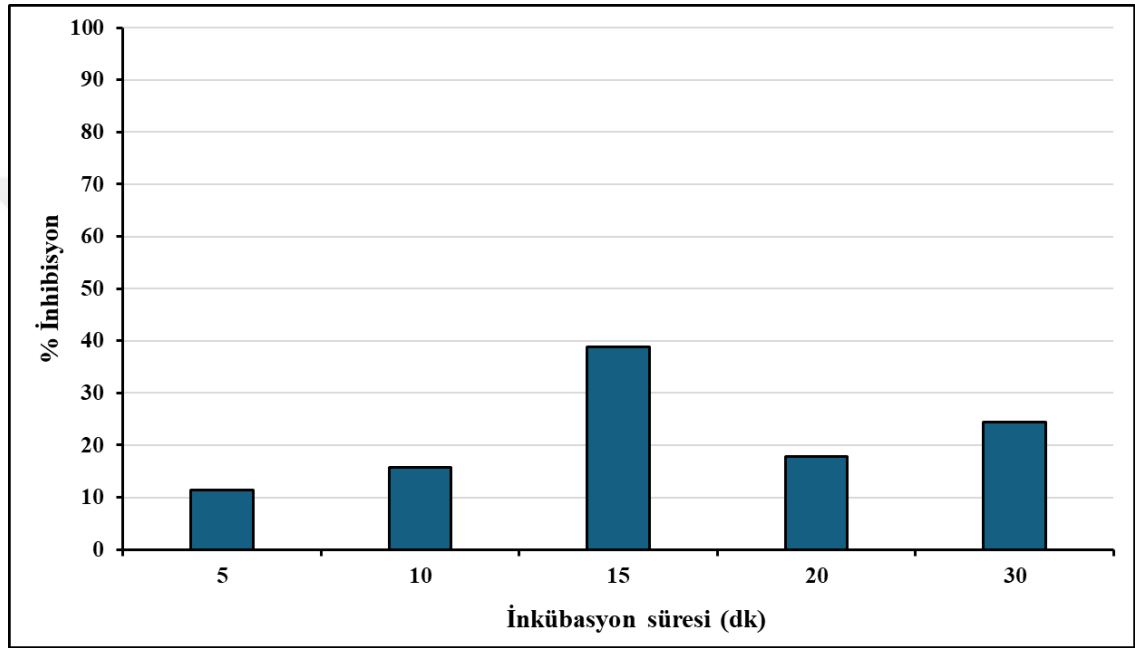
Şekil 4.37. α -amilaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiğı.



Şekil 4.38. İnhibitörün artan derişiminin nişastaya olan etkisini gösteren grafik. (Metanol fraksiyonu ile çalışılmıştır.) (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE)

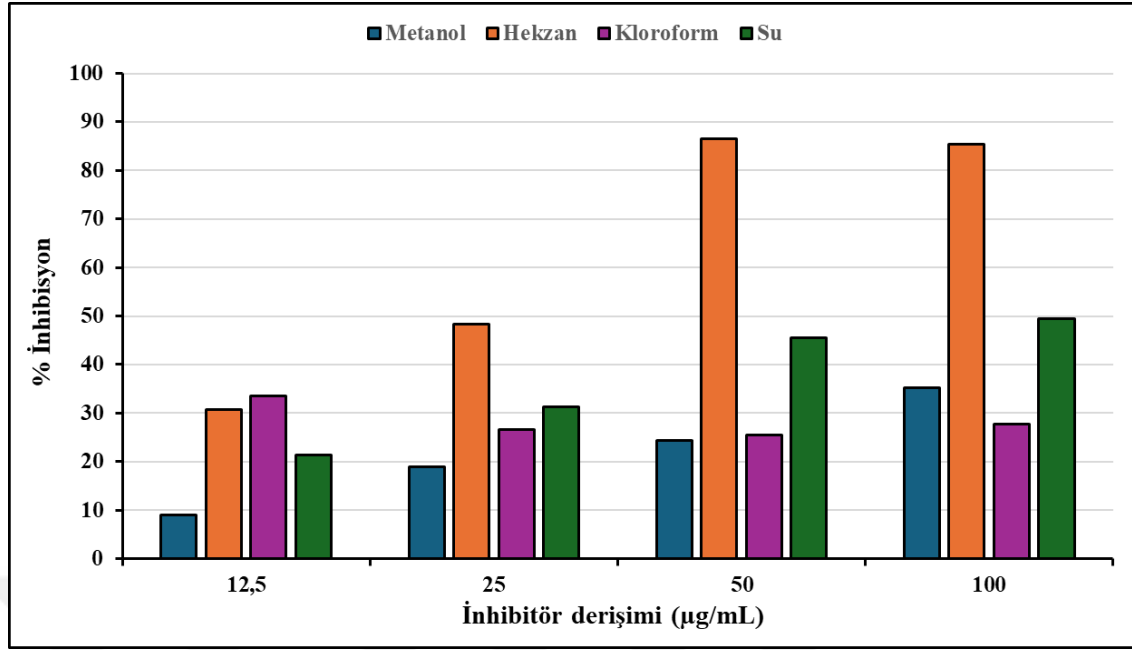
Bu çalışmada, nişasta-iyot yönteminin özgüllüğünü değerlendirmek amacıyla, enzim eklenmeden yalnızca nişasta ve bitki fraksiyonlarının bulunduğu kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.38). Elde edilen sonuçlar, fraksiyonların farklı konsantrasyonların nişasta-iyot kompleksinin absorbansı üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. Kontrol grubunda (sadece nişasta) absorbans yaklaşık 0,7–0,8 seviyesinde ölçülmüş ve kompleksin stabil olduğu gözlenmiştir. Düşük bitki fraksiyonu konsantrasyonlarında (2–10 μ g/mL) absorbans değerlerinde anlamlı bir değişim

saptanmamıştır. Sadece 1 µg/mL derişimde standart değerdan daha yüksek absorbands gözlenmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda (50–250 µg/mL) absorbands belirgin şekilde azalmış ve bu durum, bitki fraksiyonlarının nişasta veya iyot ile doğrudan etkileşerek kompleks oluşumunu engellediğini veya kompleksin stabilitesini bozduğunu düşündürmüştür. Bu düşüşün muhtemel nedenleri arasında, fraksiyonlardaki polifenol ve antioksidan bileşiklerin iyodun nişasta ile etkileşimini azaltması, iyodu indirgemesi veya nişasta yapısını modifiye etmesi sayılabilir. Bu nedenle, enzim inhibisyon çalışmaları yorumlanırken, bitki fraksiyonlarının nişasta-iyot sistemi üzerindeki doğrudan etkileri göz önünde bulundurulmalı ve inhibitör etkisi hesaplanırken bu kontrol değeri dikkate alınmalıdır.



Şekil 4.39. 100 µg/mL derişimdeki metanol fraksiyonunun α-amilaz enzimi için inkübasyon süresi ve % inhibisyon arasındaki ilişkiyi veren grafik.

α-amilaz enziminin inhibisyon çalışmalarında optimum inkübasyon süresini belirlemek amacıyla metanol fraksiyonunun 100 µg/mL derişimdeki inhibisyonu 5 farklı zaman aralığında değerlendirilmiştir. Şekil 4.39'daki grafikte de inkübasyon süresi ile % inhibisyon değeri arasındaki ilişki sütun grafiği şeklinde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 15 dk'lık inkübasyon optimum süre olarak belirlenmiştir. 15 dk'dan sonra inhibisyonun düşmesi bileşiklerin enzimle ikincil etkileşimlerle bağlanabileceğın ve belli bir süre sonra ayrılabilceğini veya bileşiklerin birbirleriyle etkileşerek aglomerasyon olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.40. Fraksiyonların farklı derişimlerde α -amilaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı sütun grafiğı.

D. hastata bitkisinin metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının α -amilaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerinin incelenmesi için dört farklı derişim (12,5, 25, 50 ve 100 µg/mL) kullanılarak % inhibisyon değerleri belirlenmiş ve fraksiyonların enzim aktivitesi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.9’da verilmektedir, şekil 4.40’ta ise karşılaştırmalı sütun grafiğı şeklinde verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm fraksiyonların inhibitör etkisinin derişime bağılı olarak değıştığı gözlemlenmiştir. Hekzan fraksiyonu, tüm derişimlerde en yüksek inhibisyon etkisini göstermiştir. Özellikle 50 ve 100 µg/mL derişimlerinde %86,53 ve %85,33 inhibisyon değerlerine ulaşarak, α -amilaz enzimi üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, hekzan fraksiyonunun lipofilik bileşenlerinin enzim inhibisyonuna önemli katkılar sunduğunu düşündürmektedir.

