

T.C.
KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTEP FISTIĞI (*Pistacia vera L.*) MEYVE SAP EKSTRELERİ VE SAF
METABOLİTLERİNİN ANTİDİYABETİK VE ANTİKOLİNESTERAZ
ÖZELLİKLERİ

LAWALI YABO DAMBAGI

DANIŞMAN: PROF. DR. AHMET ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

MAYIS 2019

KİLİS

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTEP FISTIĞI (*Pistacia vera* L.) MEYVE SAP EKSTRELERİ VE SAF METABOLİTLERİNİN ANTİDİYABETİK VE ANTİKOLİNESTERAZ ÖZELLİKLERİ

Lawali Yabo DAMBAGI

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs, 2019, sayfa: 157

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Bu çalışmada, Kolon ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri ile Antepfıstığı (*P. vera* L.) meyvelerinin meyve sap kısımlarının kloroform ve etanol ekstrelerinden 6 molekül izole edildi. Saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapıları FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR ve 2D-NMR yöntemleri ile, mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**), tirukallol (**PVSC-3**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**), pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) olarak belirlendi. Etanol ekstresinden izole edilen ve **PVSE-1** kodlanan shikimic asit türevi bileşik literatür için yeni bir bileşik olup **pistasionik asit** olarak tarafımızca adlandırıldı. Ancak, pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünde monosakkarit birimlerinin birbirine bağlanma pozisyonları spektroskopik yöntemlerle tam olarak aydınlatılamadı. Meyve sap kısımlarından elde edilen hekzan, kloroform ve etanol ekstreleri ile bu ekstrelerden saflaştırılan saf metabolitlerin antidiyabetik özelliği α -glikozidaz ve α -amilaz enzim aktivitelerine karşı test edilerek belirlendi ve antidiyabetik özellikleri antidiyabetik ilaç etken maddesi akarboz ile mukayese edildi. Tüm ekstre ve saf metabolitler değişik oranlarda her iki enzime karşı da inhibisyon etkisi göstererek antidiyabetik özellik sergilediler. Hem ekstre hem de saf metabolitlerin

tümünün α -glukozidaz enzimine karşı inhibitör etkileri akarbozdan ($IC_{50}=10,30$ mg/mL) yüksek olmasına karşın en düşük IC_{50} değerleri ile mastikadienolik asit ($IC_{50}=0,03$ mg/mL, **PVSC-4**), mastikadienonik asit ($IC_{50}=0,13$ mg/mL, **PVSC-1** ve **PVSC-2**) ve hekzan ekstresi ($IC_{50}= 0,09$ mg/mL) en aktif uygulamalar olarak bulundu. Bununla beraber, akarbozun α -amilaz enzimine karşı inhibisyon etkisinin $IC_{50}=0,07$ mg/mL ile hem ekstre hem de saf metabolitlerin inhibisyon etkisinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Uygulamalar arasında α -amilaz enziminin aktivitesine karşı en iyi inhibitörler düşük IC_{50} değerleri ile sırasıyla etanol ekstresi ($IC_{50}=5,17$ mg/mL), pistasionik asit ($IC_{50}=7,35$ mg/mL, **PVSE-1**), tirukallol ($IC_{50}=7,58$ mg/mL, **PVSC-3**) ve mastikadienolik asit ($IC_{50}=8,22$ mg/mL, **PVSC-4**) uygulamalarıdır. Ekstre ve saf metabolitlerin ayrıca antikolinesteraz özellikleri asetilkolin esteraz (AChE) ve butirilkolin esteraz (BChE) enzim aktivitesine karşı inhibitör özellikleri test edilerek araştırıldı. Sonuçlar tüm ekstre ve saf metabolitlerin antikolinesteraz özelliklerinin ticari kolinesteraz inhibitörleri, neostigmin ve galantamin nazaran daha zayıf olduğunu ve tüm uygulamaların ancak çok yüksek konsantrasyonlarda bu enzimlerin aktivitesini azalttığı belirlendi. AChE enzimine karşı en aktif uygulama $IC_{50}=42,55$ mg/mL ile tirukallol (**PVSC-3**) iken BChE enzimine karşı en aktif uygulama ise $IC_{50}=3,72$ mg/mL ile mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) uygulamasıdır. Bu sonuçlar *P. vera* sap kısımlarından elde edilen ekstrelerin ve saf metabolitlerin antidiyabetik reaktif olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia vera*, meyve sap, antidiyabetik, antikolinesteraz, pistasionik asit, tirukallan, mastikadienonik asit, mastikadienolik asit.

ABSTRACT

MSc Thesis

ANTIDIABETIC AND ANTICHOLINESTERASE PROPERTIES OF EXTRACTS AND PURE METABOLITES OF FRUIT STEMS OF PISTACHIO (*P. vera* L.)

Lawali Yabo DAMBAGI

Kilis 7 Aralık University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of chemistry

May, 2019, Page: 157

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

In this study, six metabolites were isolated by column and thin layer chromatographic methods from the chloroform and ethanol extract of fruit stems of *P. vera*. The chemical structures of the purified compounds were characterized via FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR and 2D-NMR methods as masticadienonic acid (**PVSC-1** and **PVSC-2**), tirucallol (**PVSC-3**), masticadienolic acid (**PVSC-4**), pistachionic acid (**PVSE-1**) and inulobiose (**PVSE-2**). A shikimic acid derivative compound (**PVSE-1**) isolated from the ethanol extract as is a novel compound for the literature and it was named as **pistachionic acid**. However, the binding positions of monosaccharide units in the pistachionic acid (**PVSE-1**) could not be exactly elucidated by spectroscopic methods. The hexane, chloroform and ethanol extracts obtained from the fruit stems of pistachio and the pure metabolites isolated from the extracts were tested on α -glycosidase and α -amylase enzyme activities to determine their antidiabetic properties, and their antidiabetic properties were compared with those of acarbose a commercial antidiabetic drug. All extracts and pure metabolites exhibited antidiabetic properties by inhibiting both enzymes showing inhibitory effects at the different rates. The inhibitory effects of both extract and pure metabolites against α -glycosidase enzyme were higher than that of the acarbose ($IC_{50}=10,30$ mg/mL), whereas masticadienolic acid ($IC_{50}=0,03$

mg/mL, **PVSC-4**), masticadienonic acid ($IC_{50}=0,13$ mg/ml, **PVSC-1** and **PVSC-2**) and hexane extract ($IC_{50}=0,09$ mg/mL) with the lowest IC_{50} values were found to be most active substances. Nevertheless, the inhibitory effect of acarbose ($IC_{50}=0,07$ mg/mL) against the α -amylase enzyme was determined to be higher than the inhibition effects of the extracts and pure metabolites. According to the IC_{50} values, the best inhibitors against the α -amylase enzyme were ethanol extract ($IC_{50}=5,17$ mg/mL), pistachionic acid ($IC_{50}=7,35$ mg/mL, **PVSE-1**), tirucallol ($IC_{50}=7,58$ mg/mL, **PVSC-3**) and masticadienolic acid ($IC_{50}=8,22$ mg/mL, **PVSC-4**), respectively among the applications. In addition, anticholinesterase properties of the extracts and pure metabolites were investigated by testing the inhibitory properties against acetylcholine esterase (AChE) and butrylcholine esterase (BChE) enzyme activities. The results showed that the anticholinesterase properties of all extracts and pure metabolites were weaker than those of the commercial cholinesterase inhibitors, neostigmine and galantamine, and all applications reduced the activity of these enzymes at very high concentrations. The most active application against AChE enzyme was tirucallol (**PVSC-3**) with $IC_{50}=42,55$ mg/mL, whereas the most active application against BChE enzyme was masticadienonic acid (**PVSC-1** and **PVSC-2**) with $IC_{50}=3.72$ mg/mL. These results show that the extracts and pure metabolites from *P. vera* fruit stems can be used as antidiabetic reagents.

Key Words: *Pistacia vera*, fruit stems, antidiabetic, anticholinesterase, pistachionic acid, tirucallanes, masticadienonic acid, masticadienolic acid.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunun belirlenmesi, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren tez çalışmalarım süresince maddi manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR' a,

Bu çalışma TÜBİTAK 3001 programı tarafından 217Z216 proje numarası ile finansal olarak desteklenmiş olup bu desteklerinden dolayı TÜBİTAK' a,

Yüksek Lisans eğitimimin ilk gününden son gününe kadar teorik ve deneysel çalışmalarına her türlü bilgi birikim ve önerileriyle katkı sağlayan hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet AKYÜZ' e,

Saflaştırılan metabolitlerin NMR spektrumlarının alınması konusunda katkı sağlayan Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba AYDIN' a ve Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Cavit KAZAZ 'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her aşamasında bilgisiyle yol gösterip tezimin tamamlanmasında büyük katkısı olan değerli hocalarım, Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Evrim BARAN (Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü) ve Sayın Öğr. Gör. Tuba KILIÇ 'a (Kilis 7 Aralık Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü).

Ayrıca eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme en içten şükranlarımı sunarım.

Lawali YABO DAMBAGI

Mayıs 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması.....	2
1.2. <i>Pistacia</i> Cinsi	3
1.2.1. <i>P. vera</i> L	4
1.3. Enzimler	6
1.3.1. Alzheimer ve Kolinesteraz Enzimleri.....	9
1.3.2. α -Glikozidaz, α -amilaz Enzimleri ve Diyabet	12
1.4. Önceki Çalışmalar.....	15
1.4.1. Uçucu Yağ Çalışmaları.....	15
1.4.2. Kimyasal Bileşim ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	17
1.5. Çalışmanın Amacı	21
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	23
2.1.3. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar	24
2.2. Yöntem	24
2.2.1. Bitki Örneği ve Ekstraksiyon İşlemleri	24
2.2.2 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	25
2.2.3. Antep fıstığı (<i>P. vera</i> L.) Sapı Kloroform Ekstresi Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar.....	26
2.2.4. Antep fıstığı (<i>P. vera</i> L.) Sapı Etanol Ekstresi Üzerine Yapılan Kromatografik Çalışmalar.....	28

2.2.5. Enzim İnhibisyon Aktivite Çalışmaları.....	30
2.2.5.1. α -Glükozidaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları.....	30
2.2.5.2. α -Amilaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları.....	31
2.2.5.3. Asetilkolin esteraz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları.....	33
2.2.5.4. Butirilkolin esteraz Enzimi İnhibisyon çalışmalar	35
2.2.6. İstatiksel Analizler	37
3. BULGULAR	39
3.1. GC-MS Bulguları	39
3.2. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektroskopik Bulgular.....	43
3.2.1 Mastikadienonik asit (3-Oksolanosta-7,24Z-dien-26-oik asit, PVSC-1 ve PVSC-2)	44
3.2.2. Tirukallol (Eupha-8,24-dien-3-ol, PVSC-3).....	53
3.2.3. Mastikadienolik Asit (3-Hidroksilanosta-7,24Z-dien-26-oik asit, PVSC-4). 62	
3.2.4. PVSE-1 (Pistasionik asit).....	69
3.2.5. PVSE-2 (Inulobioz, α -D-fruktofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fruktofuranozit)	77
3.3. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları.....	84
3.3.1. Ekstre ve Saf Metabolitlerin α -Glukozidaz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları.....	84
3.3.2. Ekstre ve Saf Metabolitlerin α -Amilaz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları.....	95
3.3.3. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Asetilkolin Esteraz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları.....	106
3.3.4. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Butirilkolin Esteraz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları.....	115
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	126
5. KAYNAKLAR	143

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1. SİMGELER

^{13}C	: Karbon-13 izotopu
^1H	: Hidrojen-1 izotopu
C	: Karbon
O	: Oksijen
Na	: Sodyum
Sn	: Kalay
K	: Potasyum
S	: Kükürt
ppm	: Milyonda bir kısım
nm	: Nanometre
m/z	: Kütle/yük
MHz	: Mega Hertz
M^+	: Moleküler İyon
%	: Yüzde
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
sn	: Saniye
g	: Gram
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
IC_{50}	: % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
IC_{90}	: % 90 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
MHz	: Megahertz
J	: Jiromanyetik (etkileşme) sabiti
δ	: Kimyasal kayma (ppm)

α : Alfa
 β : Beta

2. KISALTMALAR

A.B.D. : Amerika Birleşik Devletleri
AChE : Asetilkolinesteraz
BChE : Butirilkolinesteraz
CHCl₃ : Kloroform
COSY : Two dimensional ¹H- correlation spectroscopy
DEPT : Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO : Dimetil sulfoksit
DNS : Dinitro salisilik asit
dt : Dubletin tripleti
DTNB : 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit
EDTA : Ethilendiamin tetraasetik asit
FT-IR : Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi
GC-MS : Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi
HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HMQC : Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
İng. : İngilizce
IU : Uluslar arası enzim ünitesi
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
İTK : İnce Tabaka Kromatografisi
KK : Kolon Kromatografisi
m : Multiplet
M.Ö. : Milattan önce
M.S. : Milattan sonra
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans
PNPG : *p*-Nitrofenil- α -D-glukopiranozid
PVSC : *P. vera* sap kloroform ekstresi
PVSE : *P. vera* sap etanol ekstresi

PVSH	: <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresi
<i>s</i>	: Siglet
<i>t</i>	: Triplet
U	: Enzim Ünitesi
UV	: Ultraviole (mor ötesi)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. Türkiyede yayılış gösteren <i>Pistacia</i> türleri	4
Resim 1.2. Antep fıstığı meyveleri (ham, ağaç dalında ve kurutulmuş).....	5
Resim 1.3. Antep fıstığı meyvelerinin çalışılan sap kısmının resmi	22
Resim 3.1. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün DNS testi sonuçları.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Alzheimer tedavisinde kullanılan kolinesteraz enzim inhibitörleri	12
Şekil 1.2. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan α -glukozidaz enzim inhibitörleri	15
Şekil 1.3. Kabuk sekonder metabolitlerinin kimyasal yapısı	18
Şekil 3.1. Sap hekzan ekstresinin GC-MS kromatogramı.....	41
Şekil 3.2. Sap kısmın headspace GC-MS kromatogramı	42
Şekil 3.3. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) IR spektrumu (ATR)	44
Şekil 3.4. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) ^1H -NMR spektrumu (DMSO- d_6).....	46
Şekil 3.5. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)	47
Şekil 3.6. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO- d_6).....	48
Şekil 3.7. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO- d_6). 49	
Şekil 3.8. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMQC spektrumu (DMSO- d_6)	50
Şekil 3.9. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMBC spektrumu (DMSO- d_6)	51
Şekil 3.9. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMBC spektrumu (DMSO- d_6) devamı	52
Şekil 3.10. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün FTIR spektrumu (ATR).....	54
Şekil 3.11. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün ^1H -NMR spektrumu (DMSO- d_6)	55
Şekil 3.12. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)	56
Şekil 3.13. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO- d_6)	57
Şekil 3.14. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO- d_6).....	58
Şekil 3.15. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMQC spektrumu (DMSO- d_6)	59
Şekil 3.16. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO- d_6)	60
Şekil 3.16. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO- d_6) devamı....	61

Şekil 3.17. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in FTIR spektrumu (ATR).....	63
Şekil 3.18. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ¹ H-NMR spektrumu (DMSO-d ₆).....	63
Şekil 3.19. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO-d ₆).....	64
Şekil 3.20. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in sırasıyla DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO-d ₆).....	65
Şekil 3.21. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ¹ H, ¹ H-COSY spektrumu (DMSO-d ₆).....	66
Şekil 3.22. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in HMQC spektrumu (DMSO-d ₆)	67
Şekil 3.23. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in HMBC spektrumu (DMSO-d ₆)	68
Şekil 3.24. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün FTIR spektrumu (ATR).....	70
Şekil 3.25. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün ¹ H-NMR spektrumu (DMSO-d ₆).....	71
Şekil 3.26. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün ¹³ C-NMR spektrumu (DMSO-d ₆).....	71
Şekil 3.27. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün DEPT-135 ve DEPT 90 spektrumları (DMSO-d ₆).....	72
Şekil 3.28. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün ¹ H, ¹ H-COSY spektrumu (DMSO-d ₆).....	74
Şekil 3.29. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün HMQC spektrumu (DMSO-d ₆)	75
Şekil 3.30. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO-d ₆).....	76
Şekil 3.31. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün FTIR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış).....	78
Şekil 3.32. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	78
Şekil 3.33. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	79
Şekil 3.34. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün DEPT spektrumları (CDCl ₃)	80
Şekil 3.35. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün ¹ H, ¹ H-COSY spektrumu (CDCl ₃).....	81
Şekil 3.36. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün HMQC spektrumu (CDCl ₃).....	82
Şekil 3.37. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün HMBC spektrumu (CDCl ₃).....	83
Şekil 3.38. Akarbozun farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi.....	85
Şekil 3.39. <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	86
Şekil 3.40. <i>P. vera</i> sap kloroform ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	87
Şekil 3.41. Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	88

Şekil 3.42. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	89
Şekil 3.43. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	90
Şekil 3.44. Etanol ekstresinin α -glukozidaz enzimi üzerine etkisi	91
Şekil 3.45. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün α -glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi	92
Şekil 3.46. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi	93
Şekil 3.47. Akarbozun farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi.....	95
Şekil 3.48. Sap hekzan ekstresinin α -amilaz enzimi üzerine etkisi	97
Şekil 3.49. Sap CHCl ₃ ekstresinin α -amilaz enzimi üzerine etkisi	98
Şekil 3.50. Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi	99
Şekil 3.51. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzim enzimi üzerine etkisi	100
Şekil 3.52. Mastikadienolik asit (PVSC-4) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi	101
Şekil 3.53. Etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi..	102
Şekil 3.54. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzere etkisi.....	103
Şekil 3.55. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi	104
Şekil 3.56. Neostigmin molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi	106
Şekil 3.57. Galantamin molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi	107
Şekil 3.58. <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresinin AChE enzim üzerine etkisi.....	108
Şekil 3.59. <i>P. vera</i> sap kloroform ekstresinin AChE enzim üzerine etkisi.....	109
Şekil 3.60. Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün AChE enzim üzerine etkisi	110
Şekil 3.61. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün AChE enzim üzerine etkisi.....	111
Şekil 3.62. Mastikadienolik asit (PVSC-4) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi	112
Şekil 3.63. Neostigmin molekülünün BChE enzim üzerine etkisi.....	115
Şekil 3.64. Galantamin molekülünün BChE enzim üzerine etkisi.....	116
Şekil 3.65. <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresinin BChE enzim üzerine etkisi.....	117

Şekil 3.66. <i>P. vera</i> sap kloroform ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi	118
Şekil 3.67. Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi	119
Şekil 3.68. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün BChE enzim üzerine etkisi.....	120
Şekil 3.69. Mastikadienolik asit (PVSC-4) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi	121
Şekil 3.70. <i>P. vera</i> sap etanol ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	122
Şekil 3.71. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi.....	123
Şekil 3.72. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi.....	124
Şekil 4.1. Sap kloroform ekstresinden saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapısı	130
Şekil 4.2. <i>Pistacia</i> türlerinden izole edilen diğer triterpenlerin kimyasal yapısı	131
Şekil 4.3. Hekzan ve kloroform ekstralarının İTK sonuçları	132
Şekil 4.4. Sap etanol ekstresinden saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapısı.....	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. α -Glukozidaz enzim aktivitesi çalışma şeması	31
Çizelge 2.2. α -Amilaz enzim aktivitesi çalışma şeması.....	32
Çizelge 2.3. Asetil kolin Esteraz enzim aktivitesi çalışma şeması	35
Çizelge 2.4. Butiril kolin Esteraz Enzim aktivitesi çalışma şeması.....	37
Çizelge 3.1. Sap Hekzan Ekstresi ve Sap Uçucu Bileşenleri.....	39
Çizelge 3.2. Saf metabolitlerin farklı çözücü sistemlerindeki Rf değerleri	43
Çizelge 3.3. Akarbozun α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	84
Çizelge 3.4. <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresinin α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	85
Çizelge 3.5. <i>P. vera</i> sap CHCl_3 ekstresinin α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri .	86
Çizelge 3.6. Masticadienoic asit (PVSC-1 ve PVSC-2)'in α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	87
Çizelge 3.7. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün α -glukozidaz enzim üzerine etkileri	88
Çizelge 3.8. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	89
Çizelge 3.9. <i>P. vera</i> sap etanol ekstresinin α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri ..	90
Çizelge 3.10. PVSE-1 molekülünün α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	91
Çizelge 3.11. PVSE-2 molekülünün α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	92
Çizelge 3.12. α -Glukozidaz enzimine karşı etkili uygulamaların IC_{50} ve IC_{90} değerleri	93
Çizelge 3.13. Akarbozun α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	95
Çizelge 3.14. <i>P. vera</i> sap hekzan ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri ...	96
Çizelge 3.15. <i>P. vera</i> sap CHCl_3 ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	97
Çizelge 3.16. Masticadienoic asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	98
Çizelge 3.17. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkileri	99
Çizelge 3.18. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	100
Çizelge 3.19. <i>P. vera</i> sap etanol ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri....	101
Çizelge 3.20. Pistasionik asit (PVSE-1) molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	102
Çizelge 3.21. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkileri.....	103
Çizelge 3.22. α -Amilaz enzimine karşı aktif uygulamaların IC_{50} ve IC_{90} değerleri	104

Çizelge 3.23. Neostigmin molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	106
Çizelge 3.24. Galantamin molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	107
Çizelge 3.25. Sap hekzan ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	108
Çizelge 3.26. Sap kloroform ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	109
Çizelge 3.27. Masticadienoic asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	110
Çizelge 3.28. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi..	101
Çizelge 3.29. Mastikadienolik asit (PVSC-4) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	112
Çizelge 3.30. Sap etanol ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	113
Çizelge 3.31. Pistasionik asit (PVSE-1)'in AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	113
Çizelge 3.32. İnulobioz (PVSE-2) disakkaritin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	113
Çizelge 3.33. AChE enzimine karşı aktif uygulamaların IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	114
Çizelge 3.34. Neostigmin molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	115
Çizelge 3.35. Galantamin molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	116
Çizelge 3.36. Sap hekzan ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	117
Çizelge 3.37. Sap kloroform ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	118
Çizelge 3.38. Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	119
Çizelge 3.39. PVSC-3 molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	120
Çizelge 3.40. Mastikadienolik asit (PVSC-4) molekülünün BChE enzim aktivitesi.....	121
Çizelge 3.41. <i>P. vera</i> sap etanol ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	122
Çizelge 3.42. Pistachinoic asit (PVSE-1) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi.....	123
Çizelge 3.43. İnulobioz (PVSE-2) disakkarit molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi.	124
Çizelge 3.44. BChE enzimine karşı aktif uygulamaların IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri.....	125

1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler baharat olarak da kullanılan ve sentezledikleri değişik kimyasal yapıya sahip primer ve sekonder metabolitler bakımından hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler olarak tanımlanırlar. Tıbbi ve aromatik bitkilerin baharat olarak kullanımının yanı sıra değişik hastalıkların tedavisinde de kullanılmasının insanlık tarihinin başlaması ile başladığı tahmin edilmektedir. Yazılı kaynaklara göre M.Ö. 3000 yıllarında hüküm süren Sümer, Mısır, Çin, Akad ve Asur Medeniyetlerinde bitkilerin tedavide kullanımı üzerine kayıtlara rastlanmıştır (Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002). Örneğin, M.Ö. 1550 yıllarında hüküm süren Mısır Uygarlığına ait yazılı kaynaklar olan Cber Papiluslarında bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı üzerine bilgilere rastlanmıştır. M.Ö. 1200 yıllarında Anadolu'da yaşadığı düşünülen Lokman Hekim'in de yaptığı tedavilerde sıklıkla bitkileri kullandığı düşünülmektedir (Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002). Günümüze daha yakın tarihlerde yaşamış ve efsaneleşmiş olan İbn-i Sina, İbn-i Baytar, İbn-i Şerif gibi hekimler de bitkileri kullanarak tedavi yöntemleri geliştirmiş ve bu konuda eserler bırakmış önemli İslam hekimleridir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından olmasına karşın tedavide genellikle dekoksiyon, pomat, merhem, müshil vb. şekillerde kullanılmışlardır (Baytop, 1999). Diğer taraftan, bitkilerden elde edilen ilk etken madde 1805 yılında afyon bitkisinden izole edilen morfindir. Bunu, 1820 yıllarında kınakınanın (*Cinchona officinalis*) kabuklarından kinin, 1868' de yüksük otu (*Digitalis türleri*) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalinin ve 1890' da söğüt dalı kabuğundan asetil salisilik asitin izolasyonu takip etmiştir. Sentetik kimyadaki gelişmelere paralel olarak daha sonraki dönemlerde doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenmiş ve ilaç etken maddeleri olarak tedavi amaçlı, insanların hizmetine sunulmuştur. Yeni doğal ilaç hammaddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan bilimsel araştırmalar günümüzde her geçen gün artarak sürmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1979 yılında yapılan bir araştırmada, farmakoplarda kayıtlı olan ülkelerde kullanılan ve ticarete bulunabilen bitkisel drogların miktarı 2.000 olarak bildirilmiştir. Aynı kuruluşun 91 ülkenin farmakopları ve tıbbi bitkileri üzerine yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla

kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarında olduğu saptanmıştır. Ancak şüphesiz ki; bu miktar gerçek miktardan çok düşüktür. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerinde yapılan çalışmalar ve bunlara karşı olan ilgi çok artmıştır (Romani ve ark., 2002; Topcu ve ark., 2007; Kavak ve ark., 2010; Rajendiran ve ark., 2008; Karuncula, 2013; Gökdemir, 2016; Kısa ve ark., 2018). Bunun sebebi; bazı ilaç etken maddelerinin bitkisel droglardan sentetik olanlardan daha ucuza ve daha kolaylıkla elde edilmeleridir. Steroid bileşikler, kına alkaloidleri, afyon alkaloidleri, çavdar mahfuzu alkaloidleri, *Atropa belladonna* (Güzelyavrat otu) alkaloidleri, *Digitalis purpurea* glikozitleri bunlara en somut örneklerdir. Türkiye’de 8500 civarında bitki türü yetişmekte ve bunlardan 650 kadarı ise halk hekimliğinde kullanılmaktadır.

1.1. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması

İlahi dinlerde insanların yanı sıra doğadaki tüm canlılar bir dengenin ürünüdürler. Doğanın en önemli ve yaygın üyeleri olan bitkiler, insanlığın ve ekosistemlerin hizmetindedir. İnsanlığın varoluşundan itibaren bitkilerle olan ilişkisi de başlamıştır (Gezgin, 2007). İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgulara göre insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle çevrelerinde yetişen bitkilerden istifade etmişlerdir (Koçyiğit, 2005). Bitkilerin tedavide kullanımı “Fitoterapi” olarak bilinmektedir. Fitoterapi modern tıp ve ilaç endüstrisinin gelişimine önemli katkılar yapmış olmasına karşın sentetik kimyadaki gelişim ile yerini daha çok sentetik ilaçlara bırakmıştır.

Şifa bulmak amacıyla tıbbi bitkilerin çiçek, toprak üstü kısımları, sap, meyve, tohum, cumba, kök ve yaprak gibi çok farklı kısımlarından istifade edilmesine karşın bazen de bitkiler değişik oranlarda karıştırılarak kullanılmışlardır. Tıbbi bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı çok geniş hastalık türlerini kapsamalarına karşın, genellikle yara iyileştirici, kronik yorgunluk giderici, kabızlık giderici, kan temizleyici, sakinleştirici, diüretik, iştah açıcı, kanamayı durdurucu (koagülent), ateş düşürücü ve ağrı kesici (analjezik), nefes açıcı, parazit düşürücü (antihelmintik), böcek kovucu ve öldürücü (insektisidal) yanmaya karşı, antiprotozoal, antiromatizmal olarak tercih edilmelerinin yanı sıra sıtma, astım, dizanteri, afrodisyak, tifo ve şeker gibi hastalıkların iyileştirilmesinde de kullanılmıştır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu 1992; Baytop, 1999)

Çevresel etkenlerden ve ailesel faktörlerden dolayı gün gittikçe değişik hastalıkların ortaya çıkması ve bunların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların büyük kısmında istenmeyen yan etkilerin olması nedeniyle, bilim insanları alternatif olarak tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitler üzerine çalışmalar yapmaya yönelmiştir. Hayatımızın birçok alanında kolaylık sağlayan teknolojinin gelişmesiyle artan radyasyon, sanayi ve endüstrinin gelişmesi sonucu hayatımızın her alanında yer alan kimyasal ajanlar, çevresel faktörler birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu faktörlerden sadece insanlar değil çevre kirliliğinden dolayı doğal ortamında yaşayan tüm canlılar da kismetlerini almaktadırlar. Özellikle yerleşim birimlerine yakın bölgelerde yaşayan tüm canlılar bundan daha fazla etkilenmektedirler. Yeni doğal ilaç etken maddelerinin bulunması ve tedavide kullanılması, sentetik ilaçların çevreye verdiği zararlı etkileri azaltmada ekonomik ve etkin bir yol olarak düşünülebilir. Doğal ilaçlar doğada kısa sürede bozdukları için de çevre açısından daha az risk oluşturmaktadırlar. Sentetik ilaçların çevre ve canlı sağlığı için istenmeyen yan etkilerinden dolayı fitoterapi son zamanlarda yeniden yoğun ilgi görmeye başlamış ve fitoterapi üzerine bilimsel çalışmalar her geçen gün artmıştır (Topcu ve ark., 2007; Kavak ve ark., 2010; Orhan ve ark., 2012; Durak ve Ucak, 2015; Foddai ve ark., 2015; Hacıbekiroglu ve ark., 2015; Turkoglu ve ark., 2017).

1.2. *Pistacia* Cinsi

Pistacia cinsi Anacardiaceae familyasına ait tohumlu bitkilerdir. Dünya florasında 10-20 türün yetiştiği tahmin edilmekte olup Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarında yayılış göstermektedirler. Ülkemizde en çok yayılış gösteren türleri *P. vera*, *P. terebinthus*, *P. lentiscus* ve *P. khinjuk* türleridir. *P. lentiscus* “sakız ağacı” (ing. mastic tree), *P. terebinthus* ve *P. khinjuk* benzer meyve türlerinden dolayı ise “menengiç”, “melengiç”, “çitlembik”, “bittim”, “buttum” yerel adlarıyla bilinen en önemli türlerdir. *P. vera* meyvelerinin gıda endüstrisindeki yaygın kullanımından dolayı ticari öneme sahip bir tür olup Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygın olarak kültürü yapılmaktadır (Şekil 1.1).



P. vera L.



P. terebinthus L.



P. lentiscus L.

Resim 1.1. Türkiyede yayılış gösteren *Pistacia* türleri

1.2.1. *P. vera* L.

P. vera Anacardiaceae familyasının (sakız ağacıgiller) bir üyesi olup yenebilir meyvelere sahip bir ağaçtır (Resim 1.2). “Yeşil altın”, “Meyvelerin kralı”, “Altın ağaç” ve “Kral meyvesi” olarak da adlandırılan sert kabuklu bir meyve olan Antep fıstığının (*P. vera*) ilk olarak Etiler tarafından Güney Anadolu’da kültüre alındığı bilinmektedir (Maskan ve Karatas, 1999). Antep fıstığı, dünyada kuzey ve güney yarı kürelerinin 30-45° paralellerinin uygun mikro klimalarında yetişmektedir. Ülkemiz, kuzey yarı küresinde ve Antep fıstığının gen merkezi üzerindedir. Özellikle, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin antepfıstığı yetiştiriciliğinde önemli bir yeri vardır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Antep fıstığının gen merkezlerinden biri ve ilk kez kültüre alınan yer olması yanında, sahip olduğu kendine özgü ekolojik özellikleri nedeniyle, bu meyve türünün başarılı bir şekilde yetişmesine ve yayılmasına olanak sağlamıştır (Tekin ve ark., 2001). Bu ağacın meyveleri “Şam fıstığı” isimle de bilinir ve meyveler tatlıcılıkta yaygın bir kullanıma sahiptir. Eczacılıkta ayrıca öksürük şurubu yapımında da kullanılmaktadır. *P. vera* sıcak iklime çok iyi adapte olmuş olup dünyada Antep fıstığı yetiştiriciliğinin en yaygın yapıldığı ülkeler sırasıyla İran, ABD ve Türkiye’dir. Türkiye’de en çok yetiştirildiği iller ise Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis, Siirt, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Diyarbakır’dır.



Resim 1.2. Antep fıstığı meyveleri (ham, ağaç dalında ve kurutulmuş)

Antep fıstığı; ceviz, fındık, badem ve çam fıstığı gibi sert kabuklu meyvelerle karşılaştırıldığında daha düşük bir yağ ve enerji içeriğine sahip olup daha yüksek lif (hem çözünür hem de çözünmez) içeriğine, K vitaminine, fitosterollere, gamma-tokoferole ve ksantofil karotenoidlerine sahiptir (Tayar ve ark., 2011). Antepfıstığı; badem, ceviz, fındık gibi yağlı tohumlarla karşılaştırıldığında ise karbonhidrat, protein, B1, B6, E ve A vitaminleri, demir, potasyum, beta-karoten, toplam fitosterol ve lutein değerleri açısından birinci sırada yer almaktadır (Küçüköner ve Yurt, 2003). Antepfıstığı çocukların mineral ihtiyacını karşılaması bakımından bir ara öğün gıdası olarak kabul edilmektedir. Çocukların günde 15 g antepfıstığı tüketimiyle günlük potasyum gereksinimlerinin % 9'unu, fosfor gereksinimlerinin % 15'ini ve kalsiyum gereksinimlerinin % 3'ünü karşılayabildikleri belirtilmiştir (Tokuşoğlu, 2007). Antepfıstığı vücut için önemli rol oynayan K, Mg, Ca, Cu, Mn gibi mineraller açısından oldukça zengindir. Pala ve ark. (1994) yaptıkları çalışmalar sonucunda antepfıstığının mineral bakımından zengin bir besin içeriğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. İncelenen Antep fıstıklarında ortalama Ca 122.2 mg/100 g, Zn 2.49 mg/100 g, Na 0.38 mg/100 g, Fe 4.02 mg/100 g, K 683.92 mg/100 g, Mn 1.28 mg/100 g, Cu 1.09 mg/100 g, Mg 113.8 mg/100 g olarak belirlenmiştir (Pala ve ark., 1994). Sert kabuklu yemişlerin yağ ekstraktlarındaki tokoferol içeriğini inceledikleri çalışmada; en yüksek E vitamini içeriğini fındık yağında (33.1 mg/100 g) bulmuşlar ve bunu sırasıyla badem, yer fıstığı, antepfıstığı, çam fıstığı, ceviz, Brezilya cevizi, pıkan, kaju ve Avustralya fındığının takip ettiğini belirlemişlerdir (Kornsteiner ve ark., 2006).

Potansiyel bir protein kaynağı olan Antep fıstığının protein içeriği % 19-23.5 arasında olup fındık, ceviz ve pıkan'ın protein miktarından daha yüksek, kurubaklagillerin

protein miktarına ise oldukça yakındır (Küçüköner ve Yurt, 2003). Antepfıstığı, badem, ceviz, kabak çekirdeği ve yer fıstığı gibi yağlı tohumların 100 g'ındaki protein içeriği kurubaklagil ve etin protein içeriğine yakın; tahıllardan ise yüksektir. Fakat protein kalitesi ise et ve yumurtadan düşüktür (Tayar ve ark., 2011). Protein açısından zengin olan sığır eti ile antepfıstığı karşılaştırıldığında, protein kalitesi bakımından insan vücudunda sığır etinin sindirilebilirliğinin % 91-100 arasında olduğu, Antep fıstığının ise % 69-90 arasında sindirilebilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Baysal, 2012). Ortalama 28 g kavrulmuş antepfıstığı tüketimi ile günlük önerilen protein miktarının %13'ü karşılanmaktadır. Yüksek kaliteli bitkisel protein kaynağı olan antepfıstığı vejetaryen diyeti bakımından önemli nutrasötik bir gıdadır (Tokuşoğlu, Ö., 2007). Antep fıstığındaki globülin fraksiyonu, toplam proteinin yaklaşık üçte ikisini (% 66) oluşturan temel proteindir. Toplam proteinin yaklaşık % 25'ini albüminler, % 7.3'ünü glüteninler ve % 2'sini prolaminler oluşturur (Shokraii ve Esen, 1988).

Antep fıstığı türlerinin ortalama protein içeriği % 19.54 olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak incelenen antepfıstığı türlerinin aminoasit bileşenleri içerisinde ortalama olarak sırasıyla en yüksek 5270 mg/100 g glutamik asit, 1677 mg/100 g arjinin, 1522 mg/100 g aspartik asit, 1288 mg/100 g lösin, 1051 mg/100 g fenilalanin, 1020 mg/100 g serin ve 1011 mg/100 g valin saptanmıştır. Ayrıca lizin, histidin, treonin, prolin, glisin, alanin, sistin, metionin, isolösin ve tirosin aminoasitleri de belirlenmiştir (Pala, ve ark., 1994).

1.3. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Bütün enzimler protein yapısındadırlar ve proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Bir hücredeki tüm kimyasal tepkimeler enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu nedenle Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Enzimlerin katalitik özellikleri ilgili ilk önemli bilimsel çalışmalar 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılan çalışmalara rastlamaktadır. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş birçok enzimin varlığını göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Enzim aktivitesinin ölçülmesi hastalık tanımında oldukça önemli bir süreçtir. Kan plazmasında normalde çeşitli enzimler bulunur. Plazma enzimleri plazmaya özel ve plazmaya özel olmayan enzimler olarak ayrılmaktadır. Plazmaya özel enzimler normalde kanda bulunur ve kanda oluşan tepkimeleri katalizler. Plazmaya özel olmayan enzimler ise hücrelerden doğrudan kana salgılanan veya parçalanmış hücrelerden kana sızan enzimlerdir. Genellikle bu enzimlerin kandaki konsantrasyonları dokudaki konsantrasyonlarından çok düşüktür. Ancak hastalık hallerinde düzeyleri belirgin bir artış gösterir. Bir hastalık hücre zarının geçirgenliğini etkileyebilir veya zarı tamamen tahrip edebilir. Sonuçta hücre içindeki enzimler etrafa saçılır. Pek çok enzimin kandaki düzeyi bulunduğu dokuya özel bir hasarı gösterecek şekilde yükselir. Enzim aktivitesi substratın tüketim hızı veya daha uygun olarak ürünün oluşum hızı ölçülerek saptanır. Enzim aktivitesi doğrusal bölgede (birim zamandaki hız artışının sabit olduğu bölge) ölçülür. Enzim aktivitesi sabit sıcaklık ve pH' da belli bir zaman aralığındaki belli bir miktarda bir substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. IEC enzim için standart bir ünite ifade etmiştir. I.U=25 °C'de bir dakikada 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır ($\mu\text{mol}=10^{-6}$ mol). Spesifik aktivite her bir mg enzim proteininde mevcut olan enzimin I.U olarak sayısıdır. Bu ölçüm enzim preparatının saflığını gösterir. Böylece saf olmayan bir enzim preparatı 0,1 mg enzim ve 0,9 mg diğer proteinleri içerir (Sunguroğlu, 2014). Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun tanısı konulabilmekte ve hastalığın geleceği ile ilgili bilgiler elde edilebilmektedir (Onat ve Emerk, 1996). Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de "inhibitör" denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, oldukça önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için oldukça önemli araçlardır (Keha and Küfrevioğlu, 2010). Normal canlı hücrelerinde belli başlı enzimlerin aktivitesini azaltmak veya inhibe etmek üzere hücre tarafından bazı inhibitör ve/veya inhibitörler sentezlenir ve bu yolla hücrede enzim aktivitesi düzenlenir. Ancak,

ilaçlar veya toksik maddeler gibi inhibitörlerin birçoğu değişik yollarla organizmaya dışarıdan alınan kimyasal maddelerdir (Sunguroğlu, 2014).

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetilkolin esteraz enzimlerinin sinir gazı tarafından inhibisyonu dönüşümsüz inhibisyona örnek olarak verilebilir. Bu gazlardan diizopropilfluorofosfat (DIFP), enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidi ile reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzim oluşturur. İyodasetamid gibi alkilleyici bileşikler de, bazı enzimleri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Etkilerini sistein ve diğer yan zincirleri modifiye ederek gösterirler. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) olanıdır. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü hem enzim-substrat, hem de enzim-inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır. Yarışmalı inhibitör kataliz hızını, ES kompleksi oranını düşürerek azaltır. Bir başka ifade ile enzimin K_M değeri artar. Bu tip inhibisyona, malonatın süksinat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisi klasik bir örnek olarak verilmektedir. Bu enzim, süksinattan iki hidrojen atomunun çıkarılmasını katalizler.

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon'da inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu, bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere yapışabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI. ESI'dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir, fakat katalizlemede yavaşlama olur. Yarışmasız inhibisyona örnek olarak, enzimlerin aktivitesinde gerekli olan sisteinlerin -SH gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanmalarını verebiliriz. -SH grubu

aktif bölgede bulunabildiği gibi, enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan, bir bölgesinde de yer alabilir. Katalizlemede metal iyonlarına ihtiyacı olan enzimlerin aktiviteleri, bazı bileşiklerin metal iyonlarına dönüşümlü bağlanması sonucu yarışmasız olarak inhibe edilebilirler. Mesela siyanür, Fe^{+2} ve Fe^{+3} ihtiva eden enzimleri, etilendiamintetraasetat (EDTA) da Mg^{+2} 'li enzimleri bu iyonlara bağlanarak inhibe ederler(Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi unkompetitif inhibisyon (yarı yarışmalı da denilir)'dur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Unkompetitif inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesiyle inhibisyon artabilir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ES kompleksi sürekli var olacağından V_{max} da düşer. Unkompetitif inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda ender görülür; buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır. İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

1.3.1. Alzheimer ve Kolinesteraz Enzimleri

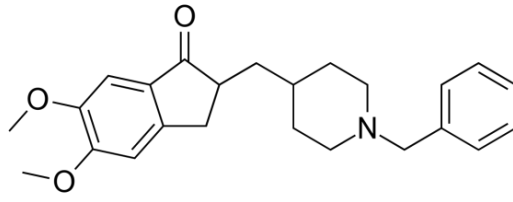
Alzheimer ileri yaştaki insanlarda karşılaşılan bir beyin hastalığıdır. Bugün dünyada 20 milyona yakın insanın Alzheimer hastalığına yakalandığı tahmin edilmektedir. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığının görülme sıklığı, yaş ile orantılı olarak artmaktadır. 65-70 yaşlar arası % 1.5 iken, 85 yaş sonrasında % 6'ya kadar artmaktadır (Beard ve ark. 1995; Prince, 1997; Shoog ve ark., 2014). Devlet İstatistik Enstitüsü'nün (DİE) rakamlarına göre; Türkiye'de yaklaşık 250.000 Alzheimer vakası bulunmaktadır. Demans vakalarının % 80'ini teşkil eden Alzheimer hastalığı (AH), ilerleyici ve hastanın günlük yaşam aktivitelerini engelleyen apati, ajitasyon, psikoz, anksiyete ve depresif semptomlarla karakterize olmaktadır. Alzheimer hastalığında beynin bazı bölgelerindeki hücrelerin yavaş yavaş kaybolması sonucu hafıza, konuşma, insanları tanıma gibi pratikler zayıflar ve kişilerde davranış bozuklukları görülür (Aynacı ve ark., 2014). Alzheimer hastası bir kişide değişim önce beynin hafıza merkezi olan hipokampus (hippocampus)' da başlar sonrasında ise duygu ve düşüncede etkili bölümler ile korteks (beyin zarı) etkilenir. Alzheimer hastalığında beyin kütlesi küçülür, lisan becerisi ve muhakeme yeteneği azalır (Karuncula, 2013). Alzheimer hastalığının

diğer bir sebebinin de, beyindeki kolinerjik kayıp olduğu gösterilmiştir. Kolinerjik kavşak ve sinapslardan salınan asetilkolin miktarının Alzheimer hastalarında azaldığının saptanması ile, 1970'lerde asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir yaklaşım ortaya çıkmıştır (Francis ve ark. 1999; Quinn, 1987). 1940'larda, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz olmak üzere iki tip kolinesteraz enzimi olduğu keşfedilmiştir. Bunlardan asetilkolinesteraz enzimi, vücutta merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda; bütirilkolinesteraz ise karaciğer ve plazma dahil bir çok doku ile merkezi ve periferik sinir sisteminde daha yaygın olarak bulunmaktadır (Quinn, 1987). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, bütirilkolin esteraz miktarının, asetil kolin esteraz gibi Alzheimer hastalarının beyinlerinde normal beyinlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Massouile ve ark., 1993). Dolayısıyla, bütirilkolin esteraz inhibisyonunun da asetilkolin esteraz inhibe eden ilaçlarla doğrudan ilgili olabileceği düşünülmektedir.

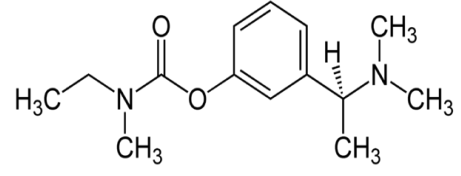
Kolinesteraz enzimleri daha öncede bahsedildiği gibi asetil olin, bütirilkolin ve asetiltiyokolinyodid gibi çeşitli kolin türlerinin ayrıştırılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Asetil kolinesteraz en bilinen kolinesteraz enzimlerinden birisidir (Aisen ve Davis, 1997; Çingiloğlu, 2007). Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında ve dokularında geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgülüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki sınıfa ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolin esteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve bütirilkolin esteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 asetilkolin açilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolin esteraz olarak bilinir. Asetilkolin esteraz beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, bütirilkolin esteraz ise serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur. Asetilkolin esteraz enziminin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır. Ancak asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden bütirilkolin esteraz enziminin gerçek fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir (Alpaslan, 2013). Asetilkolin sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücresine, sinir implusu taşıma görevinin yanı sıra, sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasını da sağlayan biyolojik önemli bir esterdir. Dış çevre ile lifin iç kısmı arasında konsantrasyon farklarının

oluşması sonucunda sodyum iyonunun geçişi ve elektrik akımının meydana gelmesi asetilkolin esteri sayesinde olmaktadır (Güven, 2000).

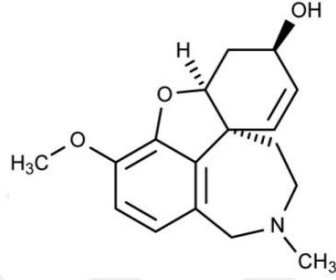
Genetik faktörler, anormal proteinler (amiloid plaklar) veya otoimmün reaksiyonlar gibi pek çok farklı faktörün Alzheimer hastalığının (AH) ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir. AH, bir nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh) azalması sonucu meydana gelmektedir. En önemli kolinerjik fonksiyon temelli AH tedavilerinden biri, düşük seyreden ACh seviyesini asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri ile kontrol etmektir. Asetilkolin esteraz enzimi, asetilkolini kolin ve asetik asite hidrolizleyen hidrolaz enzimidir ve bu enzimin inhibisyonu asetilkolin seviyesinin artırılması ile sonuçlanır. Bu durum Alzheimer hastalığının tedavisinde hala etkili bir stratejidir (Aynacı ve ark., 2014; Türkoğlu ve Güloğlu, 2004). Buna bağlı olarak, kolinesteraz inhibitörleri 1990'lerde Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur. Dünyada ilk piyasaya sürülen antikolinesteraz olan Takrin'in tarihinin oldukça eskiye dayandığı, Çin'de kullanılan ve bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan Huperzin A'nın ise oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Ülkemizde Alzheimer hastalığı tedavisinde kolinesteraz inhibitörleri olarak donepezil, rivastigmin, prostigmin ve galantamin ilaçları kullanılmaktadır. Ancak takrin kullanım gücü ve yan etkileri nedeniyle dünyada pek kullanılmamaktadır. Bu ilaçların hepsi asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin özellikle dikkat ve bellek süreçlerinde önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda bu ilaçların erken ve orta evre Alzheimer hastalarında zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir (Karuncula, 2013).



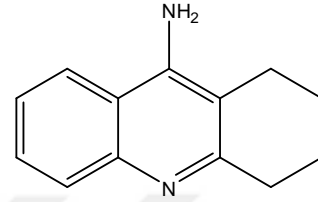
Donepezil



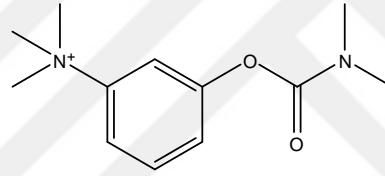
Rivastigmin



Galantamin



Takrin



Prostigmin (neostigmin)

Şekil 1.1. Alzheimer tedavisinde kullanılan kolinesteraz enzim inhibitörleri

1.3.2. α -Glikozidaz, α -Amilaz Enzimleri ve Diyabet

Diyabetes mellitus, yaygın kronik bir hastalık olup hem insülin üretimi yetersizliği hem de insüline dirençten kaynaklanan ve de yüksek kan glikoz düzeyi ile karakterize edilir (Ceylan, 2015). Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen diyabet hastası sayısının 2015 verilerine göre dünyada 340-356 milyon arasında değiştiği bildirilmiştir (<http://www.diabetcemiyeti.org/c/diyabet-istatistikleri>). Aynı rapora göre dünyada 2015 yılında yaklaşık 5 milyon insanın diyabet ve diyabetin neden olduğu rahatsızlıklardan hayatını kaybettiği rapor edilmiştir (<http://www.diabetcemiyeti.org/c/diyabet-istatistikleri>). Çin, Hindistan, ABD, Brezilya, Rusya gibi özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde beslenme şekillerinden dolayı daha yaygın görülen ve dünyada her geçen gün artan bir kronik hastalık olduğu bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Türkiyede 2014 yılında yaklaşık olarak 6,5 milyon insanın diyabet

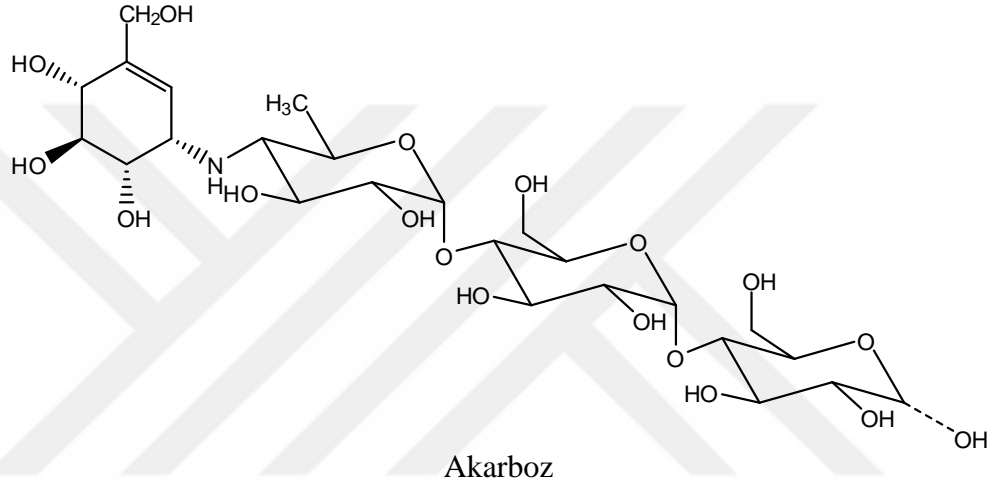
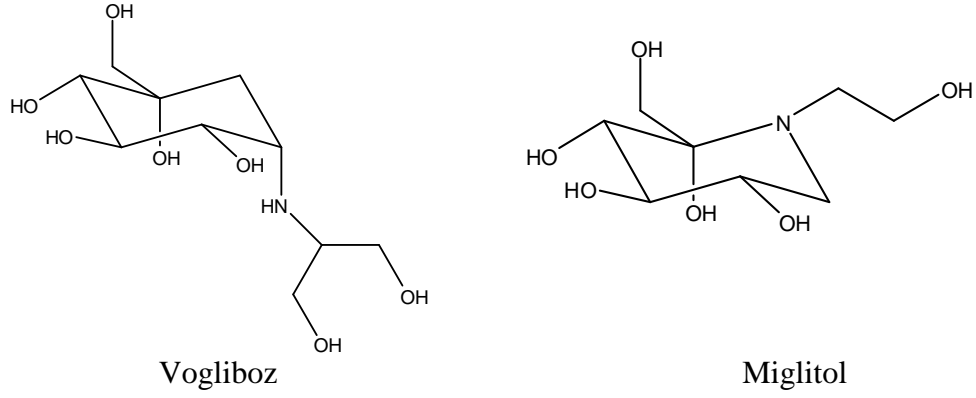
hastası olduğunu raporlamış olup 2014 yılı IDF verilerine göre ise ülkemizde diyabet görülme oranı % 14,7 olarak belirlenmiştir (Bayraktar, 2001; <http://www.tdhd.org/pdf/VER%C4%B0LERLE%20D%C3%9CNYADA%20VE%20T%C3%9CRK%C4%B0YEDE%20D%C4%B0YABET.pdf>). Diyabet hastalığından muzdarip olan hastaların nispeten küçük bir oranı (yaklaşık %10) tip 1 ya da insüline bağlı diyabet hastasıdır. Diğer taraftan, diyabet hastalarının büyük bir çoğunluğu (%80-90) insüline bağlı olmayıp, tip 2 diyabet olarak adlandırılan şeker hastalarıdır. Tip 2 diyabetin etiolojisinde insülin direnci esastır. Ancak etiyolojiye bakılmaksızın diyabet hastalığında nefropati, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalıklarının riskinin daha fazla olduğu iyi bilinmektedir (Bayraktar, 2001; Mazzone ve ark., 2008; Ceylan, 2015.)