Metanol fraksiyonu, artan derişimle birlikte inhibisyon etkisini kademeli olarak artırmış ve en yüksek inhibisyonu 100 µg/mL’de (%35,16) göstermiştir. Kloroform fraksiyonu ise diğer fraksiyonlara kıyasla daha sabit bir inhibisyon profili sergilemiş ve ortalama %25-33 aralığında kalmıştır, bu da orta düzeyde bir inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Su fraksiyonu ise artan derişimle birlikte inhibisyon değerini belirgin şekilde artırarak 100 µg/mL’de %49,40’a ulaşmış ve özellikle yüksek derişimlerde dikkat çekici bir etki göstermiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, hekzan fraksiyonu α -amilaz enzimi üzerinde en güçlü inhibitör etkiye sahipken, su fraksiyonu orta-yüksek, metanol ve kloroform fraksiyonları ise düşük-orta düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu farklılıklar, fraksiyonların içerdiği biyoaktif bileşiklerin kimyasal özelliklerine ve enzim-substrat etkileşimlerine olan etkilerine bağılıdır. Bulgular, özellikle hekzan ve su fraksiyonlarının

α -amilaz inhibitörü olarak potansiyel taşıdığını ve antidiyabetik ajan geliştirme çalışmalarında değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.9. Metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının α -amilaz enzimi için % inhibisyon değerleri.

Fraksiyon	Derişim	Ort İnhibisyon %	SD	SE	%RSD
Metanol	12,50	8,95	1,15	0,66	12,85
	25,00	18,86	0,92	0,53	4,88
	50,00	24,36	2,01	1,16	8,25
	100,00	35,16	3,22	1,86	9,16
Hekzan	12,50	30,70	2,56	1,48	8,34
	25,00	48,35	1,48	0,85	3,06
	50,00	86,53	3,86	2,23	4,46
	100,00	85,33	5,01	2,89	5,87
Kloroform	12,50	33,50	2,37	1,37	7,07
	25,00	26,62	1,78	1,03	6,69
	50,00	25,52	1,09	0,63	4,27
	100,00	27,72	0,69	0,40	2,49
Su	12,50	21,38	0,84	0,48	3,93
	25,00	31,27	0,98	0,57	3,13
	50,00	45,47	3,03	1,75	6,66
	100,00	49,40	2,41	1,39	4,88

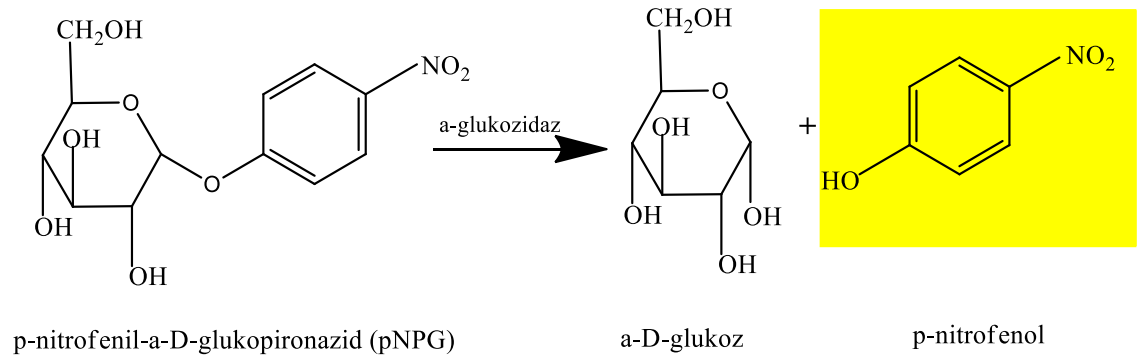
4.3.3 α -glukozidaz Enziminin Kinetik Analizi ve İnhibisyon Çalışmaları

Bu çalışmada, asetilkolinesteraz (AChE) ve α -amilaz enzimleri üzerinde gerçekleştirilen inhibitör etkinlik değerlendirmelerinin ardından, benzer bir yöntemsel yaklaşım α -glukozidaz enzimi için de uygulanmıştır. α -glukozidaz, ince bağırsakta bulunan ve kompleks karbonhidratların hidrolizini sağlayarak glukoz oluşumuna aracılık eden temel bir enzimdir. Bu enzim aracılığıyla glukozun hızlı bir şekilde emilmesi, yemek sonrası (postprandiyal) kan şekeri düzeylerinin ani yükselmesine neden olur. Postprandiyal hiperglisemi, tip 2 diyabetin başlangıcında ve ilerleyişinde önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, α -glukozidaz inhibitörleri, karbonhidratların sindirimini yavaşlatarak glukoz emilimini düzenlemekte ve böylece kan şekeri düzeylerini dengeleyerek diyabet yönetiminde etkili bir tedavi stratejisi sunmaktadır. Klinik uygulamada kullanılan akarboz, miglitol ve vogliboz gibi α -glukozidaz inhibitörleri bu mekanizma üzerinden etki göstermektedir. Ancak mevcut farmakolojik inhibitörlerin gastrointestinal yan etkileri nedeniyle, doğal kaynaklı, daha güvenli ve etkin α -glukozidaz inhibitörlerinin keşfi önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu bağlamda, çalışmada kullanılan farklı çözücülerle elde edilmiş bitki fraksiyonlarının α -glukozidaz inhibitör kapasiteleri zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değerlendirilmiştir. Önceki enzim çalışmalarında olduğu gibi, burada da optimum inkübasyon süresi belirlenmiş ve elde edilen inhibisyon yüzdeleri istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Bu doğrultuda, α -glukozidaz enzimi üzerinde gerçekleştirilen inhibisyon deneylerine ilişkin bulgular aşağıda sunulmaktadır.

Bu çalışmada α -glukozidaz enzimi olarak mikroorganizma kaynaklı *Saccharomyces cerevisiae* formu kullanılmıştır. İnsan intestinal α -glukozidazı (MGAM; UniProt ID: Q14624) ile yapılan karşılaştırmalarda genel dizi benzerliği %40-50 düzeyinde olsa da katalitik aktif bölgeyi oluşturan Asp616, Glu521 ve benzeri kritik kalıntılar yüksek oranda korunmuştur. Kristal yapılar da (örneğin PDB ID: 2QMJ) bu korunumun üç boyutlu düzeyde devam ettiğini göstermektedir. Maya kaynaklı α -glukozidazın deneysel stabilitesi, substrat benzerliği ve inhibitör bağlanma profili nedeniyle, anti-diyabetik bileşiklerin ön tarama analizlerinde bir model sistem sunduğu literatürde kabul görmektedir. Bu nedenle çalışmada elde edilen inhibitör etkiler, insan intestinal α -glukozidazı üzerindeki potansiyel etkiler açısından translasyonel bir değerlendirme sunmaktadır.

- α -glukozidaz enziminin inhibisyon çalışmaları:

Bu çalışmada, *D. hastata* bitkisinin ham metanol ekstraktından elde edilen fraksiyonların α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri, sentetik bir substrat olan p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid (pNPG) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem hem özgüllüğü hem de p-nitrofenol (pNP) gibi kolay izlenebilir bir ürün vermesi nedeniyle α -glukozidaz aktivite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. α -Glukozidaz enzimi, pNPG substratını hidrolize ederek serbest α -D-glukoz ve sarı renkli kromojenik ürün olan p-nitrofenol (pNP) oluşturur. Oluşan pNP, 405 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren bir kromofor olduğundan, reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir. Deneysel sistemde, inhibitör varlığında oluşan pNP miktarındaki azalma, enzim aktivitesinin baskılanma derecesini yansıtmaktadır böylece inhibitörün % inhibisyon miktarı hesaplanabilmektedir (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. α-glukozidaz enziminin p-nitrofenil-α-D-glukopiranozid (pNPG) substratını hidroliz etme reaksiyonu. (ChemDraw Ultra 12.0 ile çizilmiştir.)

Çizelge 4.10. Metanol fraksiyonunun (100 µg/mL) zamana bağlı % inhibisyon değerleri

İnkübasyon Süresi (dk)	Ortalama % İnhibisyon	SD (±)	SE (±)	% RSD
5	85,50	2,67	1,54	3,12
10	87,94	4,00	2,31	4,55
15	89,94	4,22	2,44	4,70
20	92,49	2,59	1,50	2,80
30	83,76	3,42	1,98	4,08

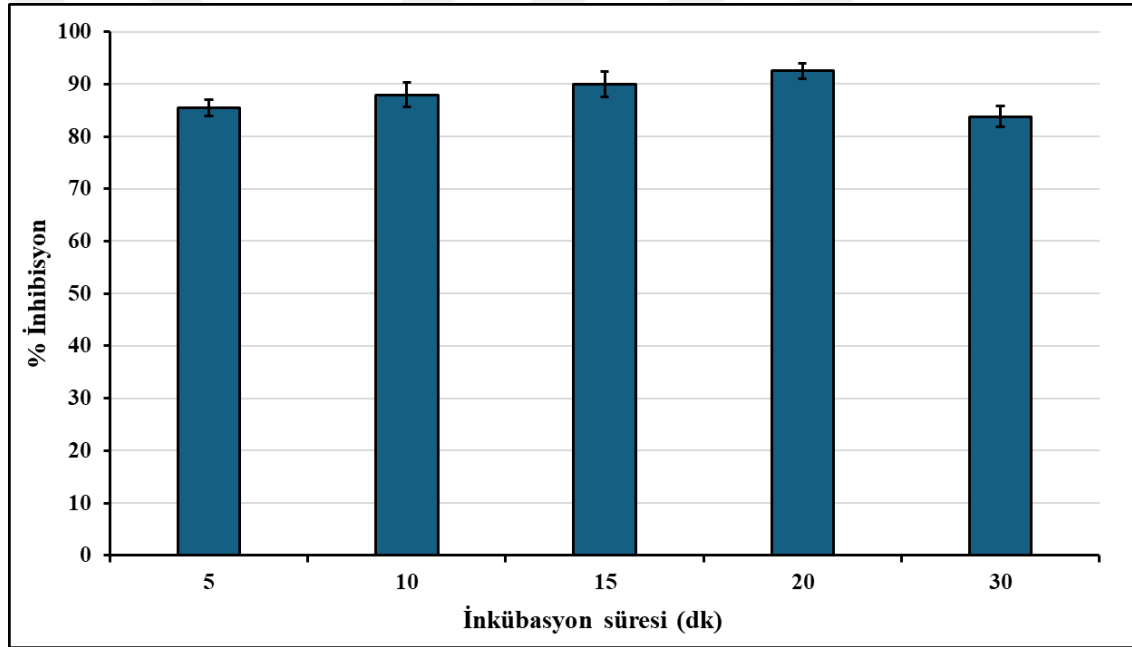
α-glukozidaz enzimi üzerine metanol fraksiyonunun inhibitör etkisi, inkübasyon süresine bağlı olarak değerlendirilmiş ve beş farklı süre (5, 10, 15, 20 ve 30 dakika) için üçer tekrar yapılmıştır. Elde edilen veriler çizelge 4.10’da verilmiş ve şekil 4.42’de sütun grafiği şeklinde sunulmuştur. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelendiğinde, süreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($F = 3.04$, $p = 0.0701$). Bu p-değeri, %95 güven düzeyinde ($p < 0,05$) anlamlılık sınırının üzerinde yer almakla birlikte, %90 güven düzeyinde anlamlılığa yakın bir eğilim göstermektedir. Bu nedenle, süreye bağlı inhibisyon değişimi istatistiksel olarak sınırda bir farklılık göstermektedir.

Çoklu karşılaştırmalar için uygulanan Tukey HSD testi sonuçlarına göre ise, 15 ve 20 dakikalık inkübasyon süreleri arasında %95 ve %90 güven düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0,8880$). Bu bulgu, her iki sürede elde edilen inhibisyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. Ortalama değerler incelendiğinde 15 dakikada %89,93, 20 dakikada ise %92,49 inhibisyon elde edilmiştir. Bu küçük fark, istatistiksel anlamlılık göstermediğinden, iki

süre arasında biyolojik etkinlik açısından önemli bir farklılık bulunmadığı sonucuna varılabilir.

Tüm bu istatistiksel değerlendirmelere ek olarak, bu çalışmada kullanılan diğer enzimler olan asetilkolinesteraz (AChE) ve α -amilaz için de optimum inkübasyon süresi olarak 15 dakika belirlenmiştir. α -glukozidaz için de aynı sürenin seçilmesi, tez genelinde yöntemsel bir tutarlılık sağlamak ve enzimler arası karşılaştırmayı mümkün kılmaktadır. Ayrıca 15. dakikada elde edilen inhibisyon düzeyi zaten maksimuma yakın olduğu için, bu sürenin biyolojik etkinliği temsil etme açısından da yeterli olduğu değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, α -glukozidaz enzimi için metanol fraksiyonunun inhibitör etkisi 15. dakikada yüksek düzeyde gerçekleşmiş ve istatistiksel olarak 20. dakikadan farklılık göstermemiştir. Bu nedenle hem bilimsel geçerlilik hem de tez genelinde karşılaştırılabilirlik sağlamak amacıyla, α -glukozidaz inhibisyon deneylerinde 15 dakikalık inkübasyon süresi optimum koşul olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.42. α -glukozidaz enzimi üzerine metanol fraksiyonunun (100 μ g/mL) zamana bağlı % inhibisyonunu gösteren sütun grafiği. (n=3 hata çubukları: $\pm$ SE)

Çalışma kapsamında, *Salvia dorystoechas* bitkisinden elde edilen metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 μ g/mL derişimlerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler üçlü ölçümlerle analiz edilmiştir. Ölçümler sonucunda her bir fraksiyon için ortalama % inhibisyon değeri, standart sapma (SD), standart hata (SE) ve % bağıl standart sapma (RSD) hesaplanmış ve çizelge 4.13'te verilmiştir. Ardından hem fraksiyon içi (intra-group) hem de fraksiyonlar arası (inter-group) karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) yapılmış ve anlamlı bulunan sonuçlar Tukey HSD post-hoc testi ile detaylandırılmıştır.

Çizelge 4.11’de α -glukozidaz enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları yer almaktadır. Her bir fraksiyonun farklı konsantrasyonlarında gözlenen inhibisyon düzeylerinin kendi içinde anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği gözlenmiştir ($p < 0.001$). Metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonları için elde edilen yüksek F-değerleri, inhibisyon etkisinin konsantrasyona duyarlı olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Bu durum, fraksiyonların biyolojik aktivitesinin doz bağımlılığı gösterdiğini ve optimal inhibitör konsantrasyonun belirlenmesinin önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.11. α -glukozidaz enzimi inhibisyonuna yönelik metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının farklı derişimlerdeki etkilerinin kendi içinde karşılaştırıldığı varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

Fraksiyon	F-değeri	p-değeri
Metanol	216,88	$2,48 \times 10^{-11}$
Hekzan	278,62	$5,63 \times 10^{-12}$
Su	60,78	$4,19 \times 10^{-8}$
Kloroform	159,06	$01,55 \times 10^{-10}$

Çizelge 4.12’de farklı fraksiyonların aynı derişimde α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) sonuçları yer almaktadır. Aynı konsantrasyondaki farklı fraksiyonlar arasında yapılan analizler sonucunda, tüm derişimler için anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Bu istatistiksel farklılıklar doğrultusunda yapılan Tukey HSD post-hoc testi, özellikle su fraksiyonunun 10–100 $\mu\text{g/mL}$ aralığında diğer fraksiyonlara göre anlamlı derecede daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya koymuştur ($p < 0,001$). Örneğin 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda su fraksiyonunun ortalama inhibisyon değeri %74,23 olup; metanol (%56,64), kloroform (%56,90) ve hekzan (%60,08) fraksiyonlarına göre anlamlı derecede daha yüksektir ($p < 0,001$). Benzer şekilde, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerinde de su fraksiyonunun istatistiksel olarak daha etkin olduğu saptanmıştır.