Tip 2 diyabet tedavisi için en önemli yaklaşım α -amilaz ve α -glikozidaz sindirim sistemindeki en önemli iki enzim olan α -amilaz ve α -glikozidaz enzimlerin inhibisyonu ve beslenme sonrası hiperglisemiye azaltmaktır (Laube, 2002; Ceylan, 2015). α -Amilaz ve α -glikozidaz enzimleri insanlarda karbonhidrat sindiriminde görev alan enzimlerdir. Sindirim sisteminde önemli rol alan amilaz enzimi beslenme ile alınan nişasta, α -dekstrin, maltoz vb. karbonhidratları hidroliz eden bir enzimdir (Laube, 2002; Çalışkan, 2011; Ceylan, 2015). Amilaz enzimi insan tükürüğünde ve de pankreas salgılarında bulunan bir enzimdir (Özdemir ve Sıdal, 2013). Amilazlar (1,4- α -D-glukanohidrolaz) nişastadaki α -1,4 bağlarını hidrolize eden hem sağlık hem de endüstriyel bakımdan önemli enzimlerdir. Doğada bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenir ve amiloz, amilopektin ve glikojeni oluşturan glikoz birimleri arasındaki glikozit bağlarını parçalayarak maltoza dönüştürür (Özdemir ve Sıdal, 2013).

α -Glikozidazlar (α -D-glikozit glikohidrolaz, ekzo- α -1,4-glikozidaz) bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda karbonhidrat metabolizmasında amilazlar gibi anahtar rol oynayan enzimlerdir (Çöleri, 2007; Singh ve ark., 2010; Ceylan, 2015). Canlılar tarafından nişasta parçalanmasının son basamağı α -glikozidaz enzimi vasıtası ile gerçekleştirilir. α -Amilaz, amiloglikozidaz ve pullunaz gibi nişastaya etki eden diğer glukozil hidrolaz enzimlerinin katalizi ile oluşan kısa zincirli maltooligosakkaritlerdeki α -1,4-glikozit bağlarını spesifik olarak parçalayarak α -D-glukoz monomerlerine dönüştürürler. α -Glikozidazlar çoğunlukla transglukozilasyon aktivitesine sahip olup reaksiyonları geri dönüşümlüdür ve kataliz tepkimelerini ince bağırsaklarda

geçekleştirirler (Çöleri, 2007; Singh ve ark., 2010; Ceylan, 2015). α -Glikozidaz enziminin substrat spesifiklikleri büyük ölçüde farklılık gösterir. Oligosakkaritleri polisakkaritlere oranla daha hızlı hidroliz ederler. Bu nedenle α -glikozidazlar, oligosakkarit ve α -D-glikozitleri de içeren düşük molekül ağırlıklı substratların α -1,4-glukopiranoz birimlerini ve aynı zamanda çözünür nişasta ve glikojen gibi α -glukanları da hidrolize edebilme yeteneğine sahip enzimlerdir (Aiyer, 2005; Çöleri, 2007; Singh ve ark., 2010; Ceylan, 2015).

Sindirim sisteminde anahtar rol oynayan hem α -amilaz hem de α -glikozidaz enzimleri beslenme sonrası kan glikoz düzeyinin artmasından birinci derece sorumlu enzimlerdir (Laube, 2002; Singh ve ark., 2010; Ceylan, 2015). Dolayısıyla α -amilaz ve α -glikozidaz enzimlerinin inhibisyonu artan kan glikoz seviyesinin azaltılmasında ve de hipergliseminin önlenmesinde önemli bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır (Laube, 2002; Singh ve ark., 2010; Ceylan, 2015). Diyabet hastalarının önemli bir kısmı sadece uygun bir diyet ve egzersiz programı ile yıllarca kan glikoz değerlerini kontrol altında tutabilecekleri bildirilmesine karşın bu yollarla kontrol edilemeyen hastalarda farmakolojik tedavi gereklidir. Tip 2 diyabet tedavisinde Türkiye’de kullanılan oral hipoglisemik ajanlar sülfonilüreler, biguanidler ve α -glikozidaz enzim inhibitörleri olarak üç grupta toplanırlar (Bayraktar, 2001). α -Glikozidaz enzim inhibitörleri akarboz, vogliboz ve miglitoldur. Akarboz, azot atomu içeren bir pseudosakkarid sınıfı bir bileşiktir. Vogliboz, valiomin türevi iken, miglitol ise deoksinojirimisin türevi bir etken maddedir (Şekil 1.2). Akarboz ve vogliboz mikrobiyal kaynaklı olup mikroorganizmalardan üretilirken, miglitol ise sentetik bir ilaçtır (Şekil 1.2). Türkiye’de ve diğer dünya ülkelerinde bu grubun en fazla kullanılanı akarboz olup, hem glukozamilaz hem de sukraz enzimleri inhibitörüdür. Akarboz nişasta, sukroz ve maltozun emilimini geciktirirken, ortamda bulunan glikoz ve diğer disakkaritlerin emilimi üzerinde etkili değildir. Akarboz laktaz üzerinde etkin olmadığından dolayı laktoz intoleransı olan hastalarda akarboz kullanımı herhangi bir sorun yaratmaz (Bayraktar, 2001).



Şekil 1.2. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan α -glikozidaz enzim inhibitörleri

1.4. Önceki Çalışmalar

Antepfıstığının meyve, yaprak, yumuşak endokarp ve reçinesinin kimyasal bileşimi, bazı biyolojik aktiviteleri ve besin özellikleri üzerine literatürde oldukça fazla sayıda bilimsel makaleye rastlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda meyve sap üzerine herhangi bir araştırma bulgusuna rastlanmamıştır. Bu çalışmalar farklı başlıklar altında toplanarak aşağıda özetlenmiştir.

1.4.1. Uçucu Yağ Çalışmaları

Uçucu yağ çalışmalarında bitkinin yaprak, reçine gibi farklı kısımlarından değişik yöntemlerle elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimi GC-MS yöntemiyle teşhis edilmiştir.

Napoli ve ark. (2019) yaptıkları yeni bir çalışmada *P. vera* reçinesinin uçucu yağının α -pinen bakımından zengin olduğunu ortaya koymuşlardır. D'Arrigo ve ark. (2019) *P. vera*'nın dış kabuklarında elde edilen ve D-limonen ve 3-karen bakımından zengin olan uçucu yağın 2,50-5,0 mg/mL konsantrasyonlarda üç farklı *Candida* türüne (*C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. alabrata*) karşı antifungal özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Smeriglio ve ark. (2017) *P. vera* kabuklarından elde ettikleri uçucu yağın ana bileşenlerinin 4-karen (% 31,74), α -pinen (% 23,58), limonen (% 8,00) ve 3-karen (% 7,73) olduğunu belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar uçucu yağın antioksidan, hücre koruyucu ve antimikrobiyal özelliklerini de rapor etmişlerdir. Uçucu yağ önemli oranda antioksidan özellik sergilemiş ve laktat dehidrogenaz (LDH) miktarını azaltarak hücre canlılığını artırmıştır. Mahmoudvand ve ark. (2016) *P.vera* uçucu yağının antiprotozoal aktivitesini araştırmış ve uçucu yağın *Leishmania tropica* ve *Leishmania major* patojen türlerinin büyümesini doza bağımlı olarak inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar ana bileşenler olarak limonen (% 26,21), α -pinen (% 18,07) ve α -tujen (% 9,31) içeren uçucu yağın J774 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediğini bulmuşlardır. Hashemi- Moghaddam ve ark. (2014) *P. vera* meyve kabuklarından manyetik nanopartikül-mikrodalga destekli destilasyon (MW) yöntemiyle elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenlerini GC-MS yöntemiyle analiz etmiş ve uçucu yağın α -pinen (% 31,50), α -terpinolen (% 20,2), mirsen (% 11,5), pinokarvon (% 6,2) ve kamfen (% 4,8) ana bileşenleri bakımında zengin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmada bu yöntemle elde edilen uçucu yağ geleneksel hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ ile mukayese edilmiş ve aynı anda mikrodalga ve nanopartikül kullanımının uçucu yağ kalitesini ve miktarını artırdığı gözlemlenmiştir. Chahed ve ark. (2012) Tunus'ta yetişen *P.vera*'nın yaprak gelişimi boyunca uçucu yağın kimyasal bileşimindeki değişimi incelemişlerdir. Bitkinin uçucu yağının genellikle ana bileşenler olarak terpinen-4-ol ve α -terpineol içermesine karşın sadece haziran ayında elde edilen uçucu yağda α -terpinolen ve α -pinen bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir. Chahed ve ark (2008) yaptıkları farklı bir çalışmada *P. vera* meyve kabuğunun meyve oluşumu ve meyvenin olgunlaşması süresince uçucu bileşenler olarak α -pinen (% 15,0-47,4) ve α -terpinolen (% 32,2-51,1) içerdiğini rapor etmişlerdir. Kalalinia ve ark. (2008) İran bölgesinde yetişen *P. vera* reçinesi hidrodestilasyon uçucu yağının kimyasal bileşimini GC-MS ile analiz etmiş ve yağın α -pinen, β -pinen ve α -tujen ana

bileşenlerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Aynı araştırmada uçucu yağın *C. albicans* yanı sıra hem gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) hem de gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) mikroorganizmalarına karşı güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu rapor edilmiştir. Tsokou ve ark. (2007) *P. vera* yaprak ve meyvelerinden elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimlerine GC-MS yöntemiyle analiz etmiş ve meyve uçucu yağının ana bileşenler olarak α -pinen (% 54,6) ve α -terpinolen (% 31,2) içerirken yaprak uçucu yağının ise ana bileşenler olarak α -pinen (% 30,0), α -terpinolen (%17,6) ve bornil asetat (% 11,3) içerdiğini belirlemişlerdir. Ana bileşenler olarak yine α -pinen, β -pinen ve α -tujen içeren İran orijinli *P. vera* reçine uçucu yağı midede ülserle neden olduğu düşünülen *Helicobacter pylori* türünün on iki klinik izolatlarına karşı bakteriyostatik aktivitesi test edilmiş ve tüm izolatların uçucu yağa karşı hassas olduğunu rapor edilmiştir (Ramezani ve ark., 2004).

Türkiye’de yetişen *P. vera* reçinesi ve yapraklarından elde edilen hidrodestilasyon uçucu yağlarının benzer ana bileşenlere sahip oldukları iki ayrı araştırma grubu tarafından ortaya konulmuştur (Duru ve ark., 2003; Alma ve ark., 2004). Her iki uçucu yağda da α -pinen (sırasıyla % 75,6 ve % 29,2), β -pinen (sırasıyla % 9,5 ve % 2,2), kamfen (sırasıyla % 1,4 ve % 8,3) ve limonen (sırasıyla % 1,0 ve % 12,4) ana bileşenler olarak dikkat çekmektedir. Yine ülkemizde yapılan bir araştırmada Kendirci ve Onogur (2011) sırasıyla Uzun, Kırmızı, Halebi, Siirt ve Ohadi olarak sınıflandırılan beş farklı taze Antepfıstığı çeşidinin taze meyvelerinin uçucu bileşenlerini SPME/GC-MS yöntemiyle karşılaştırmış ve tüm çeşitlerinin ana bileşenler olarak α -pinen (%15,53-48,57), α -terpinolen (% 1,66-3,06), limonen (% 3,15-30,04) ve mirsen (% 3,50-8,95) içerdiğini bildirmişlerdir.

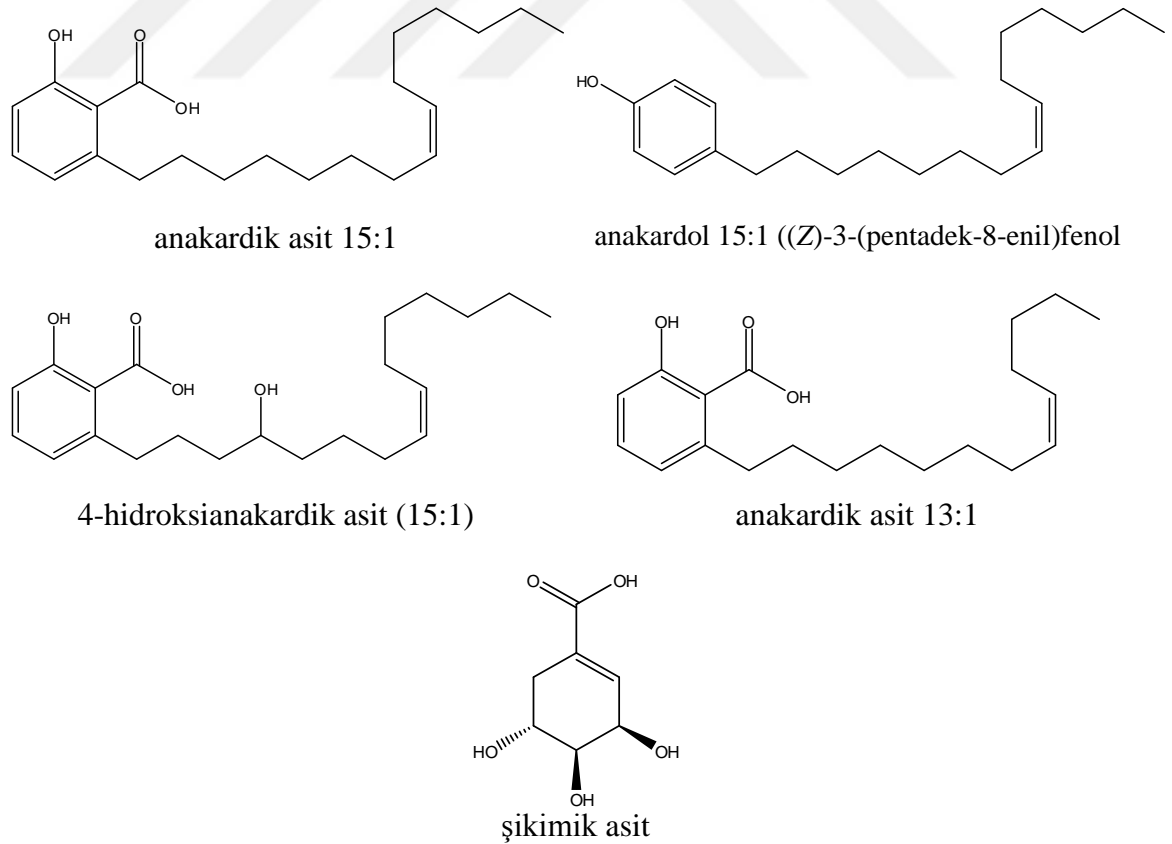
1.4.2. Kimyasal Bileşim ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Antep fıstığı meyvelerinin ve diğer kısımlarının hem insan sağlığı hem de farmakolojik açıdan birçok faydasının olduğu birçok araştırma ile ortaya konmuştur. Antep fıstığı meyveleri ve diğer kısımları içerdiği suda ve yağda çözünen antioksidan bileşenlerden dolayı anti-enflamatuar, antitiglisemik, tansiyon dengeleyici, kolesterol düşürücü, antiprotozoal, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antilipaz ve antilipoksigenaz, antikanser ve kalp koruyucu özelliklere sahip önemli bir tür ve de gıda maddesidir.

(Ozcelik ve ark., 2005; Orhan ve ark., 2006a; Ballistreri ve ark., 2009; Rauf ve ark., 2017; Koyuncu ve ark., 2018; Seifaddinipour ve ark., 2018).

Saitta ve ark. (2009) Antep fıstığının gıda maddesi olarak kullanılan iç meyveleri üzerine yaptıkları bir çalışmada meyvede 3-(8-pentadekenil)fenol, 3-(10-pentadekenil)fenol, 3-pentadesilfenol ve 3-(10-heptadekenil)fenol gibi kardanol sınıfı bileşikleri İTK ile izole ederek NMR ve GC-MS yöntemiyle kimyasal yapılarını aydınlatmışlardır.

P. vera olgunlaşmış meyvelerinin (ben hali) yumuşak dış kısımlarının kimyasal bileşiminin belirlenmesine yönelik detaylı bir çalışma Gökdemir (2016) tarafından yapılmıştır. Gökdemir (2016) kabuğun etanol ekstresinden Saitta ve ark. (2009) çalışmasını destekler mahiyette anakardik asit türevleri (anakardik asit 15:1, anakardol 15:1, 4-hidroksianakardik asit 15:1, anakardik asit 13:1) ve şikimik asidi kromatografik yöntemlerle izole ederek kimyasal yapılarını spektroskopik yöntemlerle (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D- ve 2D- NMR, MS) (Şekil 1.3.) aydınlatmıştır.



Şekil 1.3. Kabuk sekonder metabolitlerinin kimyasal yapısı (Gökdemir, 2016)

Gokdemir (2016) yukarıda sözü geçen aynı çalışmasında ayrıca saf metabolitlerin yanı sıra metanol, etanol ve etil asetat ekstralarını A549 akciğer kanser hücre hattına karşı sitotoksik etkilerini test etmiştir. Çalışma sonuçları shikimic asidin, anakardol 15:1 ve anakardik asit 13:1 maddelerinin sitotoksik olduğunu göstermiştir. *P. vera*'nın dış kabuk ve de meyve kısımlarının anakardik asit sınıfı maddelerce zengin olduğu daha önce yapılan kromatografik ve spektroskopik çalışmalarla da ortaya konmuştur (Tyman, 1979; Yalpani ve Tyman, 1983).

Diğer taraftan Dünya ekosisteminin farklı bölgelerinde yetiştirilen *P. vera*'nın meyvelerinin ve meyve kabuklarının kimyasal bileşenleri HPLC yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve bu çalışmalarda hem meyve hem de meyve kabuklarının apigenin, kafeik asit, kateşin, *p*-kumarik asit, epikateşin, erioditol, erioditol-7-*O*-glikozit, gallik asit, hesperidin, heksagalloyl heksoz, *p*-hidroksibenzoik asit, isoramnetin-7-*O*-glikozit, izoramnetin-3-*O*-glikozit, kamferol, monogalloil glikozit, monogalloil kunik asit, naringenin-7-*O*-neohesperidosit, naringin, penta-*O*-galloyl- β -D-glikozit, protocateşik asit, kersetin, kersetin-3-*O*-galaktozid, kersetin-3-*O*-glikozit, kersetin-3-*O*-glukuronit, kersetin-3-*O*-rutinozid, siringik asit ile anakardik asitler 13:1, 13:0, 17:1 gibi fenolik maddeler bakımından zengin olduğu ortaya konulmuştur (Tomaino ve ark., 2010; Bareca ve ark., 2016; Ersan ve ark., 2016, 2018; Kilic ve ark., 2016; Garavand ve ark., 2017; Sonmezdag ve ark., 2017, 2018, 2019; Noguera-Artiaga ve ark., 2018). Fenolik maddelerce zengin olan ve güçlü antioksidan sergilemeleri beklenen meyve ve meyve kabuklarının antioksidan özellikleri üzerine de literatürde bir çok araştırma sonucuna rastlanmış olup bu çalışmalarda hem meyve hem de meyve kabuklarından elde edilen ekstraların güçlü antioksidan potansiyellerinin olduğu bildirilmiştir (Gentile ve ark., 2007; Ozturk ve ark., 2010; Tomaino ve ark., 2010; Hosseinzadeh ve ark., 2012; Martorana ve ark., 2013; Sehitoglu ve ark., 2015; Barreca ve ark., 2016; Kilic ve ark., 2016; Garavand ve ark., 2017; Paternit ve ark., 2017; Sonmezdag ve ark., 2017; Ersan ve ark., 2018; Koyuncu ve ark., 2018; Taghizadeh ve ark., 2018).

P. vera'nın meyve kabuğundan elde edilen hekzan, etil asetat, metanol ve su ekstralarının insan kolon kanser (HT-29 ve HGT-116), meme kanser (MCF-7), akciğer kanser (H23), karaciğer kanser (HepG2), servik kanser (Ca Ski) ve normal fibroblast (BJ-5ta) hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar meyve

yumuşak kabuk kısmı etil asetat ekstresinin MCF-7, HT-29 ve HCT-116 inhibe ettiğini, ekstrenin apoptozu uyardığını ve kontrol grubuna kıyasla anjiyogenezi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir (Seifaddinipour ve ark. 2018). *P. vera* kabuk ekstresinin karaciğer hücre hatlarında apoptozu uyararak sitotoksik etki gösterdiği Fathalizadeh ve ark. (2015) tarafından da ayrıca doğrulanmıştır.

Diğer taraftan Paterniti ve ark. (2017) kabuk ve meyvelerinden elde ettikleri polifenolce zengin ekstrelerinin lipopolisakkaritlerle uyarılmış olan enflamasyonu, TNF- α ve IL1- β sitokinlerinin üretimini önemli oranda azalttığını tespit ettiler. Ehsani ve ark. (2017) tarafından yapılan farklı bir farmakolojik çalışmada ise *P. vera*'nın hidroalkolik ekstresinin sıçanlarda gentamisin ile uyarılmış nefrotoksiteye karşı koruyucu etkisi araştırılmış ve ekstrenin nefrokoruyucu etkisinin olduğu kan serumundaki parametrelerden ve histolojik çalışmalardan ortaya konmuştur.

Mirian ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada *P. vera* ve *P. khinjuk* reçinelerinden elde ettikleri metanol ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda HUVEC ve Y79 hücre hatlarına karşı sitotoksik ve antianjiyojenik etkilerini araştırmışlardır. Ekstrelerin Y79 hücre hattına karşı HUVEC hücrelerine nazaran daha yüksek oranda sitotoksik ve antianjiyojenik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hosseinzadeh ve ark. (2011) *P. vera*'nın yapraklarından elde ettikleri su ve etanol ekstrelerinin ağrı kesici (antinosiseptif) ve antiinflamatuvar etkilerini araştırmış ve etanol ekstresinin antiinflamatuvar, etanol ve su ekstrelerinin ise ağrı kesici özelliğinin olduğunu belirlemişlerdir. *P. vera*'nın reçinesinin hem antiinflamatuvar hem de ağrı kesici (antinosiseptif) özelliğinin olduğu Orhan ve ark. (2006) tarafından da açıklanmıştır. Bununla beraber aynı araştırmada meyve, yaprak, dal ve sap kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstrelerinin antiinflamatuvar ve ağrı kesici özelliklerinin olmadığı da rapor edilmiştir.

Ateroskleroz atardamarları etkileyen ve halk arasında damar sertliği olarak bilinen hastalıklardan birisidir. Yağlı besinlerin tüketimi ve oksidatif stres bu hastalığın oluşumunda ve yaygınlaşmasına önemli rol oynamaktadır. Marinou ve ark. (2010) *P. vera*'nın yenilen meyve kısmından elde ettikleri metanol ve sikloheksan ekstrelerini tavşanlarda ateroskleroza karşı test etmişlerdir. Tavşanlardan alınan kan örneklerinde

lipit profili, lipit peroksidasyon düzeyi ve karaciğer parametrelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar her iki ekstrenin de tavşan kan örneklerinde kontrol grubuna göre HDL kolesterol düzeyini yükselttiğini, lipit peroksidasyonu azalttığını ve karaciğer hasarının en önemli iki belirteci olan ALT ve AST değerlerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada metanol etkisinin kontrol grubuna göre aterosklerotik lezyonlarını önemli oranda düşürdüğü bildirilmiştir.

1.5. Çalışmanın Amacı

Yukarıdaki literatür özetinden görüleceği üzere *P. vera* hem besinsel hem de farmakolojik özellikleri olan bir türdür. Bu çalışmada Antepfıstığı İşleme Tesislerinde atık materyal olarak karşımıza çıkan meyve sap kısmından sekonder metabolitlerinin saflaştırılması ve *in vitro* şartlarda dört farklı enzim üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Antep fıstığının meyve, yaprak ve reçinesinin kimyasal bileşimi ve bazı biyolojik aktiviteleri üzerine literatürde bazı kayıtlara rastlanmıştır. Ancak bu çalışmada genellikle yaprak, reçine ve meyveler üzerine araştırmalar yapılmış olup meyve sap kısmı (cumba) üzerine herhangi bir ciddi kayda rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada Antep fıstığı atık meyve sap kısımlarının (Resim 1.3) hekzan ekstresinin aromasının kimyasal bileşiminin GC-MS yöntemi ile belirlenmesi ve CHCl_3 ve etanol özütlerinden kromatografik yöntemlerle (Kolon Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi) sekonder metabolitlerin izolasyonu ve saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapılarının UV, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 1D ve 2D-NMR yöntemleri ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Bitkinin meyve sap kısımlarından elde edilen hekzan, kloroform ve etanol ekstraktları ile kloroform ve etanol ekstraktlarından saflaştırılan metabolitlerin dört önemli enzim (α -glukozidaz, α -amilaz, asetilkolin esterase ve butirikolin esterase) üzerine inhibisyon etkileri de ayrıca belirlenmiştir. Bu çalışmada ekstre ve ekstredeki metabolitlerin enzim aktivitesi üzerine olası antagonistik ve sinerjik etkiler de irdelenmiştir.