ANOVA sonuçları, hem her fraksiyonun kendi içerisinde artan konsantrasyonlara göre inhibitör aktivitesinde anlamlı farklar olduğunu ($p < 0.001$), hem de her bir konsantrasyonda farklı fraksiyonların inhibisyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Tüm konsantrasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, su fraksiyonu inhibisyon etkisi bakımından istatistiksel olarak en üstün fraksiyon olarak öne çıkmaktadır.

Çizelge 4.12. Farklı fraksiyonların aynı derişimde α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	F-değeri	p-değeri
1	196,63	$7,85 \times 10^{-8}$
5	158,22	$1,85 \times 10^{-7}$
10	24,73	$2,12 \times 10^{-4}$
25	33,24	$7,26 \times 10^{-5}$
50	15,85	$9,95 \times 10^{-4}$
100	42,98	$2,79 \times 10^{-5}$

Şekil 4.43'te sunulan karşılaştırmalı sütun grafiği ve çizelge 4.13'te verilen sonuçlar metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının 1–100 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki farklı derişimlerde α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerini yüzde olarak göstermektedir. Genel olarak tüm fraksiyonlar için inhibitör derişiminin artmasıyla birlikte inhibisyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu durum, fraksiyonların enzim inhibisyon etkisinin konsantrasyon bağımlı bir seyir izlediğini göstermektedir.

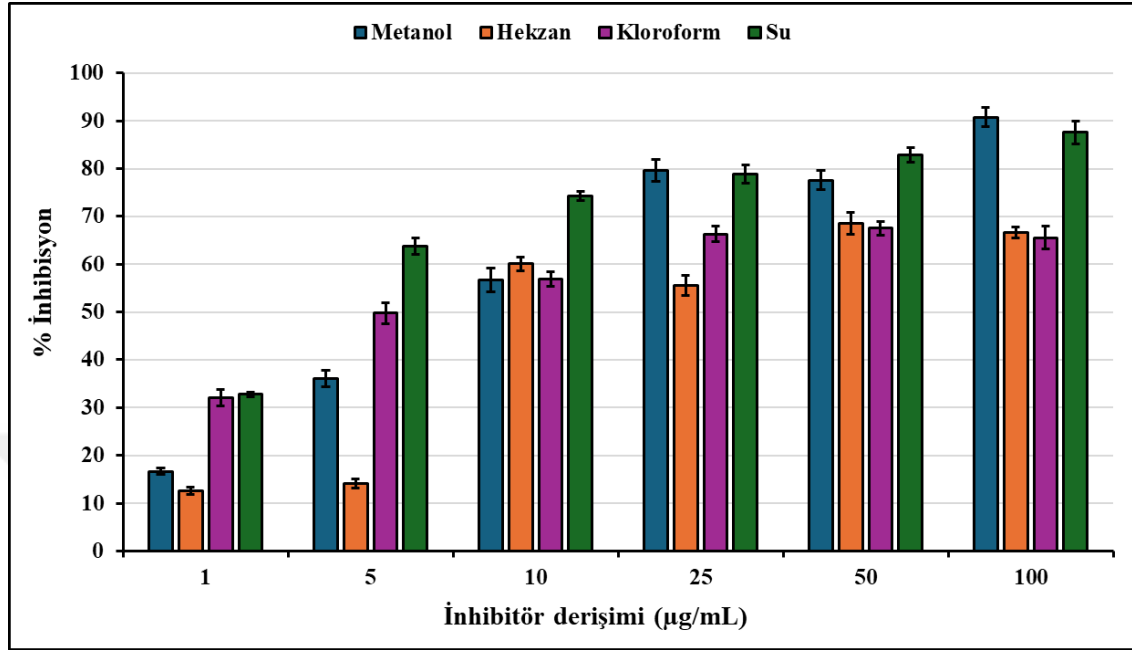
Grafikte özellikle şu eğilimler dikkat çekicidir, su fraksiyonu, tüm konsantrasyonlarda en yüksek inhibisyon değerlerine ulaşmış ve bu etkisini özellikle 10 $\mu\text{g/mL}$ 'den itibaren belirginleştirmiştir. 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de inhibisyon oranı %87,55 olarak belirlenmiştir. Bu durum, su fraksiyonunda yer alan polar bileşiklerin (örneğin fenolik asitler ve flavonoid glikozitler) α -glukozidaz enzimiyle yüksek afiniteye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Metanol fraksiyonu, su fraksiyonuna yakın değerlere ulaşarak özellikle yüksek konsantrasyonlarda (%90,7 inhibisyon ile 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de) etkili bir inhibitör profil sergilemiştir. Bu fraksiyonun da fenolik içerik açısından zengin olması, inhibisyon etkisini açıklamaktadır.

Kloroform fraksiyonu, orta dereceli inhibisyon aktivitesi göstermiştir. 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de ortalama inhibisyon oranı %65,5 olup, özellikle 10–50 $\mu\text{g/mL}$ aralığında daha istikrarlı bir artış göstermiştir. Bu etki, lipofilik bileşenlerin sınırlı fakat istikrarlı bir inhibitör kapasiteye sahip olabileceğini göstermektedir.

Hekzan fraksiyonu ise en düşük inhibisyon değerlerine sahip olmuş, düşük ve orta konsantrasyonlarda (1–25 $\mu\text{g/mL}$) sınırlı bir etki gösterirken, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de inhibisyon oranları %68,6'ya ulaşmıştır. Ancak bu değerler su ve metanol fraksiyonlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür. Bunun yanı sıra hekzan fraksiyonunda, 5 $\mu\text{g/mL}$ ile 10 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki ani inhibisyon artışı (yaklaşık 4 kat) dikkat çekicidir. Bu durum, fraksiyonda yer alan lipofilik bileşiklerin etkin konsantrasyon

eşik değerine ancak 10 $\mu\text{g/mL}$ seviyesinde ulaşabildiğini düşündürmektedir. Düşük konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermeyen bu bileşiklerin, belirli bir derişimin üzerinde enzime bağlanabilirliği artmakta ve inhibitör etki belirginleşmektedir.



Şekil 4.43. Fraksiyonların farklı derişimlerde α -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmalı sütun grafiği (n=3 hata çubukları: $\pm\text{SE}$).

Elde edilen bu sonuçlar, su fraksiyonunun α -glukozidaz enzimi inhibisyonunda en etkili fraksiyon olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Metanol ve kloroform fraksiyonları ise sırasıyla orta-üst ve orta düzeyde etki gösterirken, hekzan fraksiyonu zayıf inhibitör profil sergilemiştir. İnhibitör etkinliğin bu şekilde fraksiyonlara göre değişiklik göstermesi, ekstraksiyon çözücüsünün bileşik profilini doğrudan etkilediğini ve polar fraksiyonların glukozidaz enziminin inhibisyonu açısından daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar literatürde yer alan *Salvia* türlerinin ekstraktlarının α -glukozidaz enzimini inhibe ettiği çalışmalarla karşılaştırıldığında dikkat çekicidir. Mervic ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 7 adet *Salvia* türünden yalnızca *S. fruticosa*, *S. officinalis* ve *S. glutinosa* türlerinin IC_{50} değerleri hesaplanabilir düzeyde inhibisyon gösterdiği ve bu değerlerin sırasıyla 5291, 4451 ve 4496 $\mu\text{g/mL}$ olduğu bildirilmiştir. Karşılaştırma yapıldığında, *S. dorystoechas* türünün metanolik ve sulu fraksiyonlarının çok daha düşük derişimlerde (≤ 100 $\mu\text{g/mL}$) yüksek inhibisyon etkisi sergilediği görülmektedir.

Çizelge 4.13. Fraksiyonların farklı derişimlerde α -glukozidaz enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri

Fraksiyon	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	% İnhibisyon	SD ($\pm$)	SE ($\pm$)	% RSD
Metanol	1	16,68	1,21	0,70	7,25
	5	36,04	2,91	1,68	8,07
	10	56,64	4,33	2,50	7,65
	25	79,56	3,92	2,26	4,93
	50	77,60	3,47	2,00	4,47
	100	90,74	3,45	1,99	3,80
Hekzan	1	12,52	1,28	0,74	10,23
	5	14,09	1,54	0,89	10,95
	10	60,08	2,45	1,41	4,07
	25	55,57	3,66	2,11	6,58
	50	68,63	3,97	2,29	5,78
	100	66,65	2,09	1,21	3,14
Kloroform	1	32,10	1,69	1,69	5,28
	5	49,78	3,74	2,16	7,51
	10	56,90	2,50	1,44	4,40
	25	66,32	2,86	1,65	4,32
	50	67,51	2,59	1,50	3,84
	100	65,54	4,21	2,43	6,42
Su	1	32,78	0,83	0,48	2,52
	5	63,70	3,01	1,74	4,73
	10	74,24	1,62	0,94	2,19
	25	78,84	3,18	1,84	4,04
	50	82,89	2,57	1,48	3,10
	100	87,55	4,00	2,31	4,57

Kalaycıoğlu ve arkadaşları (2018) tarafından yürütülen bir iğfer çalışmada, Türkiye'den toplanan 14 farklı *Salvia* türünün metanolik ekstraktları kullanılarak α -glukozidaz enzimi inhibisyonları IC_{50} değerleriyle belirlenmiş ve sonuçlar 17,6–173 $\mu\text{g/mL}$ aralığında değişmiştir. Bu 14 türün tamamı inhibisyon etki göstermiştir. Bu türler arasında IC_{50} değerleri

- *S. aucheri* var. *aucheri*: $IC_{50} = 17,6 \mu\text{g/mL}$
- *S. adenocaulon*: $IC_{50} = 25,9 \mu\text{g/mL}$
- *S. absconditiflora*: $IC_{50} = 39,5 \mu\text{g/mL}$
- *S. blepharochlaena*: $IC_{50} = 44,9 \mu\text{g/mL}$
- *S. cilicica*: $IC_{50} = 173 \mu\text{g/mL}$

şeklinde bir dağılım gösterirken, bu çalışmada kullanılan fraksiyonların tamamında 25 $\mu\text{g/mL}$ derişimde bile % 50 inhibisyon çoktan aşılmıştır. Bu durum *S. dorystoechas*'tan elde edilen fraksiyonların birçok *Salvia* türünün IC_{50} değerlerinin çok altında kalan derişimlerde bile daha yüksek inhibisyon yaptığını göstermektedir.

Yapılan geniş çaplı çalışmalardan birinde ise Shojaeifard ve arkadaşları (2023), İran florasına özgü 32 farklı *Salvia* türüne ait 50 örneğin α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibitör etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmiştir. Çalışmada, bitkilerin %80 metanol ile elde edilen ekstraktları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *Salvia santolinifolia* (% IC_{50} : 26,23 $\mu\text{g/mL}$), *S. multicaulis*, *S. eremophila* ve *S. dracocephaloides* gibi türler α -glukozidaz enzimi üzerinde yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. Bu türler, referans inhibitör olarak kullanılan akarbose'dan (IC_{50} : 182,65 $\mu\text{g/mL}$) anlamlı derecede daha güçlü etki göstermiştir ($p < 0,05$).

Çalışmada en aktif türlerdeki biyolojik etkilerin, içeriklerindeki spesifik bileşiklerle doğrudan ilişkili olduğu LC-MS, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizleriyle ortaya konmuştur. En baskın bileşikler arasında flavonoid glikozitleri (luteolin-7-O-glukozid, apigenin-7-O-glukuronid vb.), fenolik asitler (özellikle rosmarinik asit) ve diterpenoid fenoller (karnosol ve karnosik asit) yer almaktadır.

Araştırmacılar, total fenolik/flavonoid miktarı ile enzim inhibisyonu arasında doğrudan güçlü bir korelasyon olmadığını, asıl etkinin spesifik fenolik yapılar ve bunların enzimle kurduğu bağlanma tipi ve sinerjistik etkileşimlerle belirlendiğini vurgulamıştır. Bu bulgular, *Salvia* türlerinin geleneksel kullanımlarına dayalı antidiabetik potansiyellerinin bilimsel olarak desteklenebileceğini ve yeni doğal α -glukozidaz inhibitörlerinin keşfinde bu türlerin önemli bir kaynak oluşturabileceğini göstermektedir. Shojaeifard ve arkadaşlarının bu kapsamlı çalışması, hem fitokimyasal profil hem de biyolojik aktivite açısından türler arası çeşitliliğin önemine işaret ederek, α -glukozidaz inhibisyonuna yönelik doğal ürün araştırmalarına önemli bir temel oluşturmaktadır.

Bir önceki bölümlerde yer alan enzim inhibisyon çalışmalarının sonuçlarıyla kıyasladığımızda fraksiyonlar, AChE ve α -amilaz üzerinde görece düşük inhibitör etki sergilerken, α -glukozidaz üzerinde belirgin düzeyde yüksek inhibitör etkinlik

göstermiştir. Bu durum, bitki ekstraktlarının içerdiği bileşiklerin farklı enzimlerin aktif bölgelerine olan bağlanma afinitelerinin değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Enzimlerin katalitik mekanizmaları ve aktif bölge yapılarının birbirinden farklı olması, inhibitör bileşiklerin hedef seçiciliğini önemli ölçüde etkilemektedir. AChE enzimi, serin-histidin-glutamat kalıntılarından oluşan klasik bir katalitik triad yapısına sahiptir ve ester hidrolizine özgü bir mekanizma izler. α -amilaz, karbonhidrat polimerlerini parçalamak üzere çalışan ve aktif bölgesinde bir aspartik asit katalitik merkezi bulunan bir endo-amilazdır. α -glukozidaz ise disakkaritleri glukozu ayıran, daha dar bir aktif bölge yapısına sahip bir egzo-enzimdir ve substrat bağlanması için şeker halkasına özgü özel bir bağlanma cebi barındırır. Bu yapısal ve fiziksel farklılıklar, fraksiyon içerisindeki bazı bileşiklerin özellikle α -glukozidaz gibi şeker substratlarına özgü bağlanma bölgelerine yüksek afiniteli olmasına neden olabilirken, AChE veya α -amilaz gibi farklı substratlara özgü enzimler üzerinde daha düşük etki göstermelerine yol açabilmektedir.

Bu farklılığın olası bir açıklaması, çalışmada tespit edilen fenolik bileşiklerin yapısal özellikleri ile ilişkilendirilebilir. Özellikle rutin gibi flavonoid glikozidler, yapılarında taşıdıkları şeker birimleri sayesinde α -glukozidaz enziminin şeker tanıma bölgelerine yüksek afinite gösterebilir. Rutin, kuersetin aglikonuna bağlı bir rutinoz (glukoz + ramnoz) birimi içerdiği için, α -glukozidazın doğal substratlarına benzer bir bağlanma motifine sahiptir. Asetilkolinesteraz ve α -amilaz gibi farklı katalitik mekanizmalara sahip enzimlerde ise bu tür bir glikozidik yapı, aktif bölgeyle daha düşük etkileşim sağlayabileceğinden, rutin içeren fraksiyonların bu enzimler üzerindeki inhibitör etkisi daha sınırlı kalabilir. Bu durum, fraksiyonlardaki bileşiklerin enzim spesifikliği açısından seçici bir inhibitör profil sergilediğini düşündürmektedir.

Doğrudan flavonoid miktarına bağlanmasa da fraksiyonların içerdiği flavonoid çeşitliliği de önemlidir. Tadera ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (2006), altı farklı flavonoid grubuna ait toplam 25 bileşiğin, üç farklı enzim sistemi üzerindeki inhibitör etkilerini sistematik olarak karşılaştırmışlardır. Çalışma, flavonoidlerin yapısal özellikleriyle inhibitör etkinlikleri arasındaki ilişkiyi derinlemesine inceleyerek, bu bileşiklerin enzim seçiciliğini belirleyen yapısal motiflerini ortaya koymuştur. Çalışmada maya α -glukozidazı üzerinde yüksek inhibitör etki gösteren flavonoid grupları antosiyanidinler, izoflavonlar ve flavonoller olarak sıralanmıştır. Özellikle siyanidin, genistein, kuersetin, miristin ve epigallokateşin gallat, IC_{50} değeri $15 \mu M$ 'nin altında kalan güçlü inhibitörler olarak öne çıkmıştır. Moleküler düzeyde yapılan analizler, flavonoidlerin B halkasındaki 4'-OH grubu, B halkasının poli-hidroksillenmiş olması ve C halkasında 2,3-çift bağı ile 4-karbonil grubunun varlığının inhibitör etkinliği artıran yapısal özellikler olduğunu göstermiştir.