Resim 1.3. Antep fıstığı meyvelerinin çalışılan sap kısmının resmi

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu araştırmada kromatografik yöntemlerle yapılan izolasyon sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Aldrich, Merck ve Tekkim gibi firmalardan temin edilmiştir. Enzim inhibisyon aktivitesi çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve firmalar aşağıda verilmiştir:

- Asetil kolin esteraz
- Butiril kolin esteraz
- Asetiltiyokolin iyodür
- Bütiriltiyokolin klorür
- DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit)
- Sodyum karbonat
- α -Glikozidaz enzimi
- α -Amilaz enzimi
- Hekzan
- Akarboz
- Kloroform
- Etil asetat
- Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- Dimetilsulfoksit (DMSO)
- EDTA
- PNPG (*p*-nitrofenil- α -D-glikopiranozit)

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>
Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi (GC-MS)	: Agilent 7890B GC System
Hassas terazi	: Auhaus (AX4202)
Döner buharlaştırıcı (Evaporatör)	: İKA, RV 3 eco
Buzdolabı	: Beko No Frost D29459 NME
Saf Su Cihazı	: GFL-2201/4
UV Lambası 254 nm-366 nm	: Mineralight

FT-IR Spektrofotometresi	: Agilent (Cary 600 Series)
¹ H- ve ¹³ C-NMR Spektrometresi	: Bruker 400 MHz Spektrometre
Magnetik karıştırıcı	: İKA/C-MAG HS 7
Vorteks	: Jejotech LAB companion, VM- 96E
Ultrasonik Banyo	: Ultrasonic Cleaner/UC-10 Lab Companion
UV-VIS Spektrofotometre	: T80+UV PG Instrument Ltd.
pH-metre	: Hanna Instrument
Liyofilizatör	: Teknosem Toros TRS2/2V
Etüv	: Ultra Lab (U-150)
Isıtıcı	: MTOPS (MS300HS)
Su banyosu	: Lab companion (BS-21)
Blender	: Lab companion (VM-96E)

2.1.3. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar

Kromatografik yöntemlerle yapılan fraksiyonlama, izolasyon ve saflaştırmada kullandığımız adsorbanlar şunlardır:

Kolon Kromatografisi için; Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 ve 230-400 mesh, Merck)
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK); Silika jel (Hazır Plaka, Kieselgel 60 F₂₅₇, 0,2 mm, Merck).

İTK’da ayrılmış olan maddelere ait lekeler ayrıca UV₂₅₄, UV₃₆₅ nm de ve de H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi püskürttükten sonra ısıtma yoluyla belirlendi.

2.2. Yöntem

Bu araştırmada çalışma materyali olarak kullandığımız Antep fıstığı (*P. vera* L.) sap kısmı, antepfıstığı işleme tesislerinden atık materyal olarak alınmış ve Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Araştırma Laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

2.2.1. Bitki örneği ve ekstraksiyon işlemleri

Mevcut çalışmada *P. vera*’ in meyve sap kısımları kullanıldı. *P. vera* L. (Antep fıstığı)’nın sap kısmı bir blenderde öğütüldü ve 1500 gr örnek *n*-Hekzan ile (2,5 L) maserasyona bırakılarak, 5 kez ekstre edildi. Elde edilen ekstreler süzgeç kağıdı ile süzüldü ve süzüntüler birleştirildi. Hekzan bir döner buharlaştırıcıda (rotary evaporator) düşük sıcaklık ve basınçta uzaklaştırılarak ekstre konsantre hale getirildi. Bu işlemin sonunda kıvamlı sıvı bir ekstre elde edildi ve tartıldı (78,55 gr, verim % 5,23).

Hekzan ile ekstre edildikten sonra CHCl_3 ekstresi elde etmek üzere önce hekzan ile özütlenmiş olan aynı örnek (1500 gram) 2,5 L CHCl_3 ile 5 kez ekstrakte edildi. Elde edilen ekstratlar birleştirildi ve bir döner buharlaştırıcı ile düşük sıcaklık ve basınçta kloroform uzaklaştırıldı. Bu işlemin sonunda elde edilen ekstre tartıldı (47,42 gr, verim % 3,16).

Kloroform ile ekstrakte edilen bitki örneği (1500 g) kuru bir şekilde etanol (2,5 L) ile oda şartlarında bekletilerek 5kez ekstrakte edildi. Ekstredeki etil alkol döner buharlaştırıcıda düşük sıcaklık (65 °C) ve basınçta uzaklaştırıldı. Bu işlemin sonunda 109,9 g (% 7,33) etanol ekstresi elde edildi.

2.2.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Sap hekzan ekstresindeki aroma verici bileşenler GC kapiler kolonda tutulma sürelerine ve bağıl oranlarına göre ayrılarak analiz edildi. Hekzan ekstresindeki aroma verici bileşenler HP-5 MS kapiler kolon (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μm) bağlı Agilent 7890B cihazı kullanılarak analiz edildi. Kütle analizleri için 70 eV' luk iyonizasyon enerjisine sahip bir elektron iyonizasyon (E.I) sistemi kullanıldı, kolonda yürütme işlemi için helyum gazı (1 ml/dakika) kullanıldı. Enjeksiyon ve MS transfer sıcaklıkları sırasıyla 200 °C ve 250 °C dir. Kolon sıcaklığı 3 °C/dak oranında 50 °C de 150 °C'ye çıkarıldı, 150 °C de 10 dakika izotermal olarak tutuldu ve sonra 10 °C dakika ile 250 °C'ye çıkarıldı ve 250 °C'de 7 dakika izotermal olarak tutuldu. Metilen klorür de seyreltilmiş (1/10, kütle/hacim) ekstrenin 1 μL 'lik kısmı 20:1 split oranında otomatik olarak enjekte edildi. Bileşenlere ait piklerin bağıl oranı cihazın otomatik integrasyonu ile belirlendi. Her bir bileşiğin kalitatif analizi HP-5 MS kapiler kolonunda referans maddelerin alıkonma zamanlarının ve Kovats retention indekslerinin kıyaslanması, her bir bileşenin kütle spektrumlarındaki parçalanması ile elde edilen NIST kütüphaneleri ve yayımlanmış datalardan (Adams, 2007) hesaplanması ile gerçekleştirildi.

P.vera sap kısımları güzel kokulu atık bir materyaldir. Bu nedenle hoş kokuya neden olan uçucu bileşenler ayrıca Headspace GC-MS yöntemi ile de analiz edildi. Headspace yönteminde örnekteki uçucu bileşenleri buhar haline getirmek için örnek 45 dakika 80 °C de bekletildi. Elde edilen buhar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 μm kapiler kolon bağlı Agilent 7890B cihazı kullanılarak analiz edildi. Kütle analizleri için 70 eV' luk iyonizasyon enerjisine sahip bir elektron iyonizasyon (E.I) sistemi kullanıldı.

Kolonda yürütme işlemi için helyum gazı (1 mL/dakika) kullanıldı. Enjeksiyon ve MS transfer sıcaklıkları sırasıyla 200 °C ve 250 °C dir. Kolon sıcaklığı 40 °C de 2 dakika izotermal olarak bekletildikten sonra 5 °C/dak ile 150 °C'ye çıkarıldı, 150 °C de 1 dakika izotermal olarak tutulduktan sonra 5 °C/dak ile 250 °C'ye çıkarıldı ve 6 dakika izotermal olarak bekletildi. Bileşenlere ait piklerin bağıl oranı cihazın otomatik integrasyonu ile belirlendi. Her bir bileşiğin kalitatif analizi HP-5 MS kapiler kolonunda referans maddelerin alıkonma zamanlarının ve Kovats retention indekslerinin kıyaslanması, her bir bileşenin kütle spektrumlarındaki parçalanması ile elde edilen NIST kütüphaneleri ve yayımlanmış datalardan (Adams, 2007) hesaplanması ile gerçekleştirildi.

2.2.3. Antep fıstığı (*P. vera L.*) Sapı Kloroform Ekstresi Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

İTK yöntemi ile yapılan kontrollerin sonucunda elde edilen ekstredeki metabolitleri saflaştırmak üzere kolon kromatografisi çalışmalarında uygun hareketli faz sistemlerinin hekzan-etil asetat (9:1, 8:2, 6:4) sistemleri olduğu belirlendi. *P. vera L.*'den elde edilen kloroform ekstresini fraksiyonlamak üzere silika jel KK yapıldı ve bu amaçla, 250 gram silika jel (kiesel jel 70-230 mesh, Merck) önce hekzan-etil asetat (9:1) sistemi ile süspansiyon haline getirilerek kolona tatbik edildi. Ekstre (40 gram) uygun miktar hekzan-etil asetat (9:1) sisteminde çözüldü ve bir damlalık ile kolonun üst kısmından yüklendi. Kolon kromatografisinde elüe etme işlemine hekzan-etil asetat (9:1) sistemi ile başlandı ve etil asetat ile hareketli fazın polaritesi artırılarak (8:2, 6:4, 4:6) elusyona devam edildi. Fraksiyonlar 50 ml hacimler halinde toplandı ve İTK da yukarıda sözü geçen hareketli faz sistemlerinde kontrol edildi. Aynı lekeleri içeren fraksiyonlar kendi aralarında birleştirildi. Fraksiyonların birleştirilmesi işlemleri sırasında 8-24. fraksiyonlarda bekletilme esnasında beyaz renkli kristallerin oluştuğu gözlemlendi. Kristaller hekzan-etil asetat (9:1) sistemi üzerinden birkaç kez yıkandı ve yıkanan kristaller çözülerek İTK' da kontrol edildi. Yapılan kontroller sonrasında kristallerin saf olduğu belirlendi. Hekzan-etil asetat (9:1) sistemi üzerinden kristaller birkaç kez daha yeniden kristallendirilerek saflık oranı yükseltildi. Bu işlemlerin sonucunda saflaştırılan madde **PVSC-1** (2.53 gram) olarak kodlandı. Önceki fraksiyonlarda olduğu gibi 25-39. fraksiyonlarda da bir kristallenmenin olduğu gözlemlendi. Bu kristaller kristal şekli bakımından **PVSC-1** den farklılık gösterdiği tespit edilmesine karşın bu maddenin Rf

değerinin **PVSC-1** ile aynı olduğu belirlendi. Kristal şekilleri farklı olduğu için her ihtimale karşı ayrı konuldu ve **PVSC-2** (2.34 gr) olarak kodlandı. **PVSC-1** ve **PVSC-2** moleküllerinin ¹H- ve ¹³C-NMR spektroskopik verileri bu iki maddenin birbirinin aynısı olduğunu gösterdi. Kromatografik işlemlerin sonunda aynı molekül olduğu belirlenen **PVSC-1** ve **PVSC-2**'den toplamda 4,87 g (verim= % 0,33) madde elde edildi.

Kristallendirme işlemlerinin sonunda kalan kristallenmeyen kısımlar İTK'da yapılan kontrollerin sonunda dört fraksiyona bölündü ve bu fraksiyonlar: PVSCA (3-7. fraksiyon, 3g), PVSCB (8-24. fraksiyon, 9.60 g), PVSCC (25-53. fraksiyon, 4.19 g) PVSCD (54-65 fraksiyon, 12.00 g) olarak kodlandı.

İTK ile yapılan kontrolde **PVSCA** fraksiyonunun (3 g) genellikle lipidik yapılı (yağimsı) moleküller içerdiği belirlendi. Bu nedenle üzerinde kromatografik çalışmalar yapılmadı.

PVSCB Fraksiyonu Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyon (9,60 g) içerdiği metabolitleri saflaştırmak üzere yeniden silika jel KK tabii tutuldu. Bu amaçla 60 gram (70-230 mesh) silika jel hekzan-EtOAc (9:1) hareketli faz sistemi kullanılarak kolan hazırlandı ve aynı sistemle elüe edildi. İTK'da kontroller sonrasında ilk üç fraksiyonun önemli bir madde içermediği için atıldı. Aynı maddeleri içeren 4-5. fraksiyonlar kendi arasında, 6-12. fraksiyonlar kendi arasında, 13-17. fraksiyonlar kendi arasında, 18-23. fraksiyonlar kendi arasında, 24-35. fraksiyonlar kendi arasında, 36-45. fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi ve sırasıyla A, B, C, D ve E fraksiyonları olarak kodlandı. C fraksiyonu (4,55 g) İTK ile yapılan kontrolde yüksek oranda saf bir madde içeriyordu. Bu maddeyi daha da temiz bir şekilde saflaştırmak üzere C fraksiyonu yeniden silika jel KK'a (50 g silika jel, 230-400 mesh) tabii tutuldu. Hareketli faz olarak hekzan:EtOAc (9:1) sistemi kullanıldı ve fraksiyonlar 10 mL hacimler halinde toplandı. İTK ile yapılan kontrollerde 6-9. fraksiyonların saf olduğu tespit edildi ve saf madde **PVSC-3** (1,38 g) olarak kodlandı.

PVSCC Fraksiyonu Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyon üzerine yeterli miktarda hekzan-EtOAc (9:1) solvent sisteminden eklendi, fraksiyon su banyosunda ısıtılarak çözüldü ve oda şartlarında bir kaç saat bekletildi. Bekletme sonrasında bir maddenin kristallendiği gözlemlendi. Kristaller sıvı kısımdan dikkatli bir şekilde ayrıldı ve her defasında sıvı kısma aynı işlemler uygulandı. Bu işlemlerin sonunda kristaller İTK'da daha önce saflaştırılan **PVSC-2** ile beraber yürütülerek

kontrol edildi. Kontrol sonrasında kristallerin (1,25 g) saf olduğu ve **PVSC-2** ile aynı madde olduğu tespit edildi. Kristallendirilme sonrası geriye kalan sıvı kısım İTK ile yapılan kontroller sonrasında çok fazla sayıda madde içerdiğinden ayrıca saflaştırma çalışmalarına dahil edilmedi.

PVSCD Fraksiyonu Üzerine Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Hekzan-EtOAc (6:4) solvent sistemi kullanılarak İTK ile yapılan kontrolde PVSCD (12,00 g) fraksiyonunun şimdiye kadar saflaştırılan maddelerden farklı ve daha polar bir majör madde içerdiği gözlemlendi. Ana maddeyi saflaştırmak üzere PVSCD fraksiyonu hekzan-EtOAc (6:4) hareketli faz sistemi üzerinden silika jel kolon kromatografisine (150 g silika jel, 70-230 mesh) tabii tutuldu ve fraksiyonlar 40 mL hacimler halinde toplandı. Kolon kromatografisi sonucunda toplam 45 fraksiyon toplandı ve 6-18. fraksiyonların saf olduğu belirlendi. Saf maddeyi içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi, aynı solvent sistemi (Hekzan-EtOAc, 6:4) üzerinden kristallenmeye bırakıldı ve maddenin küçük iğneler şeklinde kristallendiği gözlemlendi. Kristallerin İTK ile yapılan kontrolünde saf olduğu tespit edildi ve saf madde **PVSC-4** (350 mg) olarak kodlandı.

2.2.4. Antep fıstığı (*P. vera* L.) Sapı Etanol Ekstresi Üzerine Yapılan Kromatografik Çalışmalar

Etanol ekstresini çözmek için üzerine yeniden etil alkol ilave edildi ve etil alkolün bir kısım ekstreyi çözmediği gözlemlendi. Etanol içerisinde çözünen ve çözünmeyen kısımlar birbirinden ayrıldı ve İTK'da $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (7,5:2,5) sisteminde kontrol edildi. Etanol içerisinde çözünmeyen kısmın daha temiz olduğu belirlendi ve böylece etanol ekstresi etanolde çözünen (48,33 g) ve çözünmeyen (61,55 g) olmak üzere iki kısma ayrıldı. Etanol içerisinde çözünmeyen kısmın daha polar olan metanol ve su içerisinde iyi çözüldüğü gözlemlendi.

Etanol içerisinde çözünmeyen kısımdan silika jel KK ile fraksiyonlamak üzere 20 gram alındı ve yeterli miktarda metanol içerisinde çözüldü. Daha sonra üzerine 20 g silika jel eklenerek metanol döner buharlaştırıcıda tamamen uzaklaştırıldı. Böylece hareketli faz sisteminde çözünmeyen ekstre silika jele adsorbe edilmiş oldu. Ekstreyi fraksiyonlara ayırmak üzere 100 g silika jel (70-230 mesh) kullanılarak diklormetan-metanol (7,5:2,5) hareketli faz sistemi üzerinden kolon kromatografisine tabii tutuldu. Fraksiyonlar 20 mL hacimler halinde toplandı ve toplamda 48 fraksiyon alındı. Toplanan her fraksiyon İTK

ile diklormetan-metanol (7,5:2,5) ve EtOAc-metanol (8:2) hareketli faz sistemleri kullanılarak kontrol edildi ve aynı maddeleri içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi. Bu işlemlerin sonunda terpenik apolar karakterli maddeleri içeren 1-8. fraksiyonlar çalışmalarda kullanılmadı. Aynı maddeleri içeren diğer fraksiyonlar ise PVSEA (9-16. fraksiyon, 0,84 g), PVSEB (17-37. fraksiyon, 2,72 g) ve PVSEC (38-48. fraksiyon, 12,78 g) olarak kodlandı.

PVSEC fraksiyonu üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar: Bu fraksiyon (12,78 g) yine 15 g silika jele adsorbe edildi ve yeniden silika jel kolon kromatografisi üzerinden fraksiyonlandı. Kolon kromatografisinde 100 g silika jel (70-230 mesh) ve EtOAc-metanol (8:2) elüent sistemi kullanıldı. Fraksiyonlar 30 mL hacimler halinde toplandı ve toplanan her bir fraksiyon aynı elüent sisteminde İTK'da kontrol edildi. Kontrol işlemleri sonrasında 12-25. fraksiyonların saf polar bir madde içerdiği tespit edildi. Fraksiyonlar birleştirildi, çözücü uzaklaştırıldı ve bu işlemin sonunda 2,51 g madde saf olarak elde edildi. Saflaştırılan madde **PVSE-1** olarak kodlandı.

PVSEB fraksiyonu üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar: PVSEB fraksiyonu (2,72 g) 40 g silika jel (70-230 mesh) üzerinden kloroform-metanol (7,5:2,5) ile elüe edildi ve 20-40. fraksiyonların yüksek oranda saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Bu maddeyi daha yüksek oranda saflaştırmak üzere bu fraksiyonlar (1,17 g) aynı elüent sistemini kullanarak yeniden silika jel kolon kromatografisine (30 g, 230-400 mesh) tabii tutuldu ve bu işlemin sonunda **PVSE-2** (550 mg) olarak kodlanan madde saf olarak elde edildi.

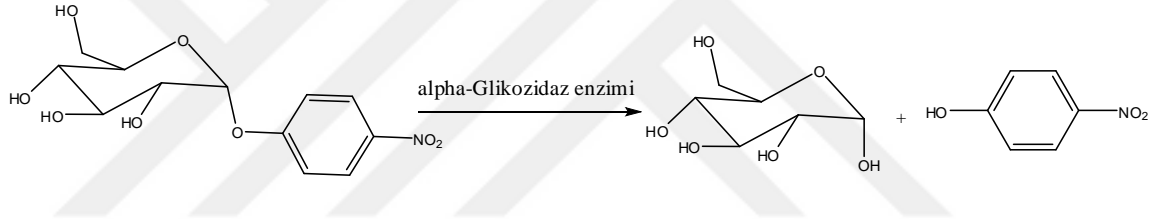
PVSE-1 ve **PVSE-2** moleküllerinin spektroskopik yöntemlerle şeker oldukları tespit edildikten sonra 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile indirgen şeker olup olmadıkları belirlendi. Bu yöntem, indirgen şekerin DNS ile tepkimesi sonucu oluşan kırmızı-kahverengi renkli nihai ürünün (3-amino-5-nitrosalisilik asit) absorbanasının UV-görünür bölge spektroskopisinde, spektroskopik olarak ölçülmesine (540 nm) dayanmaktadır (Devarajan ve Venugopal, 2012). Bu amaçla 10, 20, 40 ve 80 mg/mL konsantrasyonlarda **PVSE-1** ve **PVSE-2** çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 200 µL alındı, üzerlerine 300 µL DNS çözeltisi ile 1000 µL saf su eklendi. Deney tüpleri daha sonra 5 dakika kaynatıldı. Deneylede ayrıca indirgen şeker olmayan sakkaroz da test edildi. Kontrol olarak **PVSE-1**, **PVSE-2** ve sakkaroz içermeyen sadece DNS çözeltisi

içeren çözelti kullanıldı. DNS çözeltisinin sarı renginin kırmızı-kahverengi renge dönüşümü şekerin indirgen bir şeker olduğuna işaret etmektedir.

2.2.5. Enzim İnhibisyon Aktivite Çalışmaları

2.2.5.1. α -Glikozidaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

α -Glikozidaz enzim inhibisyon deneyi literatürde daha önce kullanılan yöntemler göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi (Elya ve ark., 2012; Dewi ve ark., 2015). α -Glikozidaz enzimi 100 mL fosfat tamponunda (10 mM, pH=6,8) çözüldü ve enzim kaynağı olarak kullanıldı. α -Glikozidaz aktivite belirleme çalışmaları *p*-nitrofenil α -D-glukopiranozit (PNPG) substratının aşağıdaki tepkimeleri sonucu oluşan sarı renkli nihai ürünün (*p*-nitrofenol) absorbansının UV-görünür bölge spektroskopisinde, spektroskopik olarak ölçülmesine (405 nm) dayandırılarak yapıldı (Elman ve ark., 1961). Nihai ürünün absorbansının azalması enzimin inhibisyonuna işaret etmektedir.



α -Glikozidaz enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı aşağıda özetlenmiştir:

α -Glikozidaz enzimi: 1 mg enzim 10 mL tampon içerisinde çözüldü.

Fosfat tamponu (0,1 M, pH:6,8): Fosfat tamponunu hazırlamak üzere 8,894 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'un 500 mL destile sudaki çözeltisi ile 7,801 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'un 500 mL sudaki çözeltisinden faydalanıldı. Bu iki çözelti pH:6,8 olacak şekilde bir pH metre vasıtasıyla hazırlandı.

PNPG (substrat) çözeltisi: 0,015 g PNPG'in 10 mL fosfat tamponunda (0,1 M, pH:6,8) çözülmesi ile hazırlandı.

Örnek çözeltileri: Ekstre ve saf metabolitlerin DMSO ya da saf suda değişik konsantrasyon aralığında stok çözeltileri hazırlandı ve deneylerde bu stok çözeltiler kullanıldı. Madde ve ekstrelerin önce düşük konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandı ve test edildi. Düşük konsantrasyonlarda etkisiz olması durumunda daha

yüksek konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandı ve deneylerde kullanıldı. Benzer şekilde pozitif kontrol olarak kullanılan akarboz düşük konsantrasyonlarda herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediğinden daha yüksek konsantrasyonlarda (2,5-80 mg/mL) stok çözeltisi hazırlanarak deneylerde kullanıldı.

α -Glikozidaz enzim aktivite çalışmalarında izlenen çalışma planı Çizelge 2.1’de özetlendi.

Çizelge 2.1. α -Glikozidaz enzim aktivitesi çalışma şeması

	Tampon (1)	Örnek (2)	Enzim (3)	Substrat (4)	Na₂CO₃ veya saf su (5)
A ₀ K	1480 μ L	-	-	20 μ L	1000 μ L
A ₀	1460 μ L	-	20 μ L	20 μ L	1000 μ L
A _i K	1460 μ L	20 μ L	-	20 μ L	1000 μ L
A _i	1440 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	1000 μ L

Parantez içindeki rakamlar uygulamaların eklenme sırasını vermektedir.

Enzim ilave edildikten sonra 10 dakika 37 °C da inkübe edildi ve üzerine substrat eklendikten sonra 37° C de 30 dakika yeniden inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında % 2’lik Na₂CO₃ (gerekli durumda sadece saf su; Na₂CO₃ çözeltisi yerine) çözeltisi eklendi, vortekslendi ve absorbanslar körlere karşı 405 nm de okundu. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Alpaslan, 2013).

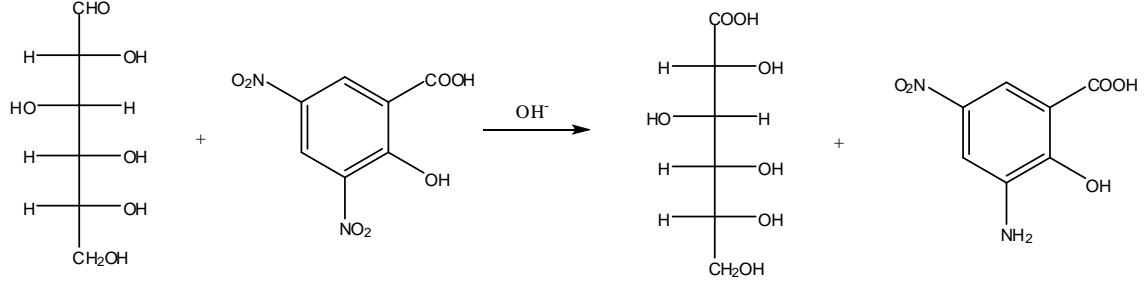
$$\text{İnhibisyon (\%)} = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

A₀: Örnek olmaksızın ölçülen ortalama absorbans ve A_i: farklı konsantrasyonlarda test örnekleri eklenerek ölçülen ortalama absorbansları ifade eder.

2.2.5.2. α -Amilaz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

α -Amilaz enzim inhibisyon aktivitesi Devarajan ve Venugopal (2012)’un yöntemine göre belirlendi. α -Amilaz enzimi sodyum fosfat tamponunda (10 mM, pH 6.9, 0.006 mol/L NaCl) çözüldü ve enzim kaynağı olarak kullanıldı. α -Amilaz aktivite belirleme çalışmaları enzim-substrat (nişasta) tepkimesi sonucu oluşan glikozun 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) ile tepkimesi sonucu oluşan kırmızı-kahverengi renkli nihai ürünün (3-amino-5-nitrosalisilik asit) absorbansının UV-görünür bölge spektroskopisinde, spektroskopik olarak ölçülmesine (540 nm) dayandırılarak yapıldı

(Devarajan ve Venugopal, 2012). Aşağıdaki tepkimede özetlenen nihai ürünün (3-amino-5-nitrosalisilik asit) absorbansının azalması enzimin inhibisyonuna işaret etmektedir.