Bu bulgular, çalışmada gözlemlenen α -glukozidaz üzerine yüksek inhibitör etkinliği desteklemekte ve fraksiyonların antidiyabetik potansiyelini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, rutin gibi yapısal özelliklere sahip bileşiklerin varlığı, fraksiyonlarda bulunan flavonoidlerin oranı ve içeriği α -glukozidaz seçiciliğinin ve bu enzim üzerindeki inhibitör etkinliğin temel belirleyicilerinden biri olabilir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında *D. hastata* bitkisinin ham metanolik ekstraktından elde edilen metanol, hekzan, kloroform ve su fraksiyonlarının *in vitro* antidiyabetik ve anti-Alzheimer etkileri incelenmiş çeşitli fenolik bileşenlerin analizi, toplam fenolik ve toplam flavonoid bileşen tayinleri ile enzim inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bulgular, bitkinin incelenen enzimler üzerindeki biyolojik özelliklerini açığa çıkarmıştır.

Fenolik bileşenlerin UHPLC-MS/MS analizleri, bitkinin zengin bir fenolik profil sunduğunu göstermiştir. Özellikle karnosik asit, karnosol ve rutin incelenen fraksiyonlarda miktarca en fazla bulunan bileşenler olarak dikkat çekmiştir. Bu tez çalışmasında *D. hastata* bitkisinde ilk kez varlığı gösterilmiş sekiz adet fenolik bileşen vardır. Bu bileşikler; rutin, gallik asit, kaftarik asit, kateşin, epigallokateşin gallat, epikateşin gallat, epikateşin, siyanidin ve delfinidindir. Özellikle rutinün bağıl olarak yüksek miktardaki varlığının gösterilmesi ve karnosik asit ve karnosolden sonra üçüncü en çok bulunan bileşen olması oldukça önemlidir. Karnosik asit ve karnosolün tespit edilen yüksek oranları *D. hastata* bitkisinin bu bileşenlerin kaynağı olarak kullanılabileceği sonucu doğurmuştur.

Toplam fenolik bileşen tayininde metanol fraksiyonu $300,93 \pm 7,66$ mg GAE / g KF değeri ile, kloroform fraksiyonu ise $223,96 \pm 6,88$ mg GAE / g KF değeri ile en yüksek fenolik bileşen içeriğine sahip fraksiyonlardır. Toplam flavonoid bileşen tayininde ise $49,39 \pm 0,22$ mg QE / g KF değeri ile su en yüksek flavonoid içeriğine sahip fraksiyondur.

Tüm enzim çalışmalarında inhibitörün inkübasyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir. Kinetik çalışmaların takibini için tüm inhibitörlerde Lambert-Beer yasasına uydukları ve substrat ile girişim yapmadıkları 0-100 µg/mL derişim aralığı belirlenmiştir. AChE enziminin inhibisyonunda metanol ve hekzan fraksiyonları 10 µg/mL konsantrasyonda %40'ın üzerinde inhibisyon göstermiş; kloroform ve su fraksiyonları yaklaşık %25 inhibisyon sağlamıştır. α-amilaz enziminin inhibisyonunda hekzan fraksiyonu 50 µg/mL'lik çözeltisi ile %86 oranında inhibisyon yaparak en yüksek aktiviteyi sergilemiştir. α-glukozidaz enziminin inhibisyonunda 10 µg/mL'lik derişimde tüm fraksiyonlar %50-%75 arasında inhibisyon göstermiştir. Böylece en yüksek inhibisyon sonuçları α-glukozidaz enziminde gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, *D. hastata*'nın fenolik bileşenlerce zengin bir kaynağı temsil ettiğini ve *D. hastata*'nın yalnızca bir değil birden fazla metabolik ve nörolojik yolağı hedefleyen üç önemli enzimi inhibe edebildiğini ortaya koymuştur. AChE inhibisyonu ile nöroprotektif, α-amilaz ve α-glukozidaz inhibisyonları ile antidiyabetik etkiler aynı bitkisel kaynakta gözlemlenmiştir. Çoklu hedeflere yönelik bu biyolojik aktivite, bitkinin “çok fonksiyonlu biyoterapötik” potansiyelini ön plana çıkarmaktadır. Bu yönüyle *D. hastata*, yalnızca tek bir hastalığa değil, metabolik sendromlar ve yaşa bağlı dejeneratif hastalıklar gibi kompleks hastalık tablolarına yönelik bitkisel formülasyonlarda kullanılabileceğini ve yeni bitki temelli fonksiyonel gıda takviyelerinde potansiyel bir aday olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olup *D. hastata*'nın potansiyelinin doğrulanması için *in vivo* deneylerinin yapılması da önerilmektedir. Fraksiyonların fenolik bileşen tayininde sadece belirtilen bileşikler tayin edilmiştir dolayısıyla

fraksiyonların içerdiği başka bileşiklerin varlığı da göz ardı edilmemelidir. Kinetik analizlerde elde edilen K_m ve V_{max} değerleri, belirli bir substrat ve koşul altında ölçülmüş olup farklı substratlar veya değişken çevresel koşullar altında farklılık gösterebilir. Ayrıca inhibisyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar belirtilen koşullar altında alınan fraksiyonlara ait olup farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak elde edilen ekstraktların bu enzimler üzerindeki inhibisyon sonuçları da değişecektir. Gelecek çalışmalarda fraksiyonların toksikolojik değerlendirmelerinin yapılması ve *in vivo* koşullardaki doz-yanıt ilişkisinin ortaya konulması gerekmektedir dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre insan kullanımı için doğrudan bir öneri yapılamamakta ancak *D. hastata* bitkisinin potansiyeli ortaya konulmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Ademosun, A. O., Oboh, G., Bello, F., & Ayeni, P. O. (2016). Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (Rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 21(4), NP11-NP17.
- Ahangarpour, A., Sayahi, M., & Sayahi, M. (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), 854-857
- Ahn, J., Alford, A. R., & Niemeyer, E. D. (2020). Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1720-1732.
- Alam, F., Islam, M. A., Kamal, M. A., & Gan, S. H. (2018). Updates on managing type 2 diabetes mellitus with natural products: towards antidiabetic drugdevelopment. *Current medicinal chemistry*, 25(39), 5395-5431.
- Alanazi, F. K., Radwan, A. A., & Aou-Auda, H. (2023). Molecular scaffold and biological activities of anti-Alzheimer agents. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 22(2), 439-451.
- Albayrak, S. (2021). Biological activities of essential oil and methanolic extract of endemic *Dorytoechas hastata Boiss et Heldr. ex Benth* (Lamiaceae) from Turkey. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 59(12), 891-898.
- Ali Asgar, M. D. (2013). Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91-103.
- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1131412.
- American Diabetes Association. 2018. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes – 2018. *Diabetes Care* 41 (Supplement 1):S13–S27.
- Anonymus 1: <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001428615> [Son erişim tarihi: 23.04.2025].
- Anonymus 2: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77161656-1> [Son erişim tarihi: 23.04.2025].
- Anonymus 3: <https://www.ipni.org/n/77161656-1>[Son erişim tarihi: 23.04.2025].
- Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2020). Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox biology*, 34, 101517.
- Armstrong, D. M., Saper, C. B., Levey, A. I., Wainer, B. H., & Terry, R. D. (1983). Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *Journal of Comparative Neurology*, 216(1), 53-68.

- Bacanli, M., Dilsiz, S. A., Başaran, N., & Başaran, A. A. (2019). Effects of phytochemicals against diabetes. *Advances in food and nutrition research*, 89, 209-238.
- Barnum, D. W. (1977). Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Analytica Chimica Acta*, 89(1), 157-166.
- Bhandari, M. R., Jong-Anurakkun, N., Hong, G., & Kawabata, J. (2008). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*, 106(1), 247-252.
- Bhikshapathi, D., Madhukar, P., Kumar, B. D., & Kumar, G. A. (2013). Formulation and characterization of pioglitazone HCl self emulsifying drug delivery system. *Der Pharmacia Lettre*, 5(2), 292-305.
- Blahova, J., Martiniakova, M., Babikova, M., Kovacova, V., Mondockova, V., & Omelka, R. (2021). Pharmaceutical drugs and natural therapeutic products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Pharmaceuticals*, 14(8), 806.
- Blaschek, W. (2017). Natural products as lead compounds for sodium glucose cotransporter (SGLT) inhibitors. *Planta medica*, 83(12/13), 985-993.
- Bock, A., Steinhäuser, U., & Drusch, S. (2021). Partitioning behavior and interfacial activity of phenolic acid derivatives and their impact on β -lactoglobulin at the oil-water interface. *Food Biophysics*, 16(2), 191-202.
- Bolognesi, M. L., Banzi, R., Bartolini, M., Cavalli, A., Tarozzi, A., Andrisano, V., ... & Melchiorre, C. (2007). Novel class of quinone-bearing polyamines as multi-target-directed ligands to combat Alzheimer's disease. *Journal of medicinal chemistry*, 50(20), 4882-4897.
- Boufadi, Y. M., et al. (2021). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Salvia officinalis* extract from Algeria. *Pharmacognosy Journal*, 13(2), 506-512.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Recanatini, M., & Melchiorre, C. (2008). Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of medicinal chemistry*, 51(3), 347-372.
- Celep, F., & Dirmenci, T. (2017). Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 14-27.
- Chen, Y., Yu, Q., & Gong, C. X. (2019). Molecular connection between diabetes and dementia. *Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer's Disease*, 103-131.
- Christ, B., & Müller, K. H. (1960). Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Archiv der Pharmazie*, 293(12), 1033-1042.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335.

- Craig, L. A., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(6), 1397-1409.
- Cummings, J., Lai, T. J., Hemrungrojn, S., Mohandas, E., Yun Kim, S., Nair, G., & Dash, A. (2016). Role of donepezil in the management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *CNS neuroscience & therapeutics*, 22(3), 159-166.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Darvesh, S., Hopkins, D. A., & Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 131-138.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-22.
- Dhital, S., F. J. Warren, P. J. Butterworth, P. R. Ellis, and M. J. Gidley. 2017. Mechanisms of starch digestion by α -amylase-structural basis for kinetic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (5):875–92.
- Dominguez Avila, J. A., Rodrigo Garcia, J., Gonzalez Aguilar, G. A., & De la Rosa, L. A. (2017). The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling. *Molecules*, 22(6), 903.
- Drew, B. T., González-Gallegos, J. G., Xiang, C. L., Kriebel, R., Drummond, C. P., Walker, J. B., & Sytsma, K. J. (2017). *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*, 66(1), 133–145.
- Duarte, A. M., Guarino, M. P., Barroso, S., & Gil, M. M. (2020). Phytopharmacological strategies in the management of type 2 diabetes mellitus. *Foods*, 9(3), 271.
- Eckroat, T. J., Manross, D. L., & Cowan, S. C. (2020). Merged tacrine-based, multitarget-directed acetylcholinesterase inhibitors 2015–present: Synthesis and biological activity. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 5965.
- Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), 349-362.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Emre, M., Tsolaki, M., Bonuccelli, U., Destée, A., Tolosa, E., Kutzelnigg, A., ... & Jones, R. (2010). Memantine for patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 9(10), 969-977.
- Erdağ, B., Emek, Y., & Aydoğan, S. (2010). Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. *Turkish Journal of Botany*, 34(3), 233-240.
- Erkan, N., Cetin, H., & Ayranci, E. (2011). Antioxidant activities of *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath and *Sideritis arguta* Boiss et Heldr: Identification of free

- flavonoids and cinnamic acid derivatives. *Food Research International*, 44(1), 297-303.
- Falé, P. L., Ascensão, L., Serralheiro, M. L., & Haris, P. I. (2012). Interaction between *Plectranthus barbatus* herbal tea components and acetylcholinesterase: binding and activity studies. *Food & function*, 3(11), 1176-1184.
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological reviews*, 93(1), 137-188.
- Gannon, N. P., Conn, C. A., & Vaughan, R. A. (2015). Dietary stimulators of GLUT4 expression and translocation in skeletal muscle: A mini-review. *Molecular nutrition & food research*, 59(1), 48-64.
- Ghosh, S., Durgvanshi, S., Agarwal, S., Raghunath, M., & Sinha, J. K. (2020). Current status of drug targets and emerging therapeutic strategies in the management of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 18(9), 883-903.
- Gothai, S., Ganesan, P., Park, S. Y., Fakurazi, S., Choi, D. K., & Arulselvan, P. (2016). Natural phyto-bioactive compounds for the treatment of type 2 diabetes: inflammation as a target. *Nutrients*, 8(8), 461.
- Grzegorzczak-Karolak, I., Wysokińska, H., & Goławska, S. (2018). Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 25(1), 133-142.
- Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F., & Bhansali, A. (2013). Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of diabetes investigation*, 4(6), 640-650.
- Halim, M., & Halim, A. (2019). The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes & metabolic syndrome: clinical research & reviews*, 13(2), 1165-1172.
- Hansen, R. A., Gartlehner, G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G., & Jonas, D. E. (2008). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clinical interventions in aging*, 3(2), 211-225.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10576-10581.
- Hotta, N. (2019). A new perspective on the biguanide, metformin therapy in type 2 diabetes and lactic acidosis. *Journal of Diabetes Investigation*, 10(4), 906.
- Hussain, T., Tan, B., Murtaza, G., Liu, G., Rahu, N., Kalhor, M. S., ... & Yin, Y. (2020). Flavonoids and type 2 diabetes: Evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy. *Pharmacological research*, 152, 104629.
- Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., ... & Li, X. (2018). Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders. *International journal of biological sciences*, 14(3), 341.

- International Diabetes Federation. 2021. IDF Diabetes Atlas. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>
- Işık, G., & Yücel, E. (2017). Biological and ecological characteristics of a monotypic relict endemic species: *Dorystoechas hastata* (Lamiaceae). *Int J Agri and Env Res*, 3(2), 202-211.
- Johnson, G., & Moore, S. W. (2012). Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. *Neurochemistry international*, 61(5), 783-797.
- Kalaycıoğlu, Z., Uzaşçı, S., Dirmenci, T., & Erim, F. B. (2018). α -Glucosidase enzyme inhibitory effects and ursolic and oleanolic acid contents of fourteen Anatolian *Salvia* species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 155, 284-287.
- Kan, A., Günhan, R. S., & Çelik, S. A. (2015). The Chemical Composition Profile of *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. Ex Bentham Cultivated in Turkey. *Records of Natural Products*, 9(1).
- Kandiah, N., Pai, M. C., Senanarong, V., Looi, I., Ampil, E., Park, K. W., ... & Christopher, S. (2017). Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical interventions in aging*, 697-707.
- Kapková, P. 2004. Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren der Acetylcholinesterase und Erzeugung von neuen Leitstrukturen mittels „Random Chemistry“. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg 153 p.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygün, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- Kashtoh, H., & Baek, K. H. (2023). New insights into the latest advancement in α -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects. *Plants*, 12(16), 2944.
- Kasprzak, M. M., Erxleben, A., & Ochocki, J. *Properties and applications of flavonoid metal complexes*, RSC Adv. 5 (2015) 45853–45877.
- Katalinić, M., Rusak, G., Barović, J. D., Šinko, G., Jelić, D., Antolović, R., & Kovarik, Z. (2010). Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry*, 45(1), 186-192.
- Kavruk, M., Özalp, V. C., & Öktem, H. A. (2013). Portable Bioactive Paper-Based Sensor for Quantification of Pesticides. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013(1), 932946.
- Khadem, S., & Marles, R. J. (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*, 15(11), 7985-8005.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kislik, V. S. (2011). *Solvent extraction: classical and novel approaches*. Elsevier. Amsterdam, 573 s.