α -Amilaz enzim aktivitesinin inhibisyonu çalışmalarında izlenen yol Çizelge 2.2'de özetlendi.

Çizelge 2.2. α -Amilaz enzim aktivitesi çalışma şeması

	Tampon (1)	Sample (2)	Enzim (3)	Substrat (4)	DNS (5)	Saf Su (6)
A ₀ K	600 μ L	-	-	300 μ L	300 μ L	3800 μ L
A ₀	560 μ L	-	40 μ L	300 μ L	300 μ L	3800 μ L
A _i K	500 μ L	100 μ L	-	300 μ L	300 μ L	3800 μ L
A _i	460 μ L	100 μ L	40 μ L	300 μ L	300 μ L	3800 μ L

Parantez içindeki rakamlar uygulamaların eklenme sırasını vermektedir.

Enzim konduktan sonra 37°C de 25 dakika inkübe edildi, üzerine substrat eklendikten sonra 37°C de 25 dakika yeniden inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında DNS eklendi ve 5 dakika boyunca kaynar suda bekletildi. Soğutulduktan sonra üzerine saf su eklendi, vortekslendi ve absorbanslar kendi körlerine karşı 540 nm de okundu.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

A₀: Örnek olmaksızın ölçülen ortalama absorbans ve A_i: farklı konsantrasyonlarda test örnekleri eklenerek ölçülen ortalama absorbansları ifade eder.

α -Amilaz enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda özetlenmiştir:

α -Amilaz enzimi: 1,5 μ L enzim 10 mL sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH:6,90, 0,006 mol/L NaCl) içerisinde çözüldü.

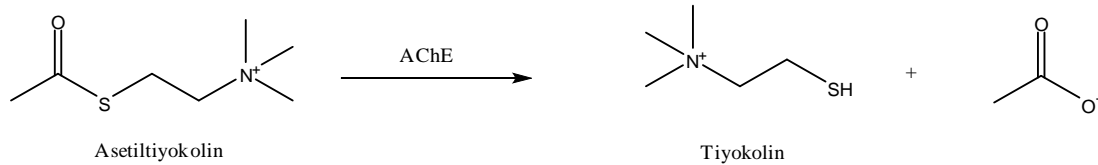
Sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH:6,9, 0,006 mol/L NaCl): Fosfat tamponunu (pH:6,90) hazırlamak üzere 8,894 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'un 500 mL distile sudaki çözeltisi ile 7,801 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'un 500 mL sudaki çözeltisinin bir pH metre vasıtasıyla karıştırılması ile hazırlandı.

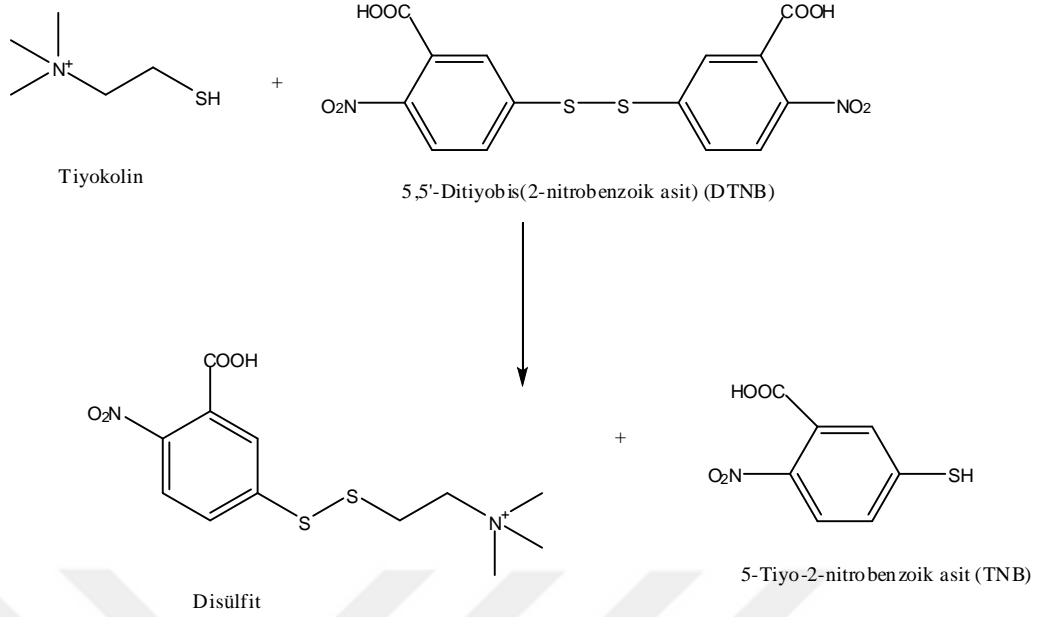
Nişasta (substrat) çözeltisi: 1 g nişasta 100 mL sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH:6,90, 0,006 mol/L NaCl) içerisinde çözüldü.

Örnek çözeltileri: Saf madde ve ekstraler DMSO ve saf su uygun çözücüler kullanılarak 0,1 mg/mL (100 ppm), 0,25 mg/mL (250 ppm), 0,50 mg/mL (500 ppm), 0,75 mg/mL (750 ppm) ve 1 mg/mL (1000 ppm) konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlandı. Ancak, hem saf madde hem de ekstrelerin düşük konsantrasyon aralığında (0.01-1 mg/mL) α -amilaz enzimine karşı genellikle etkisiz oldukları görüldü. Düşük konsantrasyonlarda etkisiz olan ekstre ve saf metabolitlerin etkisine göre daha yüksek konsantrasyonlarda (1-80 mg/mL konsantrasyon aralığında) stok çözeltileri hazırlandı ve deneylerde kullanıldı. Pozitif kontrol olarak akarboz maddesinin ise 0,1-1,0 mg/mL (100-1000 ppm) konsantrasyon aralığındaki stok çözeltileri saf su kullanılarak hazırlandı.

2.2.5.3. Asetilkolinesteraz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

Asetilkolin esteraz aktivite belirleme çalışmaları substratın aşağıdaki tepkimeleri sonucu oluşan sarı renkli nihai ürünün (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) absorbansının UV-görünür bölge spektroskopisinde, spektroskopik olarak ölçülmesine (412 nm) dayandırılarak yapıldı (Elman ve ark., 1961). Nihai ürünün absorbansının azalması enzimin inhibisyonuna işaret etmektedir.





AChE enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı aşağıda özetlenmiştir:

1M Tris-HCl tamponu (pH:8): 30,27 g Tris ve 0,370 g EDTA distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

AChE enzimi: 0,2 mg enzim 4 mL 1M Tris-HCl tamponu (pH:8) içinde çözüldü.

Substrat (asetiltiyokolin iyodat): 40 mg asetiltiyokolin iyodat 10 mL distile suda çözüldü.

DTNB çözeltisi: 0,01 g DTNB ve 0,56 g sodyum sitrat 50 mL distile suda çözüldü.

Örnek çözeltileri: Apolar karakterli hekzan ve kloroform ekstraları ile kloroform ekstresinden saflaştırılan PVSC kodlu saf metabolitlerin stok çözeltileri 10-160 mg/mL konsantrasyon aralığında DMSO içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Etanol ekstresi ve etanol ekstresinden saflaştırılan **PVSE-1** ve **PVSE-2** kodlu moleküllerin stok çözeltisi ise 10-80 mg/mL aralığında saf suda çözümlenerek hazırlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin molekülünün stok çözeltisi 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda saf suda çözümlenerek hazırlandı. Neostigmin etken maddesi için ise 0,1 (100 ppm), 0,25 (250 ppm),

0,50 (500 ppm), 0,75 (750 ppm) ve 1 mg/mL (1000 ppm) konsantrasyonlara denk gelecek şekilde hazır ilaç preparatından (0,5 mg/mL, 500 ppm) hesaplanarak kullanıldı.

AChE enzim aktivite çalışmalarında izlenen çalışma planı Çizelge 2.3'de özetlendi.

Çizelge 2.3. Asetil kolin esteraz enzim aktivitesi çalışma şeması

	Tampon (1)	Örnek (2)	Enzim (3)	Saf su (4)	Substrat (5)	DTNB (6)
A ₀ K	400 µL	-	-	1900 µL	100 µL	100 µL
A ₀	400 µL	-	10 µL	1890 µL	100 µL	100 µL
A _i K	400 µL	10 µL	-	1890 µL	100 µL	100 µL
A _i	400 µL	10 µL	10 µL	1880 µL	100 µL	100 µL

Parantez içindeki rakamlar uygulamaların eklenme sırasını vermektedir.

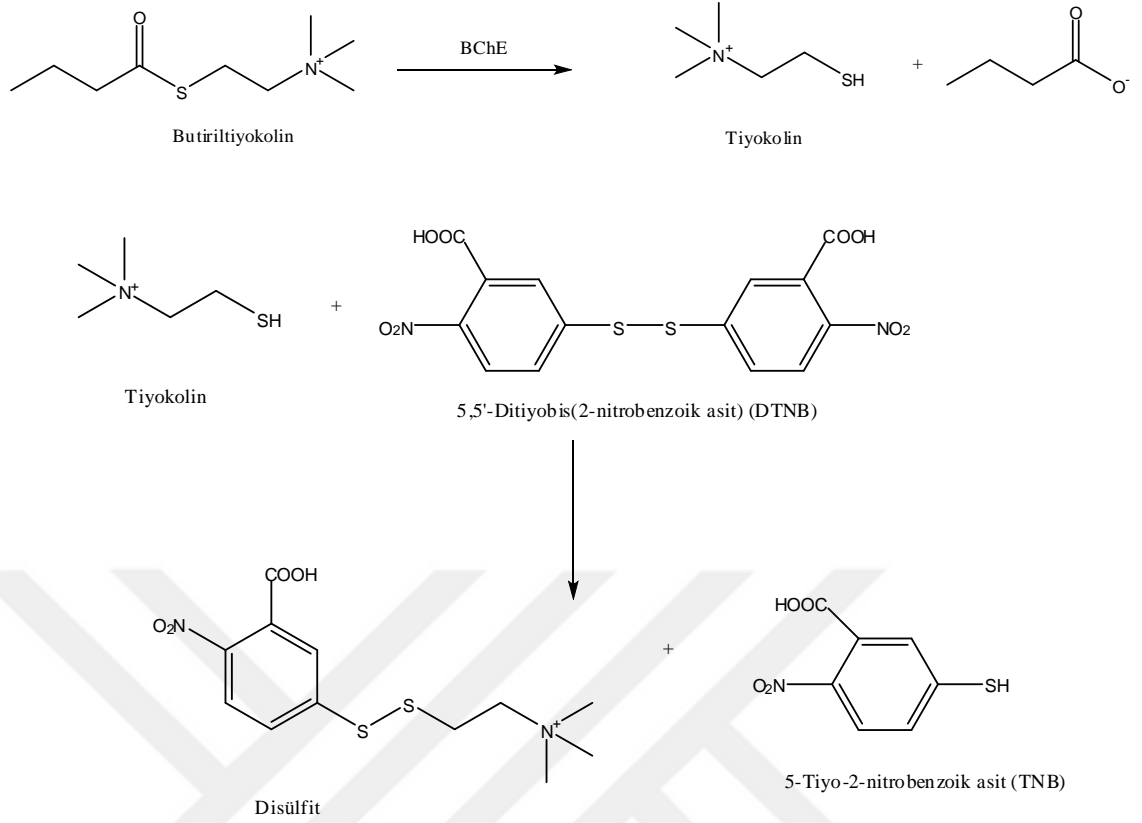
Saf su eklendikten sonra 5 dakika 25 °C da inkübe edildi. Sonra üzerine substrat eklenerek 10 dakika oda şartlarında substrat ve enzimin etkileşmesi için bekletildi. Tepkimeyi durdurmak üzere ortama 1,5 mL % 2 Na₂CO₃ veya saf su eklendi. Enzim ve substrat etkileşiminden oluşan ürünü spektroskopide okumak üzere DTNB eklendi, tüpler vortekslenildi ve 412 nm de absorbanslar uygun kendi körlerine karşı okundu. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Alpaslan, 2013).

$$\text{İnhibisyon (\%)} = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

A₀: Örnek olmaksızın ölçülen ortalama absorbans ve A_i: farklı konsantrasyonlarda test örnekleri eklenerek ölçülen ortalama absorbansları ifade eder.

2.2.5.4. Butirilkolinesteraz Enzimi İnhibisyon Çalışmaları

Butirilkolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman Metoduna göre yapıldı (Ellman ve ark., 1961). Enzim kaynağı olarak BChE, substrat olarak ise bütiriltiyokolin klorür kullanıldı. Butirilkolin esteraz aktivite belirleme çalışmaları substratın aşağıdaki tepkimeleri sonucu oluşan sarı renkli nihai ürünün (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) absorbansının UV-görünür bölge spektroskopisinde, spektroskopik olarak ölçülmesine (412 nm) dayandırılarak yapıldı (Elman ve ark., 1961). Nihai ürünün absorbansının azalması enzimin inhibisyonuna işaret etmektedir.



BChE enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı aşağıda özetlenmiştir:

Tris-HCl tamponu (1M, pH:8): 30,27 g Tris ve 0,370 g EDTA 350 mL distile suda çözüldü.

BChE enzimi: Butiril kolin esteraz enzimi (0,2 mg) 4 mL tris-HCl tamponunda (1M, pH:8) çözüldü.

Substrat (butiriltiyokolin): 40 mg butiriltiyokolin klorür 10 mL saf suda çözüldü.

DTNB çözeltisi: 0,01 gr DTNB ve 0,56 g sodyum sitrat 50 mL distile suda çözüldü.

Apolar karakterli hekzan ve kloroform ekstraları ile kloroform ekstresinden saflaştırılan PVSC kodlu saf metabolitlerin stok çözeltileri 10-160 mg/mL konsantrasyon aralığında DMSO içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Etanol ekstresi ve etanol ekstresinden saflaştırılan **PVSE-1** ve **PVSE-2** kodlu moleküllerin stok çözeltisi ise 10-80 mg/mL aralığında saf suda çözümlenerek hazırlandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan galantamin molekülünün stok çözeltisi 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL,

1mg/mL, 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda saf suda çözülerek hazırlandı. Neostigmin etken maddesi için ise 0,1 (100 ppm), 0,25 (250 ppm), 0,50 (500 ppm), 0,75 (750 ppm) ve 1 mg/mL (1000 ppm) konsantrasyonlara denk gelecek şekilde hazır ilaç preparatından (0,5 mg/mL, 500 ppm) hesaplanarak kullanıldı.

BChE enzim aktivite çalışmalarında izlenen çalışma planı Çizelge 2.4'de özetlendi.

Çizelge 2.4. BChE enzimi aktivitesi çalışma şeması

	Tampon (1)	Örnek (2)	Enzim (3)	Saf su (4)	Substrat (5)	DTNB (6)
A ₀ K	400 µL	-	-	1900 µL	100 µL	100 µL
A ₀	400 µL	-	20 µL	1880 µL	100 µL	100 µL
A _i K	400 µL	20 µL	-	1880 µL	100 µL	100 µL
A _i	400 µL	20 µL	20 µL	1860 µL	100 µL	100 µL

Parantez içindeki rakamlar uygulamaların eklenme sırasını vermektedir.

Saf su eklendikten sonra 15 dakika 25 °C da inkübe edildi. Sonra substrat eklenerek enzim ve substratın tepkime vermesi için 15 dakika oda şartlarında bekletildi. Bu sürenin sonunda tepkimeyi durdurmak üzere ortama 1,5 mL % 2 Na₂CO₃ çözeltisi veya saf su eklendi ve üzerine DTNB ilave edildi. Tüpler vortekslendi ve 412 nm de absorbanslar kendi körlerine karşı okundu. Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Alpaslan, 2013).

$$\text{İnhibisyon (\%)} = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

A₀: Örnek olmaksızın ölçülen ortalama absorbansları ve A_i: farklı konsantrasyonlarda test örnekleri eklenerek ölçülen ortalama absorbansları ifade etmektedir.

2.2.6. İstatiksel Analizler

İstatiksel hesaplamalar SPSS 17,0 software programı kullanılarak gerçekleştirildi. Enzim inhibisyonu sonuçları arasındaki istatiksel farklılıkları belirlemek üzere spektroskopide ölçülen absorbans değerlerine one-way variance analyses (ANOVA) uygulandı. Absorbans verileri arasındaki farklılıklar LSD ve DUNCAN testleri kullanılarak belirlendi ve p<0,05 değerleri istatiksel olarak farklı kabul edildi.

Enzim inhibisyon çalışmaları için her bir uygulamanın IC_{50} ve IC_{90} değerleri Microsoft Excel (Windows 2010) programı kullanılarak hesaplandı.



3. BULGULAR

3.1. GC-MS bulguları

P. vera sap kısmından elde edilen hekzan ekstresinin aroma bileşikleri GC-MS de yürütülerek kimyasal bileşenleri kantitatif ve kalitatif olarak analiz edildi. *P. vera*'ın sap kısımları ayrıca headspace GC-MS de yürütülerek uçucu bileşenleri kalitatif ve kantitatif olarak tespit edildi. Bitkinin sap kısmının hekzan ekstresinin ve sap kısımlarının headspace GC-MS spektrumları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 de sunuldu. Her iki örneğin kimyasal bileşimleri ve bağlı yüzdeleri Çizelge 3.1 de özetlendi. Bileşenlerin kimyasal yapıları kütle spektrumlarının kütüphanede (NIST) ve literatürde kütle spektrumlarındaki yarılmaların ve de alıkonma indekslerinin mukayesesine (Adams, 2001) göre yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Sap hekzan ekstresi ve sap uçucu bileşenleri

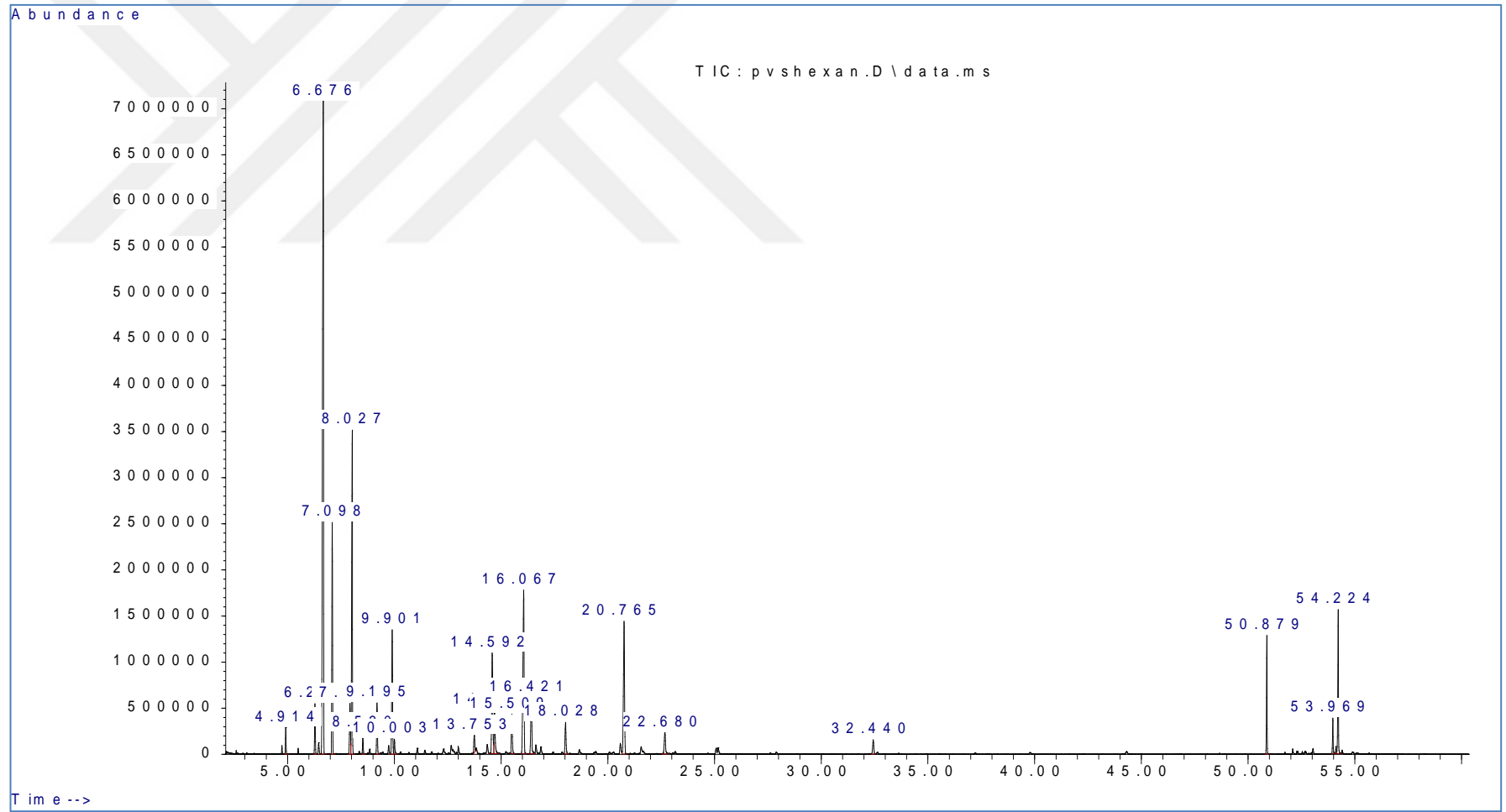
Alıkonma zamanı	Bileşen adı	Hekzan ekstresi (%)	Headspace (%)	Teşhis yöntemi
4,91	<i>o</i> -Ksilen	0,72	-	MS
6,29	Trisiklen	1,55	9,24	GC,MS
6,45	α -Tujen	0,43	0,23	GC,MS
6,67	α-Pinen	29,55	39,03	GC,MS
7,09	Kamfen	7,35	18,36	GC,MS
7,92	Sabinen	1,94	0,78	GC,MS
8,03	β-Pinen	12,09	12,76	GC,MS
8,53	Mirsen	0,72	0,49	GC,MS
9,11	3-Karen	1,80	0,37	GC,MS
9,73	<i>p</i> -Simen	eser	-	GC,MS
9,90	Limonen	4,73	1,11	GC,MS
10,00	1,8-Sineol	0,58	0,62	GC,MS
11,10	γ -Terpinen		0,36	GC,MS
11,42	(<i>Z</i>)-Sabinen hidrat		0,36	GC,MS
12,55	Terpinolen		2,87	GC,MS
12,80	Linalol		0,43	GC,MS
13,75	Etilsikloheksanon*	0,72	-	MS
14,35	<i>trans</i> -Pinokarveol	eser	-	GC,MS
14,60	Kamfor	4,65	3,04	GC,MS
15,50	Borneol	1,78	1,12	GC,MS
15,68	Terpinen-4-ol	-	0,49	GC,MS
16,07	(<i>E</i>)-İzositral	8,50	-	GC,MS
16,42	<i>p</i> -Simen-8-ol	2,69	-	GC,MS
16,64	α -Terpineol	eser	0,40	GC,MS
16,87	Mirtenol	eser		GC,MS
18,03	<i>trans</i> -Karveol	1,41	-	GC,MS

20,59	Borneol format	0,56	-	MS
20,77	Borneol asetat	6,41	4,62	GC,MS
32,44	Spathulenol	0,72	-	GC,MS
Gruplandırılmış bileşenler				
	Monoterpen hidrokarbonlar (%)	60,16	85,60	
	Oksijenli monoterpenler (%)	26,58	11,08	
	Seskiterpen hidrokarbonlar (%)	-	-	
	Oksijenli seskiterpenler (%)	0,72	-	
	Diğer bileşenler (%)	1,44	-	
	Toplam teşhis edilenler (%)	88,90	96,68	
	Toplam Teşhis edilemeyenler (%)	11,10	3,32	

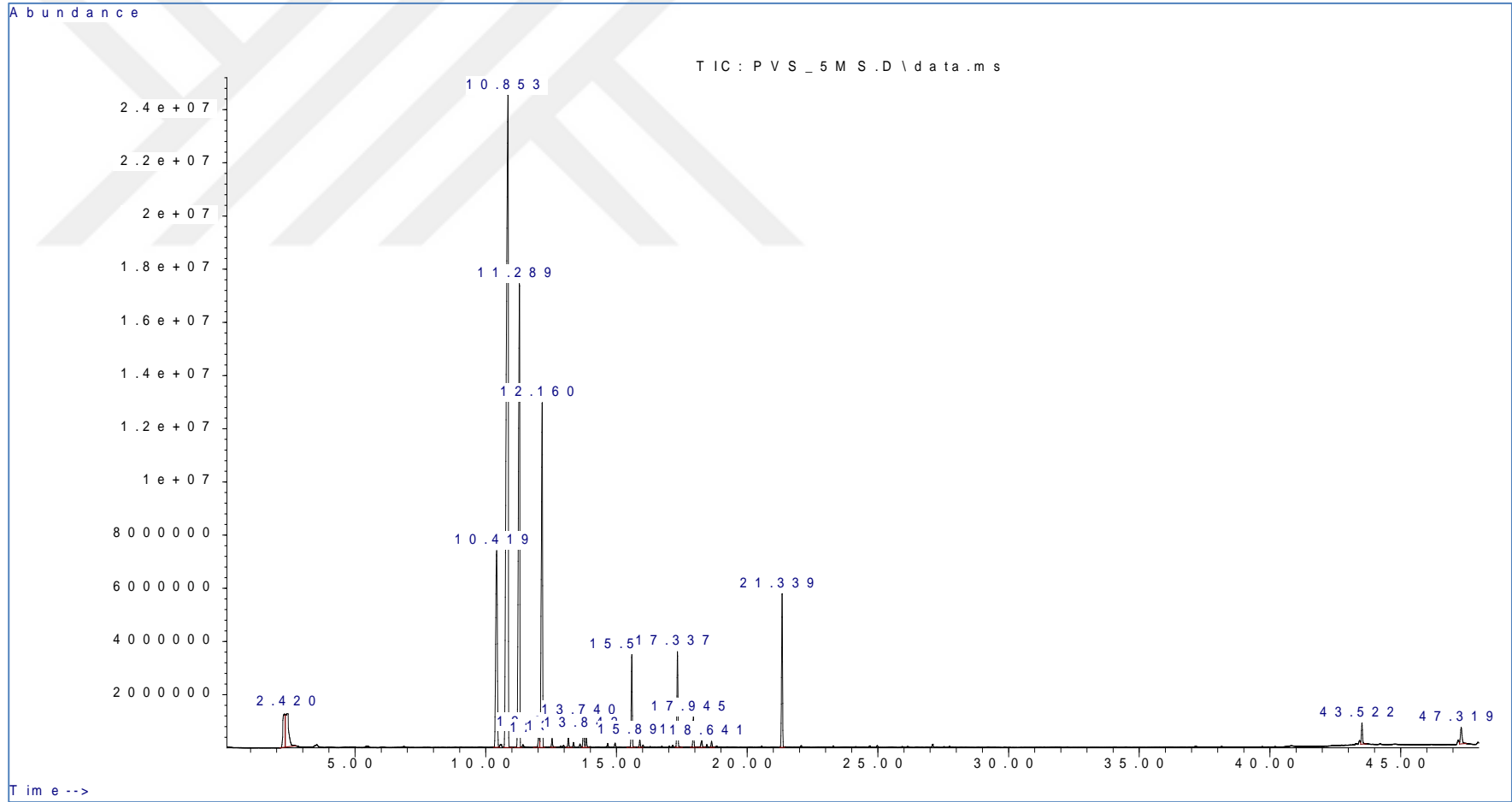
*:Gerçek izomer belirlenemedi.

P. vera' in sap kısımlarının hekzan ekstresinin aromasında toplam 29 bileşen tespit edildi. Bu bileşenlerin 24 adedinin kimyasal yapısı belirlenmiş olup teşhis edilenlerin bağıl oranı toplam yağın % 88,90'lık kısmına tekabül etmektedir. *P. vera*' nın sap kısımlarının hekzan ekstresinin ana bileşenleri α -pinen (% 29,54), β -pinen (% 12,01), (*E*)-izositral (% 8,50), kamfen (% 7,35), borneol asetat (% 6,41), limonen (% 4,73) ve kamfor (% 4,65) olarak belirlendi. Bu bileşenler toplam yağın % 73,19 kısmına tekabül emektedir. Çizelge 3.1'den görüleceği üzere sap hekzan ekstresi monoterpenler bakımından (% 86,74) özellikle monoterpen hidrokarbonlar bakımından (% 60,16) oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir. Hekzan ekstresinin seskiterpenler bakımından ise oldukça fakir olduğu (% 0,72) tespit edildi.

P. vera sap kısmın headspace GC-MS spektrumunda toplam 23 bileşen tespit edilmiş olup bu bileşenlerden 19'u teşhis edilmiştir. Hoş kokulu olan sap kısmın headspace GC-MS analizinde daha uçucu olan monoterpen hidrokarbonlar hekzan ekstresine nazaran daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Monoterpen hidrokarbonların oranı toplam aroma maddelerin %85,60'ına tekabül etmektedir. Diğer taraftan hekzan ekstresinin bileşenleri sap aroma bileşenlerine oldukça fazla benzemektedir. Her iki kısım da hemen hemen aynı bileşenleri içermekte olup sadece bağıl oranları değişmektedir. Ancak hekzan ekstresinde tespit edilen (*E*)-izositral (% 8,50) headspace analizde tespit edilemedi. Çizelge 3.1'den görüleceği üzere sap aroma bileşenlerinde α -pinen (% 39,03), kamfen (% 18,36), β -pinen (% 12,76), trisiklen (% 9,24), borneol asetat (% 4,62), kamfor (% 3,04) ve terpinolen (% 2,87) ana bileşenleri olarak tespit edildi.



Şekil 3.1. Sap heksan ekstresinin GC-MS kromatogramı



Şekil 3.2. Sap kısmın headspace GC-MS kromatogramı

3.2. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektroskopik Bulgular

Antep fıstığının cumba sap kısmının kloroform ve etanol ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan ve **PVSC-1**, **PVSC-2**, **PVSC-3**, **PVSC-4**, **PVSE-1** ve **PVSE-2** olarak kodlanan farklı miktarlarda toplamda 5 madde saflaştırıldı. Saflaştırılan metabolitlerin İTK da farklı hareketli faz sistemlerindeki Rf değerleri hesaplandı ve Çizelge 3.2’de sunuldu. Spektroskopik yöntemlerle elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucu **PVSC-1** ve **PVSC-2** moleküllerinin aynı kimyasal yapıya sahip maddeler olduğu tespit edildi. Maddelerin aynı Rf değerine sahip olması da bunu doğrulamaktadır.

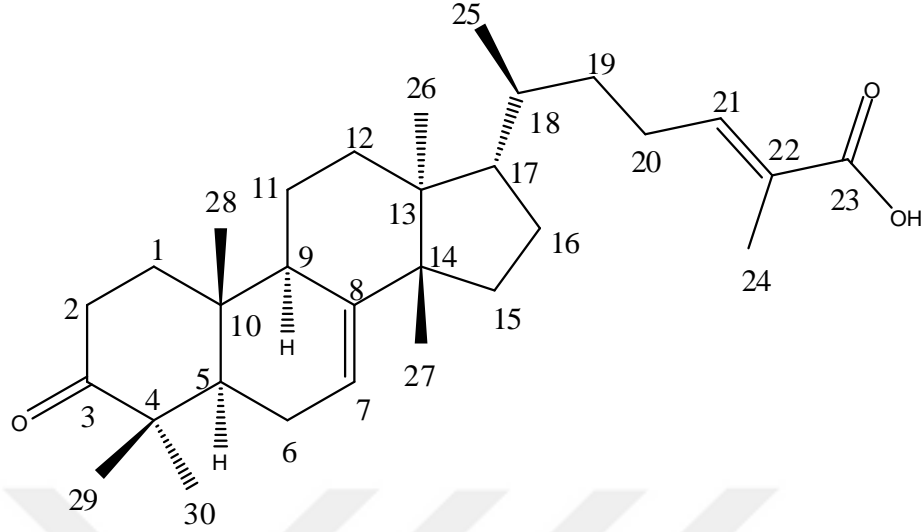
Çizelge 3.2. Saf metabolitlerin farklı çözücü sistemlerindeki Rf değerleri

Madde	Hekzan-EtOAc	Hekzan-EtOAc	CHCl ₃ -EtOAc
	(9:1)	(8:2)	(8:2)
PVSC-1	0,22	0,40	0,66
PVSC-2	0,22	0,40	0,66
PVSC-3	0,46	0,54	0,74
PVSC-4	0,12	0,24	0,38

Madde	EtOAc-MeOH	EtOAc-MeOH	CHCl ₃ -MeOH
	(8:2)	(6:4)	(7:3)
PVSE-1	0,22	0,52	0,20
PVSE-2	0,42	0,82	0,48

Bu bölümde saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapılarını aydınlatmaya yönelik olarak alınan, FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D- ve 2D-NMR spektroskopik yöntemleri ile elde edilen spektroskopik veriler değerlendirildi. Spektroskopik yöntemlerden elde edilen spektrumlar şekiller ile gösterildi.

3.2.1. Mastikadienonik asit (3-Oksolanosta-7,24Z-dien-26-oik asit **PVSC-1** ve **PVSC-2**)

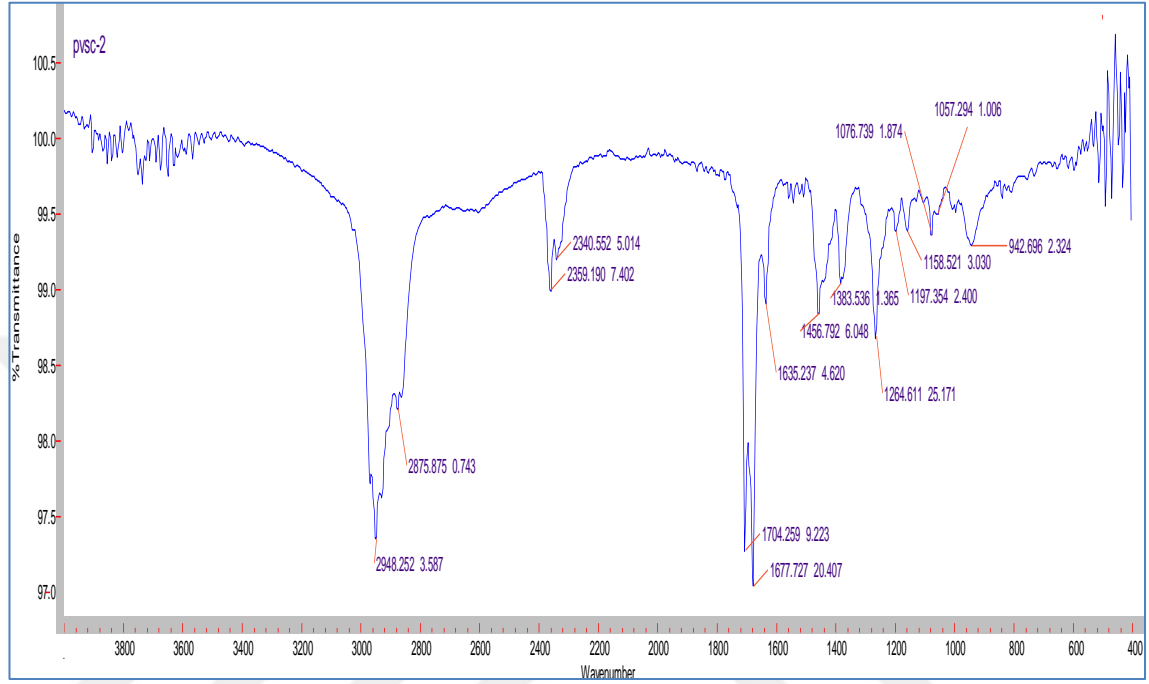


C₃₀H₄₆O₃, Mol Kütlesi: 454,68 g/mol

PVSC-1 ve **PVSC-2** kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemleri esnasında hekzan-EtOAc (9:1 ve 8:2) çözücü karışımı içerisinde, hızlı bir şekilde kendiliğinden kristallendikleri gözlemlendi. Farklı fraksiyonlarda farklı kristal yapılarından dolayı farklı moleküller olabileceği düşünülerek farklı kodlar kullanıldı. Ancak her iki maddenin FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D- (DEPT 135, DEPT-90) ve 2D-NMR (¹H, ¹H-COSY, HMQC ve HMBC) spektral verileri bu maddelerin aynı madde olduğunu gösterdi. Madde İTK'da görünür ışıkta ve UV₂₅₄ nm de renksiz iken H₂SO₄-vanilin (%1) reaktifi püskürtüldükten ve 105 °C'da ısıtıldıktan sonra kırmızı-mor renk vermektedir. Maddenin H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi ile kırmızı-mor leke vermesi maddenin terpenik veya steroidal bir yapıya sahip olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Bladt, 1996).

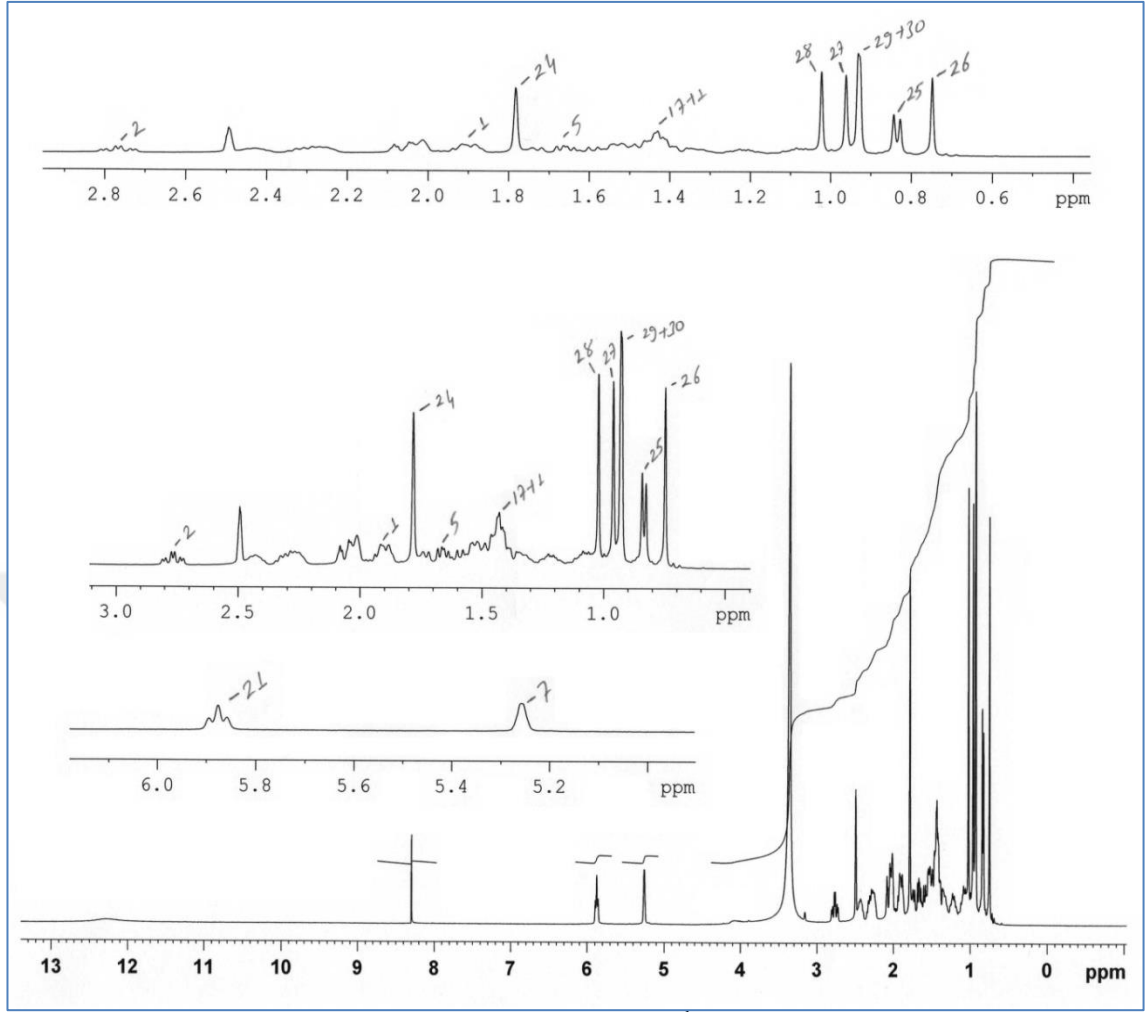
PVSC-1 ve **PVSC-2** bileşiğinin kimyasal yapısı FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC ve ¹H, ¹H-COSY spektrumları yorumlanması ile *Pistacia* türleri için karakteristik bir triterpen olan **mastikadienonik asit** olarak aydınlatıldı. Bileşiğin kimyasal yapısı ayrıca HMBC spektrumu ve daha önce yayınlanmış spektral verilerle de doğrulandı (Bozorgi ve ark., 2013; Nicholson ve ark., 2011). Bileşiğin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak molekülün FTIR spektrumunda (Şekil 3.3) karboksilik asit grubuna ait –OH titreşim bandı iyi gözlemlenemedi. Diğer taraftan 1704,0 cm⁻¹ (keton karbonil grubu) ve 1682,3 cm⁻¹ (karboksilik asit karbonil grubu) de gözlenen iki güçlü C=O titreşim bandı molekül

yapısı ile uyumlu olup molekülde iki adet karbonil grubu olduğuna işaret etmektedir. Alifatik –CH titreşim bantları 2947-2875 cm^{-1} aralığında ve alifatik C-C titreşim bantları ise 1400-1200 cm^{-1} aralığında gözlemlendi (Erdik, 1998; Fessenden and Fessenden, 2001) .



Şekil 3.3. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) IR spektrumu (ATR)

PVSC-1 ve 2 molekülüne ait olan $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan (Şekil 3.4) görüleceği üzere bir triterpen yapısına uygun olarak altı adet *s* metil sinyali bir adet de *d* metil sinyali gözlemlenmiş olup molekülde yedi adet –CH₃ grubu bulunduğu işaret etmektedir. Metil gruplarına ait *s* sinyaller $\delta=0,75$ ppm (H-26), $\delta=0,93$ ppm (H-29 ve H-30), $\delta=0,96$ ppm (H-27), $\delta=1,03$ ppm (H-28) ve $\delta=1,71$ ppm (H-24) de gözlemlenmiştir. Olefinik bağın etkisinden dolayı H-24 metil sinyali diğer metil grubu sinyallerine göre daha aşağı alanda ($\delta=1,71$ ppm) gözlemlenmiştir. $\delta=0,84$ ppm de gözlenen *d* sinyal ($J=6,28$ Hz) ise H-25 metil grubuna ait sinyaldir. Olefinik H-7 ve H-21 sinyalleri ise $\delta=5,26$ ppm ve $\delta=5,90$ ppm de sırasıyla geniş *s* ve *t* ($J=7,24$ Hz ve $J=7,20$ Hz) sinyaller olarak gözlemlenmiştir. Karbonil karbonuna komşu iki nolü karbona ait –CH₂ sinyalleri diastropik özellik göstererek (10 nolü kiral C atomundan dolayı) $\delta=2,77$ ppm de *dt* ($J_1=14,55$ Hz ve $J_1=14,40$ Hz $J_2=5,36$ Hz, $J_2=5,40$ Hz, $J_2=5,25$ Hz) vermiştir.

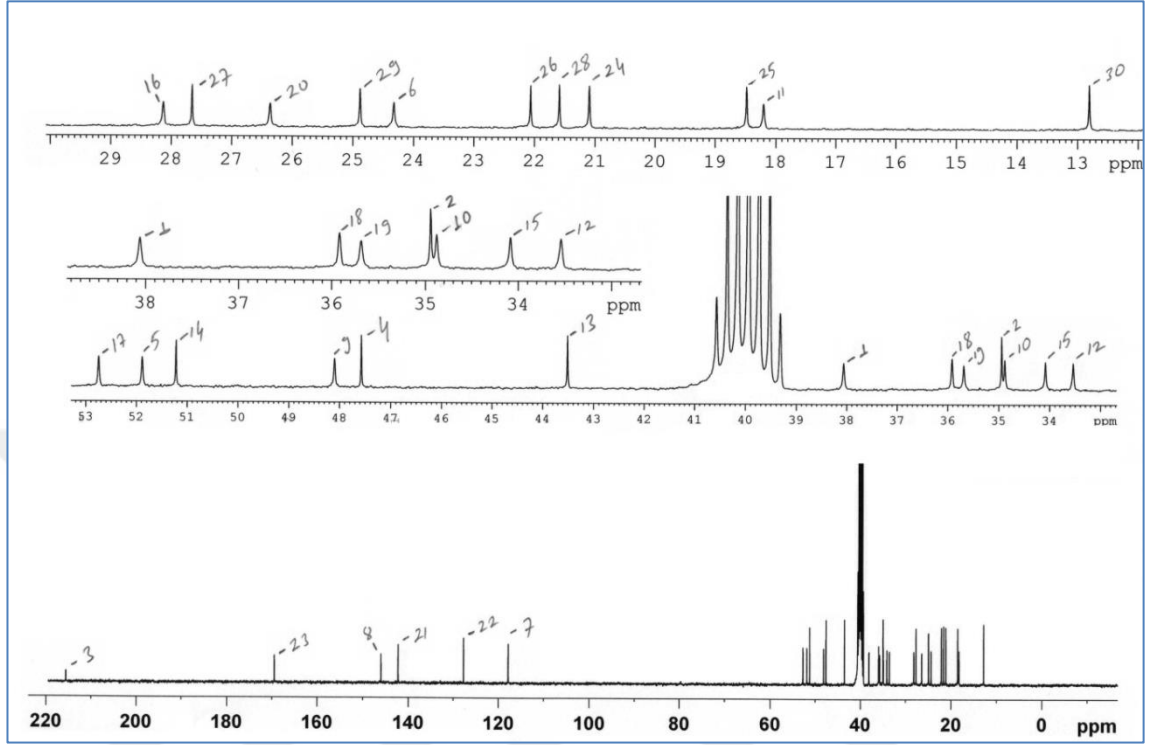


Şekil 3.4. Mastikadienonik asidin (**PVSC-1** ve **2**) ^1H -NMR spektrumu (DMSO-d_6)

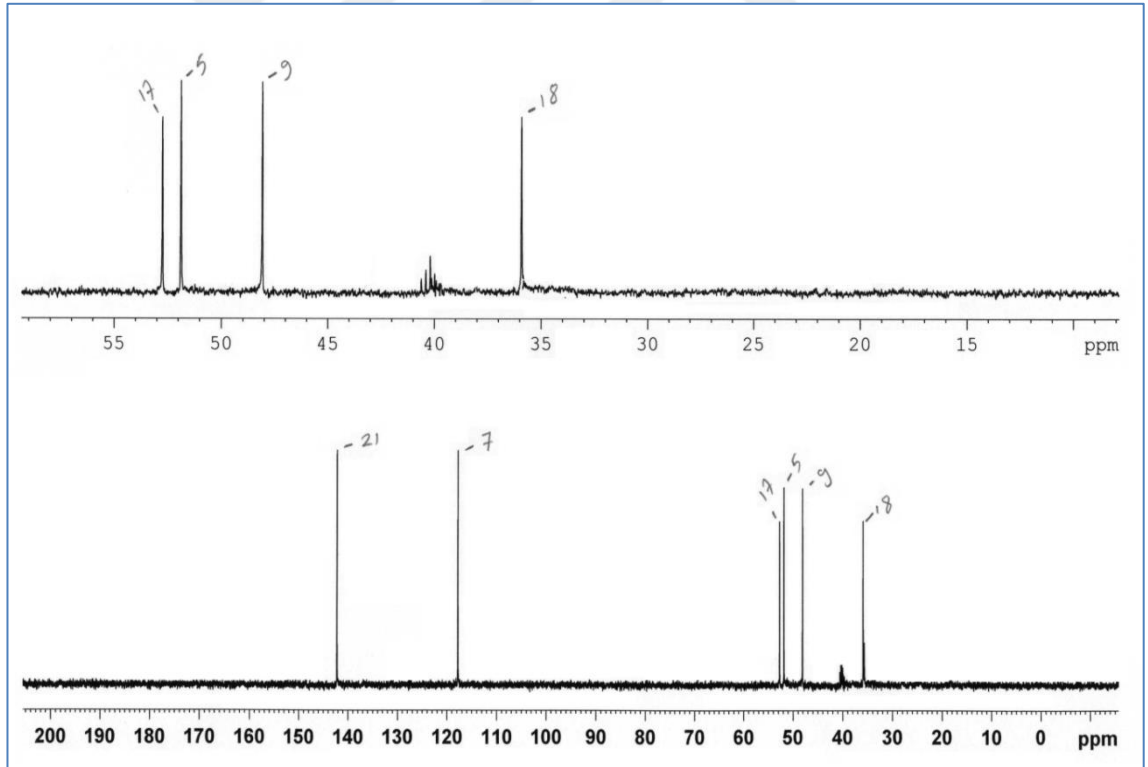
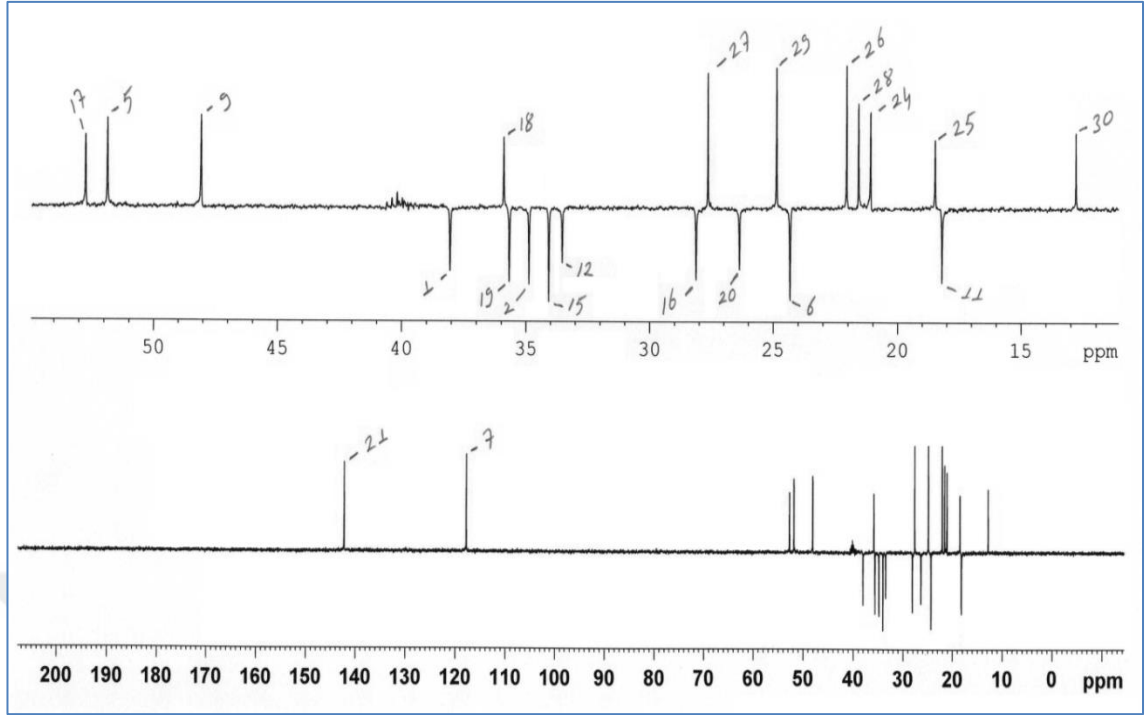
Mastikadienonik asit olarak karakterize edilen **PVSC-1** ve **2** molekülünün ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.5) önerilen yapıya uygun olarak toplam 30 adet C sinyali gözlemlendi. Moleküldeki karboksilik asidin C sinyali (C-23) $\delta=169,5$ ppm de rezonans olurken, keton karbonil karbonuna ait (C-3) sinyal ise $\delta=215,6$ ppm de tespit edildi. Moleküldeki olefinik C-7, C-8, C-21 ve C-22 sinyalleri sırasıyla $\delta=117,8$, $\delta=146,0$, $\delta=142,3$ ve $\delta=127,7$ ppm de gözlemlenmiştir. Moleküldeki diğer alifatik C atomları da $\delta=10-55$ ppm aralığında rezonans olmuşlardır.

Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**) molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.6) molekül yapısına uygun olarak 9 adet metilen C sinyali (C-1, C-2, C-6, C-11, C-12, C-15, C-16, C-19 ve C-20), 6 adet metin C sinyali (C-5, C-7, C-9, C-17, C-18 ve C-21) ve 7 adet de metil C sinyali (C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 ve C-30) gözlemlendi. Mastikadienonik asit molekülünün (**PVSC-1** ve **2**) ^1H - ^1H COSY

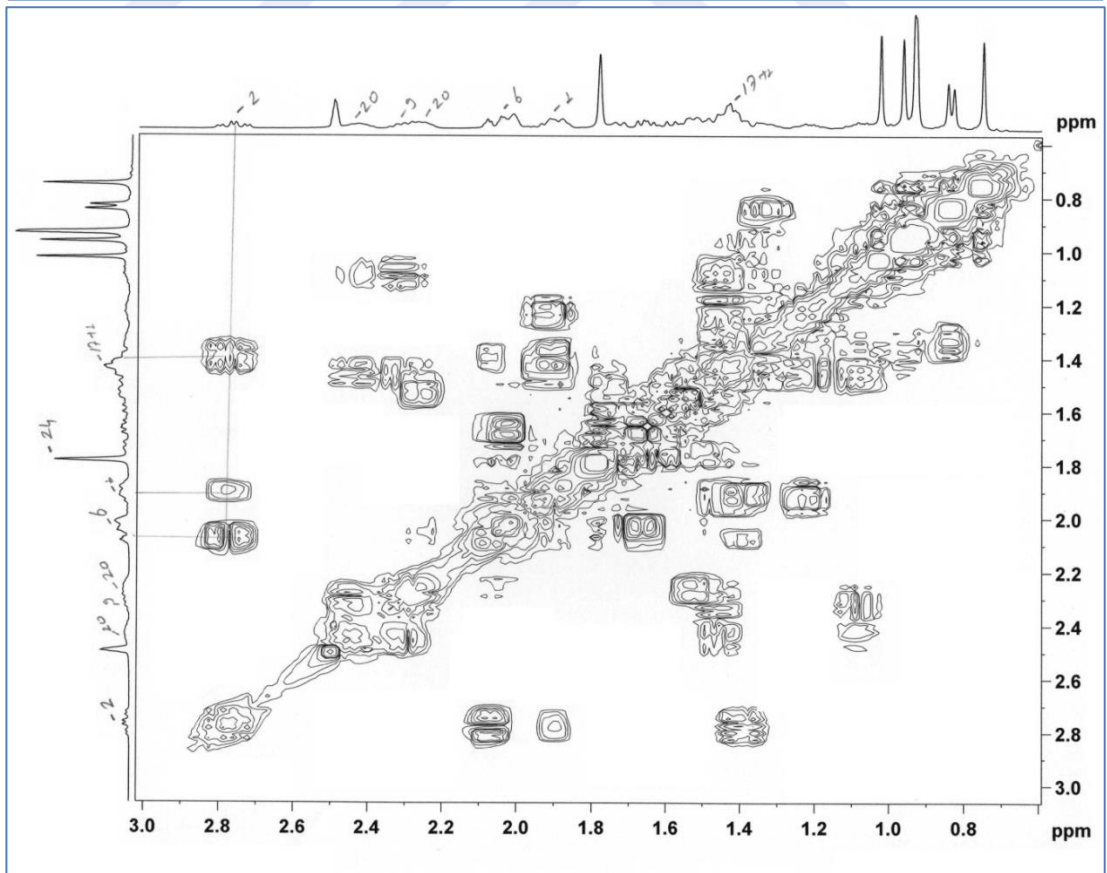
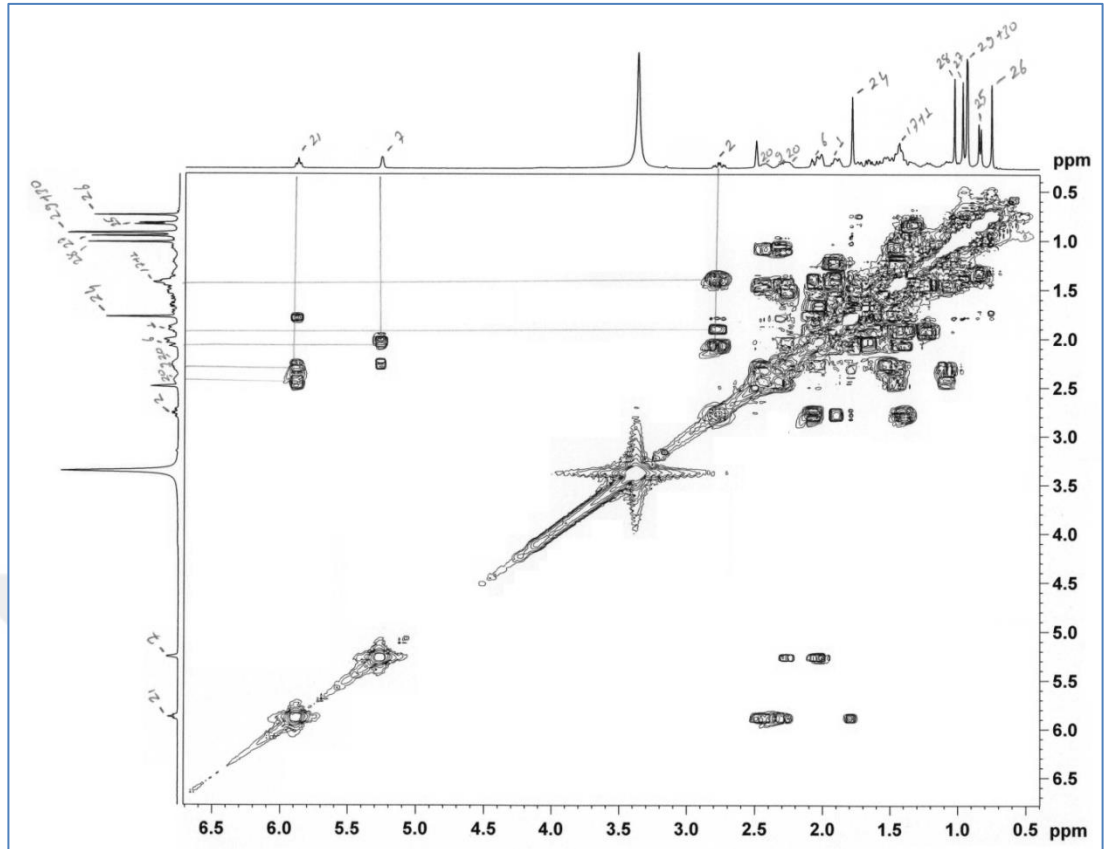
(Şekil 3.7), HMQC (Şekil 3.8) ve HMBC (Şekil 3.9) spektrumlarında gözlenen tüm korelasyonlar önerilen kimyasal yapı ile tam bir uyum halindedir.



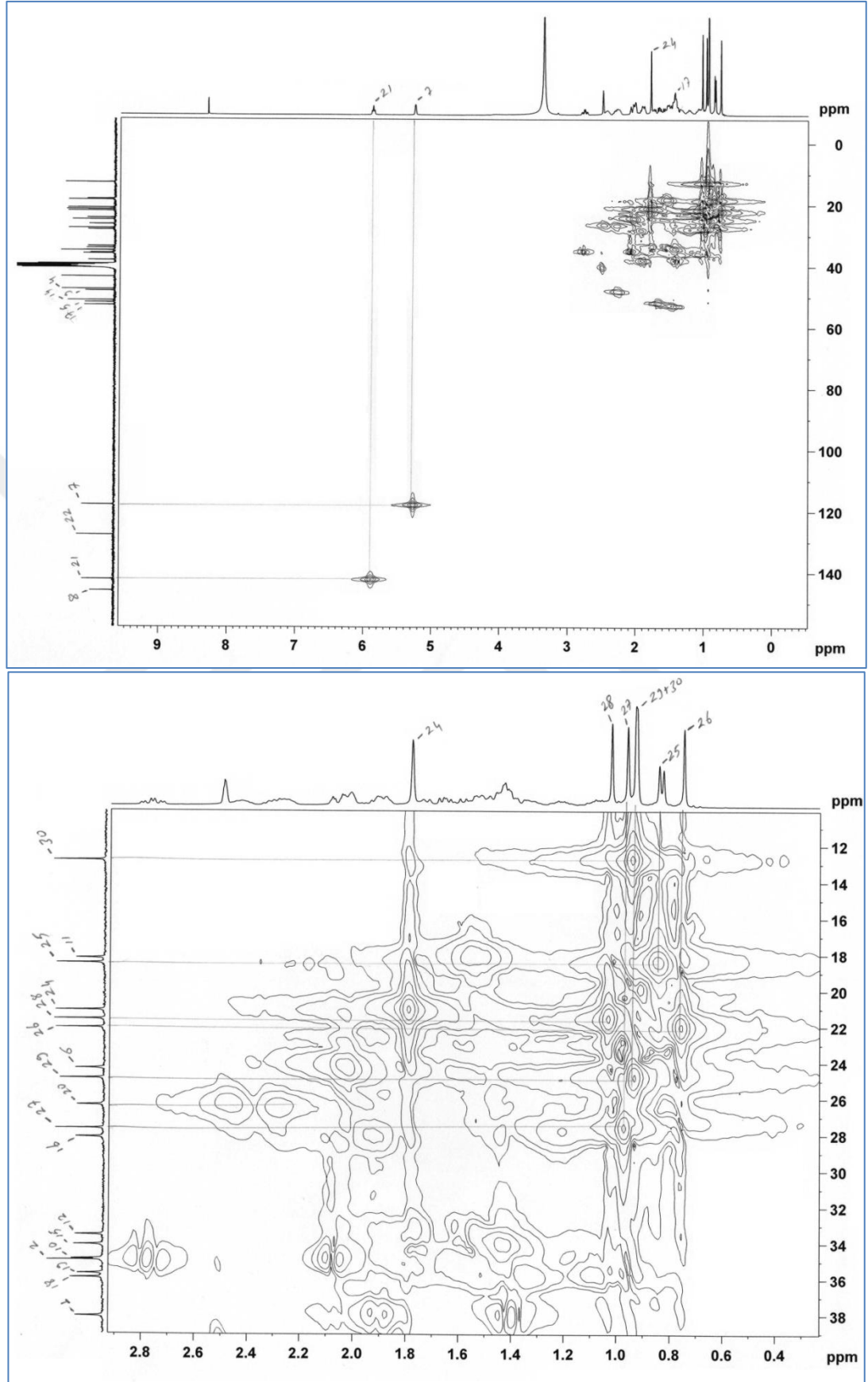
Şekil 3.5. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)



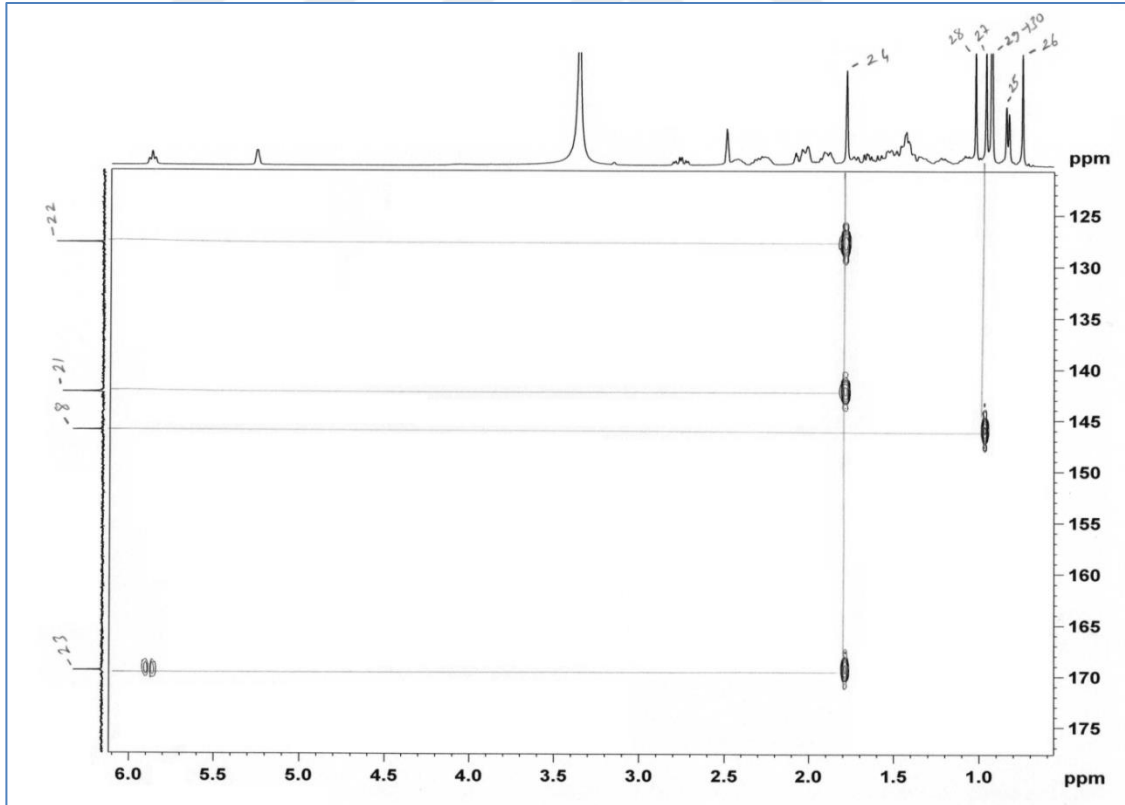
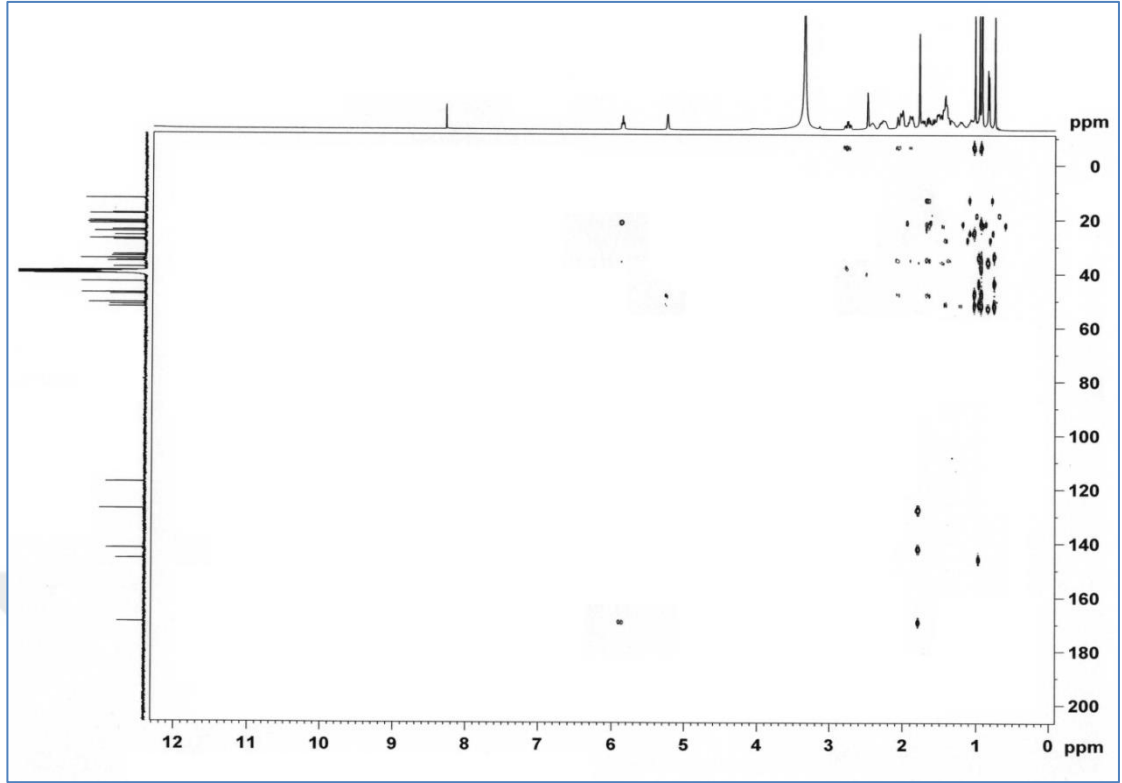
Şekil 3.6. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO-d₆)



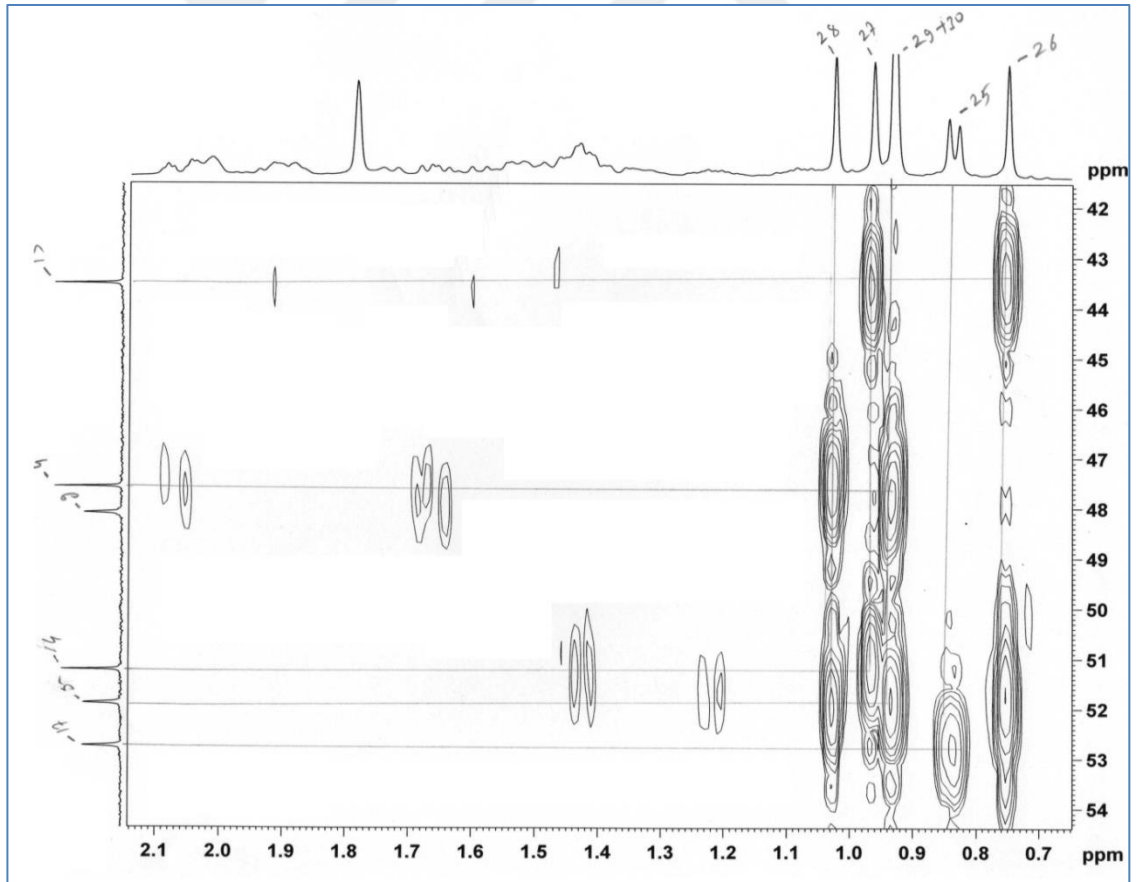
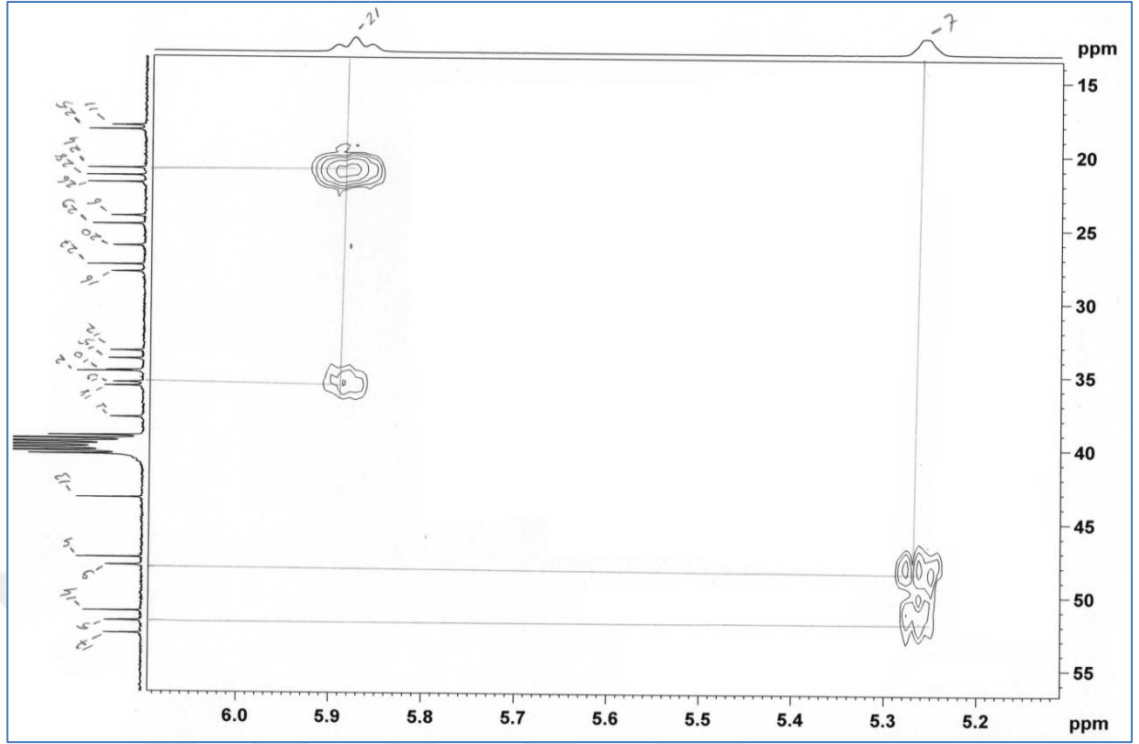
Şekil 3.7. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 3.8. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMQC spektrumu (DMSO-d₆)

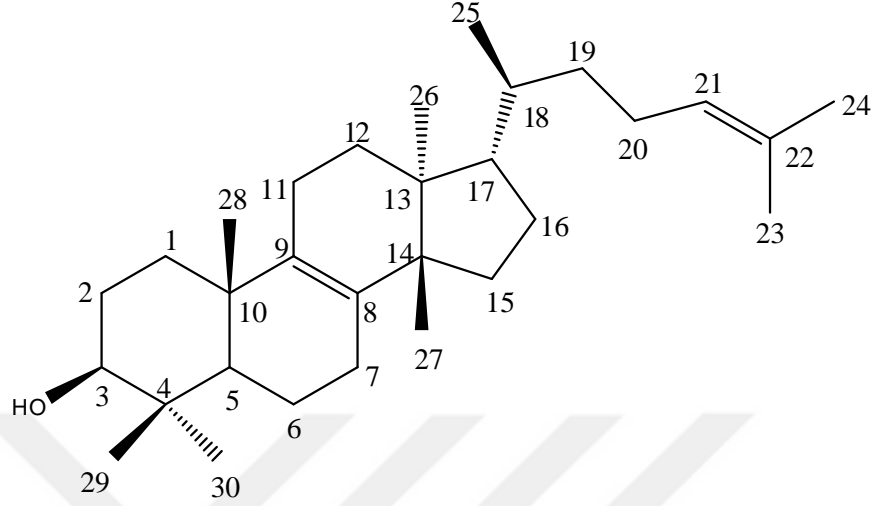


Şekil 3.9. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMBC spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 3.9. Mastikadienonik asidin (PVSC-1 ve 2) HMBC spektrumu (DMSO-d₆) (devamı)

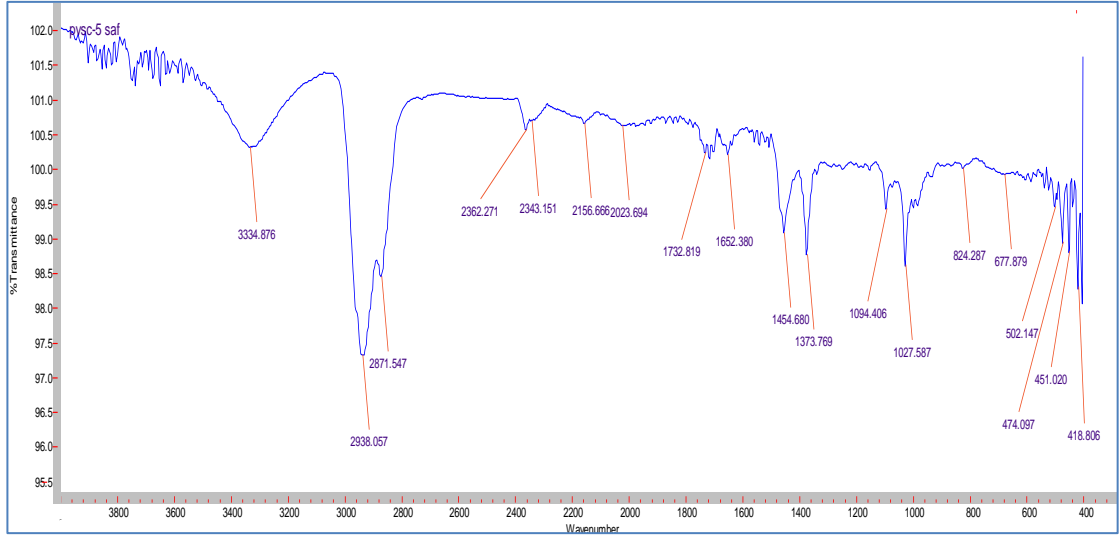
3.2.2. Tirukallol (Eupha-8,24-dien-3-ol, PVSC-3)



C₃₀H₅₀O, Mol Kütlesi: 426,72 g/mol

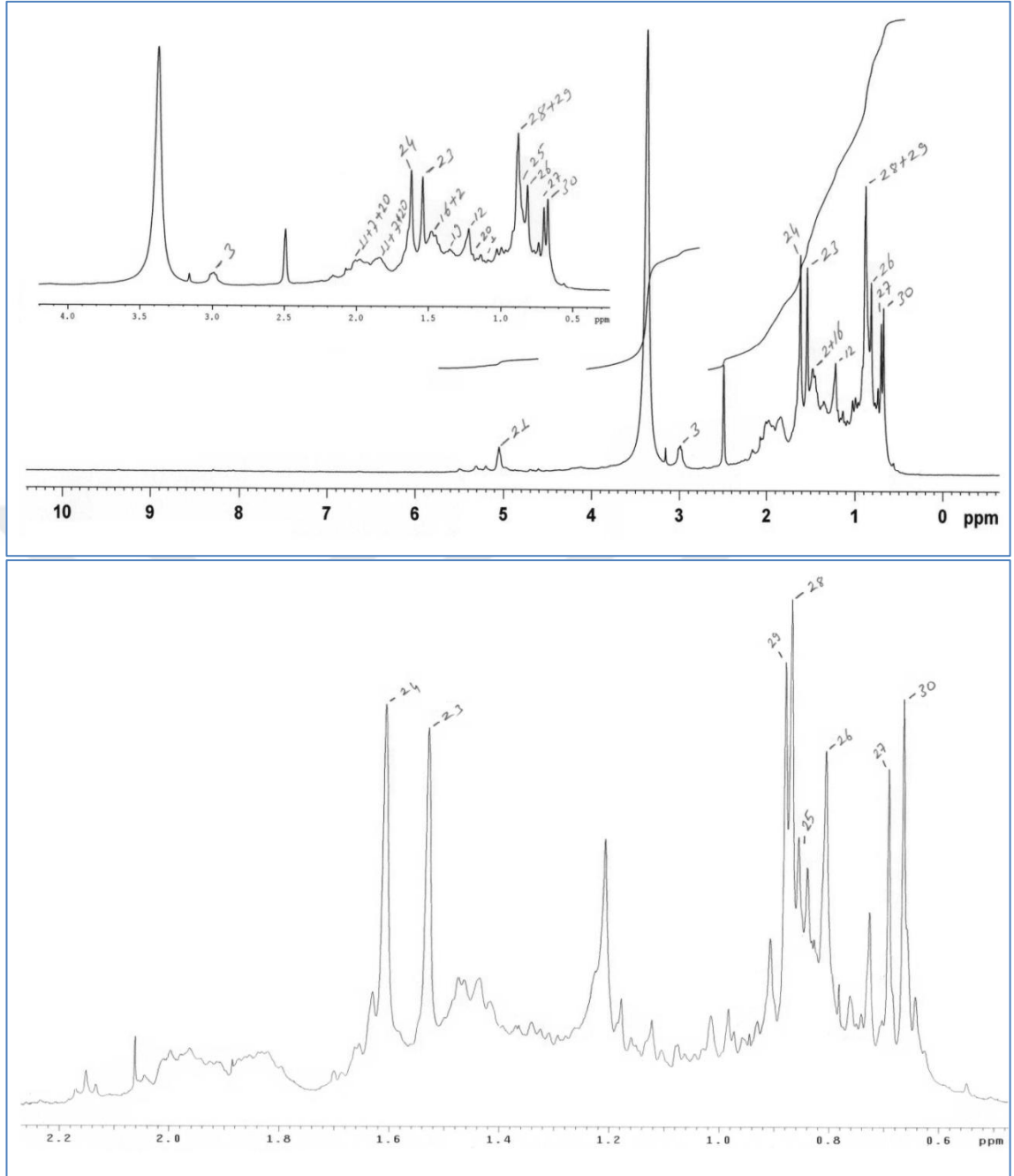
PVSC-3 molekülü kromatografik çalışmalar ile katı amorf halde saflaştırıldı. **PVSC-3** de daha önce saflaştırılan moleküller gibi İTK'da görünür ışıkta ve UV₂₅₄ nm de renksiz iken H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi püskürtüldükten ve 105 °C'da ısıtıldıktan sonra kırmızı-mor renk vermektedir. Maddenin H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi ile kırmızı-mor leke vermesi **PVSC-3**'ün terpenik veya steroidal bir yapıya sahip olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Blatt, 1996).

PVSC-3 molekülünün kimyasal yapısı FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC ve ¹H,¹H-COSY spektrumları yorumlanması ile *Pistacia* türleri için karakteristik triterpenlerden birisi olan ve iskelet yapısı diğer triterpenlerle aynı olan **tirukallol** olarak aydınlatıldı. Bileşiğin kimyasal yapısı ayrıca HMBC spektrumu ve daha önce yayınlanmış spektral verilerle de doğrulandı (Siddiqui ve ark., 1985; Xu ve ark., 2000; Loizou ve ark., 2009; Fernandez-Arche ve ark., 2010; Bozorgi ve ark., 2013). Bileşiğin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak molekülün FTIR spektrumunda (Şekil 3.10) 3304,9 cm⁻¹ de -OH titreşim bandı, 2938 cm⁻¹ ve 2871,6 cm⁻¹ de alifatik -CH titreşim bantları, 1400-1200 cm⁻¹ aralığında alifatik C-C titreşim bantları ve 1027,6 cm⁻¹ de ise C-O bağı titreşim bantları gözlemlendi (Erdik, 1998; Fessenden and Fessenden, 2001).



Şekil 3.10. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün FTIR spektrumu (ATR)

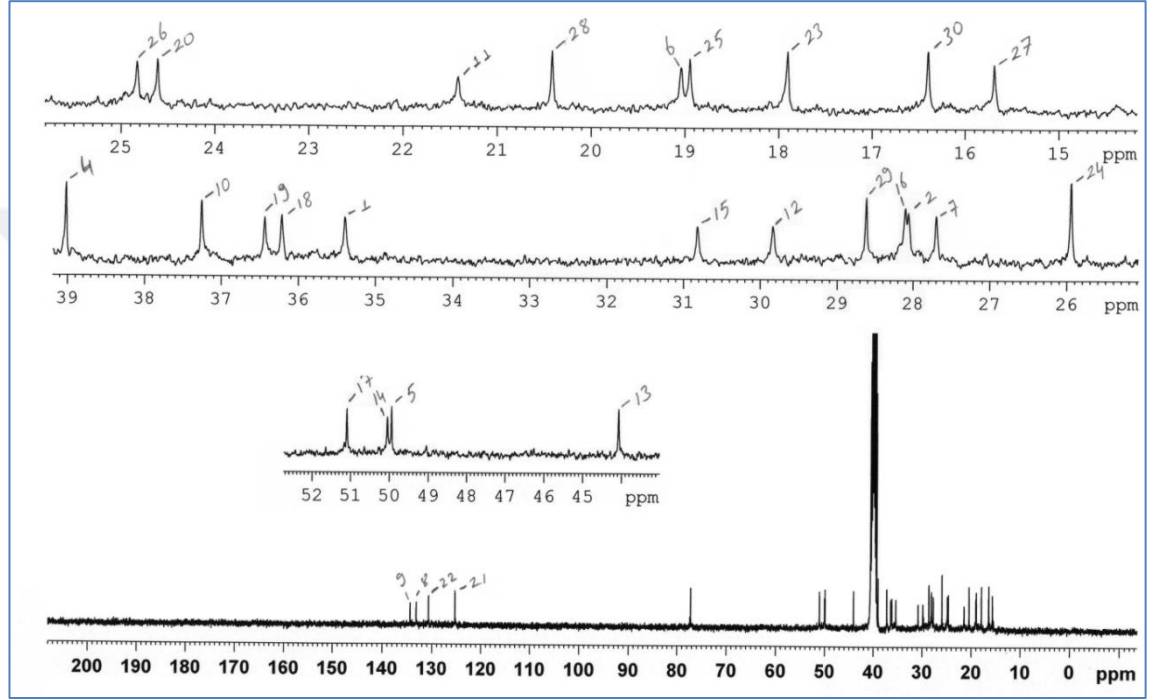
İTK'da reaktif püskürtükten sonra bir triterpen olabileceği düşünülen **PVSC-3** molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu da (Şekil 3.11) bir triterpen olduğunu doğrulamaktadır. Molekülün $^1\text{H-NMR}$ spektrumundan (Şekil 3.11) görüleceği üzere bir triterpen yapısına uygun olarak yedi adet *s* metil sinyali bir adet de *d* metil sinyali gözlemlenmiş olup molekülde yedi adet $-\text{CH}_3$ grubu bulunduğu işaret etmektedir. Bu sinyaller **PVSC-3** molekülünün de bir tirucallane iskeleti içeren bir molekül olduğunu doğrulamaktadır. Metil gruplarına ait *s* sinyaller $\delta=0,68$ ppm (H-30), $\delta=0,71$ ppm (H-27), $\delta=0,82$ ppm (H-26), $\delta=0,88$ ppm (H-28 ve H-29), $\delta=1,54$ ppm (H-23) ve $\delta=1,62$ ppm (H-24) de gözlemlenmiştir. H-23 ve H-24 metil grupları ikili bağın etkisinden dolayı diğer metil gruplarına nazaran daha aşağı alanda ($\delta=1,62$ ppm ve $\delta=1,54$ ppm) rezonans olmuşlardır. Diğer moleküllerde olduğu gibi $\delta=0,85$ ppm de gözlenen *d* sinyal ($J=6,60$ Hz) beklenildiği gibi H-25 metil grubuna ait sinyaldir. İkili bağa komşu olan, 7, 11 ve 20 nolu $-\text{CH}_2-$ hidrojenlerine ait rezonans sinyaller ise daha aşağı alanda, $\delta=1,80$ - $2,02$ ppm aralığında gözlemlenmiştir. H-3 hidrojeni ise O atomunu indüktif etkisinin bir sonucu olarak $\delta=3,38$ ppm de *m* vererek rezonans olmuştur.



Şekil 3.11. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (DMSO-d_6)

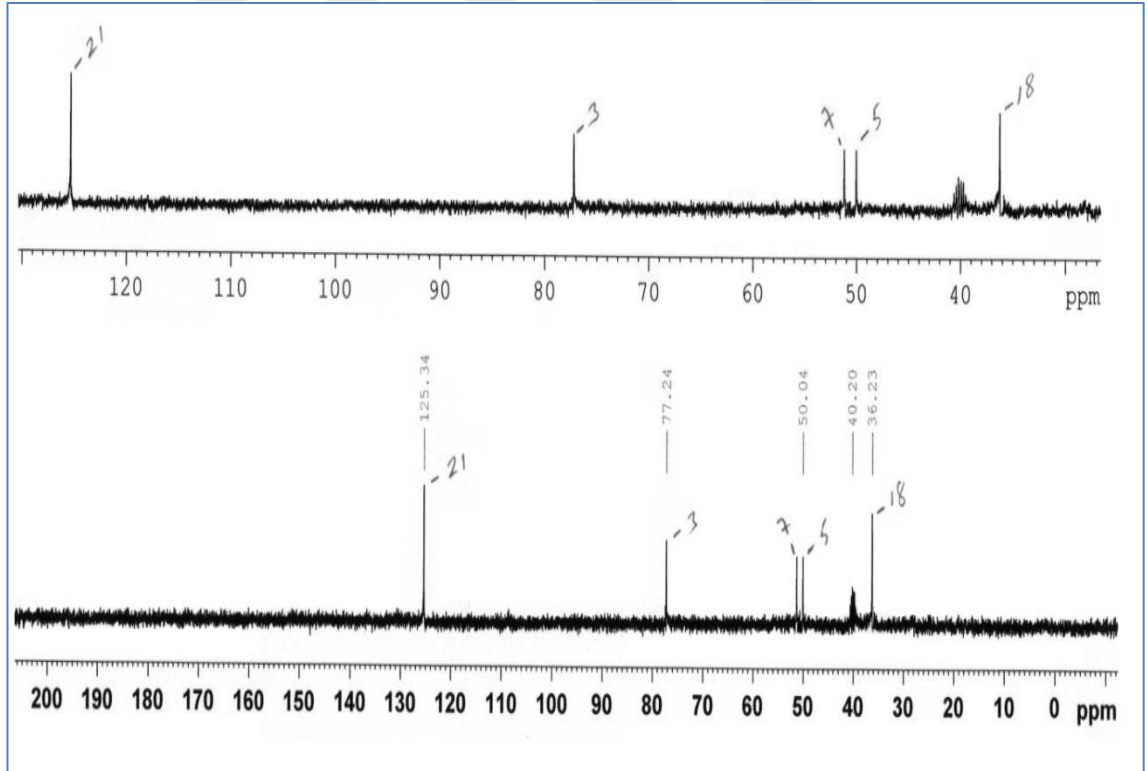
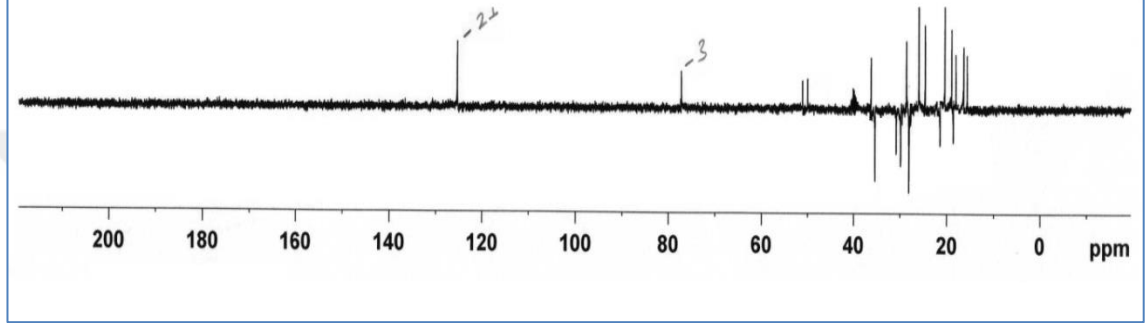
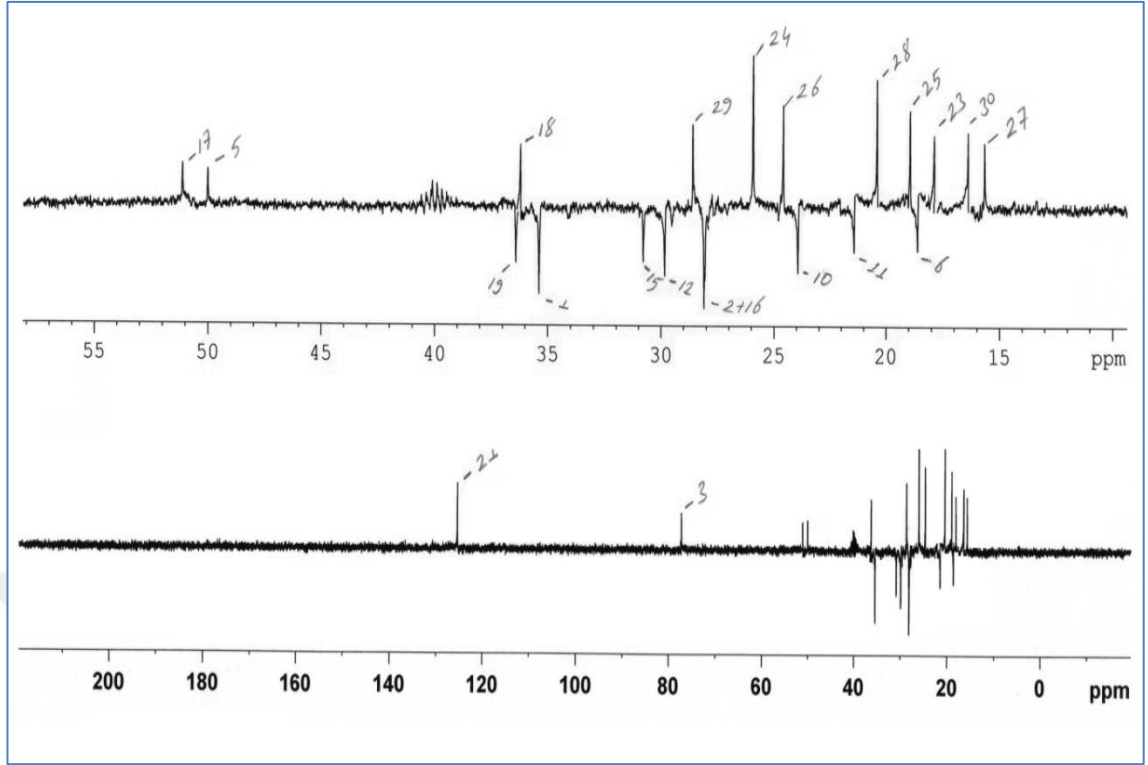
Kimyasal yapısı tirukallol olarak karakterize edilen **PVSC-3** molekülünün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.12) bir triterpen yapısından beklenileceği gibi toplam 30 adet C sinyali tespit edildi. Diğer moleküllerde gözlemlenen aşağı alandaki (yaklaşık olarak $\delta=170$ ppm civarı) C sinyalinin gözlenmemesi molekülün karboksilik asit grubu içermediğine işaret etmektedir. Bu durum tirucallane iskeletinde 23 nolu karbonun biyosentetik olarak karboksilik asit grubuna yükseltgenmediğini ve metil grubu olarak kaldığını göstermektedir. Molekülün $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 3.11) spektrumundaki fazladan bir

metil sinyali de (H-23, $\delta=1,54$ ppm) bu bilgiyi doğrulamaktadır. Sırasıyla $\delta=134,4$ ppm (C-9), $\delta=133,2$ ppm (C-8), $\delta=130,7$ ppm (C-22) ve $\delta=125,3$ ppm (C-21) de gözlenen 4 adet sinyal molekülün önerilen yapısına uygun olarak iki adet ikili bağ içerdiğini göstermektedir. Moleküldeki C-3 rezonans sinyali O atomunun indüktif etkisinden dolayı $\delta=77,3$ ppm de gözlemlenirken, diğer alifatik C atomları $\delta=10-55$ ppm aralığında rezonans olmuşlardır.

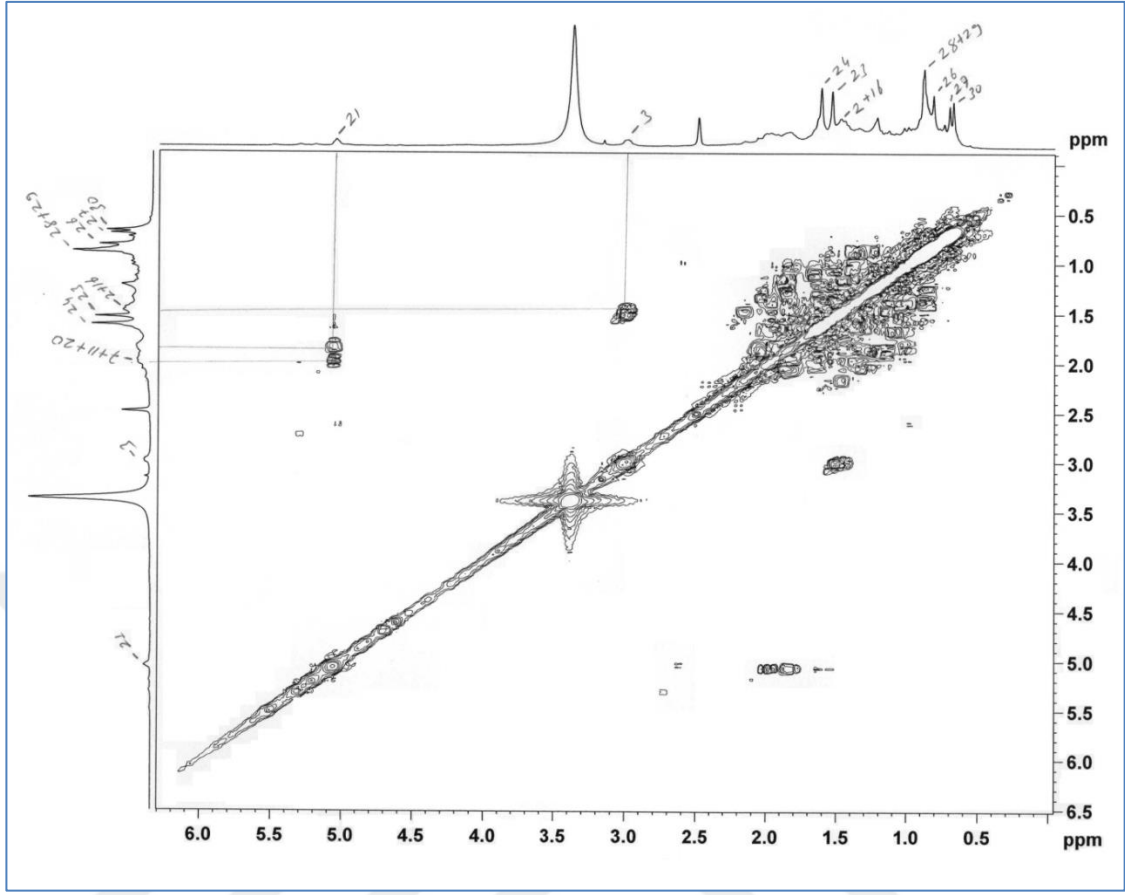


Şekil 3.12. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)

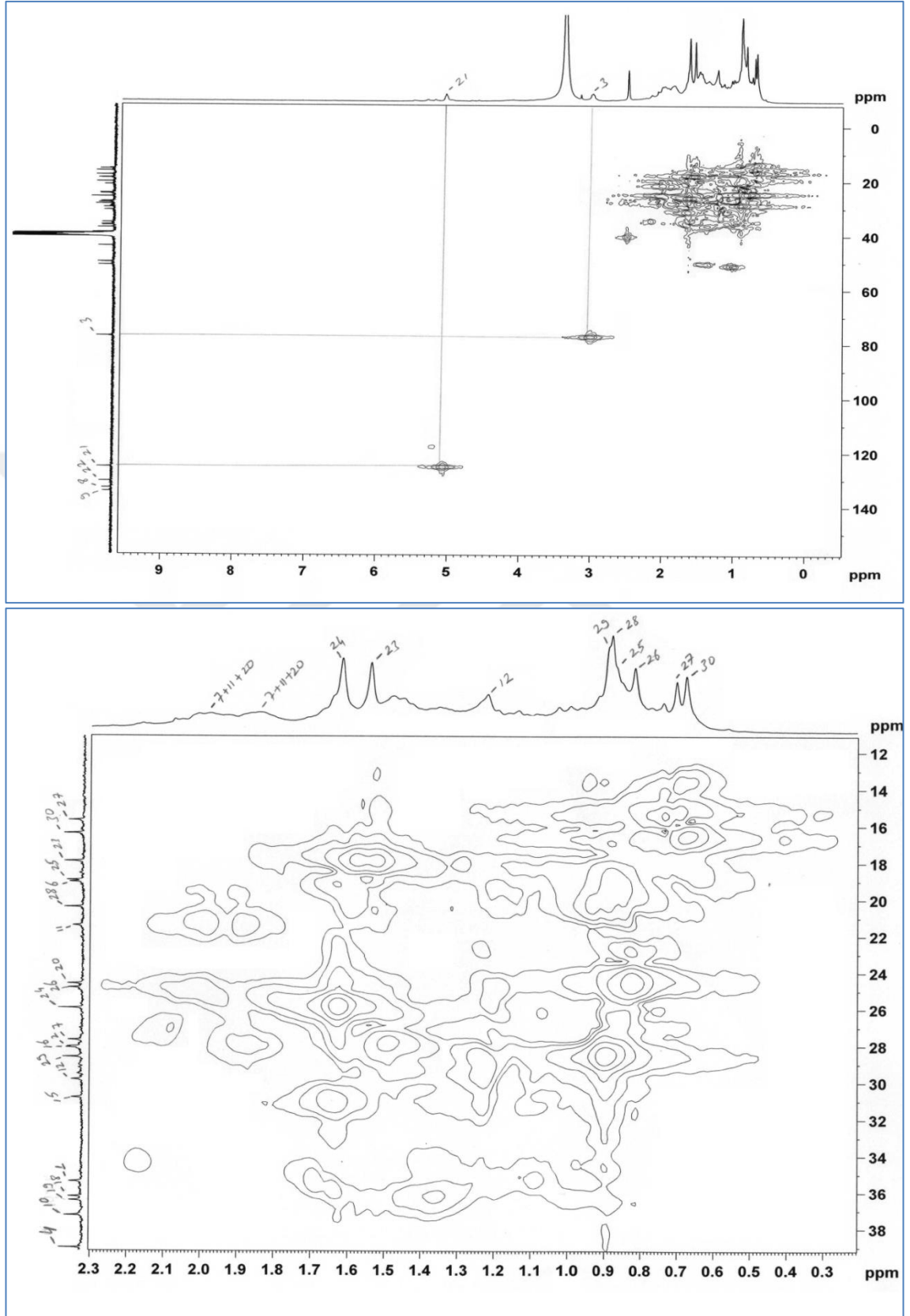
Tirukallol molekülünün (PVSC-3) DEPT-135 ve DEPT-90 ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.13) molekül yapısına uygun olarak 10 adet metilen ($-\text{CH}_2-$) sinyali (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-15, C-16, C-19 ve C-20), 5 adet metin ($-\text{CH}-$) sinyali (C-21, C-3, C-17, C-15 ve C-18) ve 8 adet metil (CH_3) sinyali (C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29 ve C-30) gözlemlendi. Molekülün ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.12) gözlemlenip DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumunda gözlemlenmeyen kuarterner C sinyallerinin toplamda 7 adet olduğu (C-4, C-8, C-9, C-10, C-13, C-14 ve C-22) tespit edildi. ^1H , ^1H -COSY (Şekil 3.14), HMQC (Şekil 3.15) ve HMBC (Şekil 3.16) spektrumlarında gözlenen tüm korelasyonlar önerilen kimyasal yapı ile tam bir uyum halindedir.