- Krentz, A. J., & Bailey, C. J. (2005). Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65, 385-411.
- Kubis-Kubiak, A. M., Rorbach-Dolata, A., & Piwowar, A. (2019). Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: Friends or foes?. *Mechanisms of Ageing and Development*, 181, 7-21
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4, 86-93.
- Li, Q., Yang, H., Chen, Y., & Sun, H. (2017). Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 132, 294-309.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*, 2013.
- Lucas-Meunier, E., Fossier, P., Baux, G., & Amar, M. (2003). Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflügers Archiv*, 446, 17-29.
- Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The interactions between polyphenols and microorganisms, especially gut microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 188.
- Mantzourani, C., Tarantilis, P. A., & Kokotou, M. G. (2023). Carnosic Acid and Carnosol: Analytical Methods for Their Determination in Plants, Foods and Biological Samples. *Separations*, 10(9), 481.
- Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., de la Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules*, 22(4), 669.
- Mekonnen, A., & Desta, W. (2021). Comparative study of the antioxidant and antibacterial activities of *Rumex abyssinicus* with commercially available *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* in Bahir Dar city, Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 8, 1-11.
- MerviĆ, M., Bival Štefan, M., Kindl, M., Blažeković, B., Marijan, M., & Vladimir-Knežević, S. (2022). Comparative antioxidant, anti-acetylcholinesterase and anti- α -glucosidase activities of mediterranean salvia species. *Plants*, 11(5), 625.
- Mišić, D., Šiler, B., Gašić, U., Avramov, S., Živković, S., Nestorović Živković, J., ... & Tešić, Ž. (2015). Simultaneous UHPLC/DAD/(+/-) HESI-MS/MS analysis of phenolic acids and nepetalactones in methanol extracts of *Nepeta* species: a possible application in chemotaxonomic studies. *Phytochemical Analysis*, 26(1), 72-85.
- Moradi-Marjaneh, R., Paseban, M., & Sahebkar, A. (2019). Natural products with SGLT2 inhibitory activity: Possibilities of application for the treatment of diabetes. *Phytotherapy Research*, 33(10), 2518-2530.
- Moshari-Nasirkandi, A., Alirezalu, A., Alipour, H., & Amato, J. (2023). Screening of 20 species from Lamiaceae family based on phytochemical analysis, antioxidant activity and HPLC profiling. *Scientific Reports*, 13(1), 16987.

- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M., & Houghton, P. J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289-300.
- Munhoz, A., & Frode, T. S. (2018). Isolated compounds from natural products with potential antidiabetic activity-A systematic review. *Current diabetes reviews*, 14(1), 36-106.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (5th ed.). W.H. Freeman. 1158p.
- Negahdari, R., Bohlouli, S., Sharifi, S., Maleki Dizaj, S., Rahbar Saadat, Y., Khezri, K., & Raeesi, S. (2021). Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. *Phytotherapy Research*, 35(4), 1719-1738.
- Nie, X., Chen, Z., Pang, L., Wang, L., Jiang, H., Chen, Y., & Zhang, J. (2020). Oral nano drug delivery systems for the treatment of type 2 diabetes mellitus: an available administration strategy for antidiabetic phytochemicals. *International journal of nanomedicine*, 10215-10240.
- Oliveira, H. M., Pinheiro, A. Q., Fonseca, A. J., Cabrita, A. R., & Maia, M. R. (2019). Flexible and expeditious assay for quantitative monitoring of alpha-amylase and amyloglucosidase activities. *MethodsX*, 6, 246-258.
- Ononamadu, C. J., Ezeigwe, O. C., Owolafe, T. A., Ihegboro, G. O., Lawal, T. A., Salawu, K., ... & Aminu, I. (2020). Starch-iodine assay method underestimates alpha-amylase inhibitory potential of antioxidative compounds and extracts. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 101(1), 45-54.
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Ozturk, N., Akaydin, G., & Sener, B. (2012). Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic Salvia species. *Food Chemistry*, 132(3), 1360-1367.
- Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., ... & Choudhary, M. I. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish Salvia species. *Food Chemistry*, 103(4), 1247-1254.
- Otsuka, H. (2005). Purification by solvent extraction using partition coefficient. *Natural Products Isolation*, 269-273.
- Patel, H., Royall, P. G., Gaisford, S., Williams, G. R., Edwards, C. H., Warren, F. J., ... & Butterworth, P. J. (2017). Structural and enzyme kinetic studies of retrograded starch: Inhibition of α -amylase and consequences for intestinal digestion of starch. *Carbohydrate Polymers*, 164, 154-161.
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The chemistry behind the folin–ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543-17553.
- Pérez-Ochoa, M. L., et al. (2023). Plant and growth condition interactions on the phenolic compound contents and antioxidant activity in *Salvia circinata* Cav., a medicinal sage. *Diversity*, 15(5), 656.

- Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., & Rajbhandary, S. (2020). Total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities of fruit, seed, and bark extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*, 2020(1), 8780704.
- Prvulovic, D., Hampel, H., & Pantel, J. (2010). Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(3), 345-354.
- Rich, D.H. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. *Clin.Chem.* 2005, 51, 2219–2220
- Riyaphan, J., Pham, D. C., Leong, M. K., & Weng, C. F. (2021). In silico approaches to identify polyphenol compounds as α -glucosidase and α -amylase inhibitors against type-II diabetes. *Biomolecules*, 11(12), 1877.
- Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2011). Flavonoids as analytical reagents. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41(4), 335-345.
- Rorbach-Dolata, A., & Piwowar, A. (2019). Neurometabolic evidence supporting the hypothesis of increased incidence of type 3 diabetes mellitus in the 21st century. *BioMed Research International*, 2019.
- Samuels, S. C., & Davis, K. L. (1997). A risk-benefit assessment of tacrine in the treatment of Alzheimer's disease. *Drug safety*, 16(1), 66-77.
- Sayem, A. S. M., Arya, A., Karimian, H., Krishnasamy, N., Ashok Hasamnis, A., & Hossain, C. F. (2018). Action of phytochemicals on insulin signaling pathways accelerating glucose transporter (GLUT4) protein translocation. *Molecules*, 23(2), 258.
- Selim, C., & Mutlu, S. S. (2016). Evaluation of association between morphological traits and geographic characters in relict endemic *Dorystoechas hastata*.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., & Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537(7618), 50-56.
- Shahrivar-Gargari, M., Hamzeh-Mivehroud, M., Hemmati, S., Mojarad, J. S., Notash, B., Küçükkılınç, T. T., ... & Dastmalchi, S. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of novel indanone-based hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Structure*, 1229, 129787.
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112-81129.
- Shojaeifard, Z., Moheimanian, N., & Jassbi, A. R. (2023). Comparison of inhibitory activities of 50 *Salvia* species against α -Glucosidase. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 22(2), 1685-1693.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lwt*, 150, 111932.
- Silman, I., & Sussman, J. L. (2008). Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 3-10.

- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., & Singh, D. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *European journal of medicinal chemistry*, 70, 165-188.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Spréa, R. M., Caleja, C., Pinela, J., Finimundy, T. C., Calhelha, R. C., Kostić, M., ... & Barros, L. (2022). Comparative study on the phenolic composition and in vitro bioactivity of medicinal and aromatic plants from the Lamiaceae family. *Food Research International*, 161, 111875.
- Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167–2180.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., ... & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 183, 109119.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(2), 149-153.
- Tripathi KD, “Essentials of Medical Pharmacology”, 8th edition, 2019, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi/ London/ Panama
- Tseng, W. S., & Tzeng, N. S. (2012). A rivastigmine-precipitated manic episode in a patient with Alzheimer-type dementia. *International psychogeriatrics*, 24(10), 1697-1699.
- Tohma, H., et al. (2016). RP-HPLC/MS/MS Analysis of the Phenolic Compounds, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Salvia* L. Species. *Molecules*, 21(8), 1064.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 10(4), 315-331.
- Uçar, S. 2015. A549 Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattında Daha Önce Etkinliği Tanımlanmamış Türkiye Endemiği Olan 3 Bitkinin Antitümöral Aktiviteleri Açısından Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi 41s.
- Van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., ... & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in early Alzheimer’s disease. *New England Journal of Medicine*, 388(1), 9-21.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949.

- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch? Iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical biochemistry*, 351(1), 146-148.
- Xu, Y., Cheng, S., Sussman, J. L., Silman, I., & Jiang, H. (2017). Computational studies on acetylcholinesterases. *Molecules*, 22(8), 1324.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 1-26.



ÖZGEÇMİŞ

Betül TAŞKIRAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2022-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	
2011-2019	Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara
2019-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2022-Devam ediyor	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya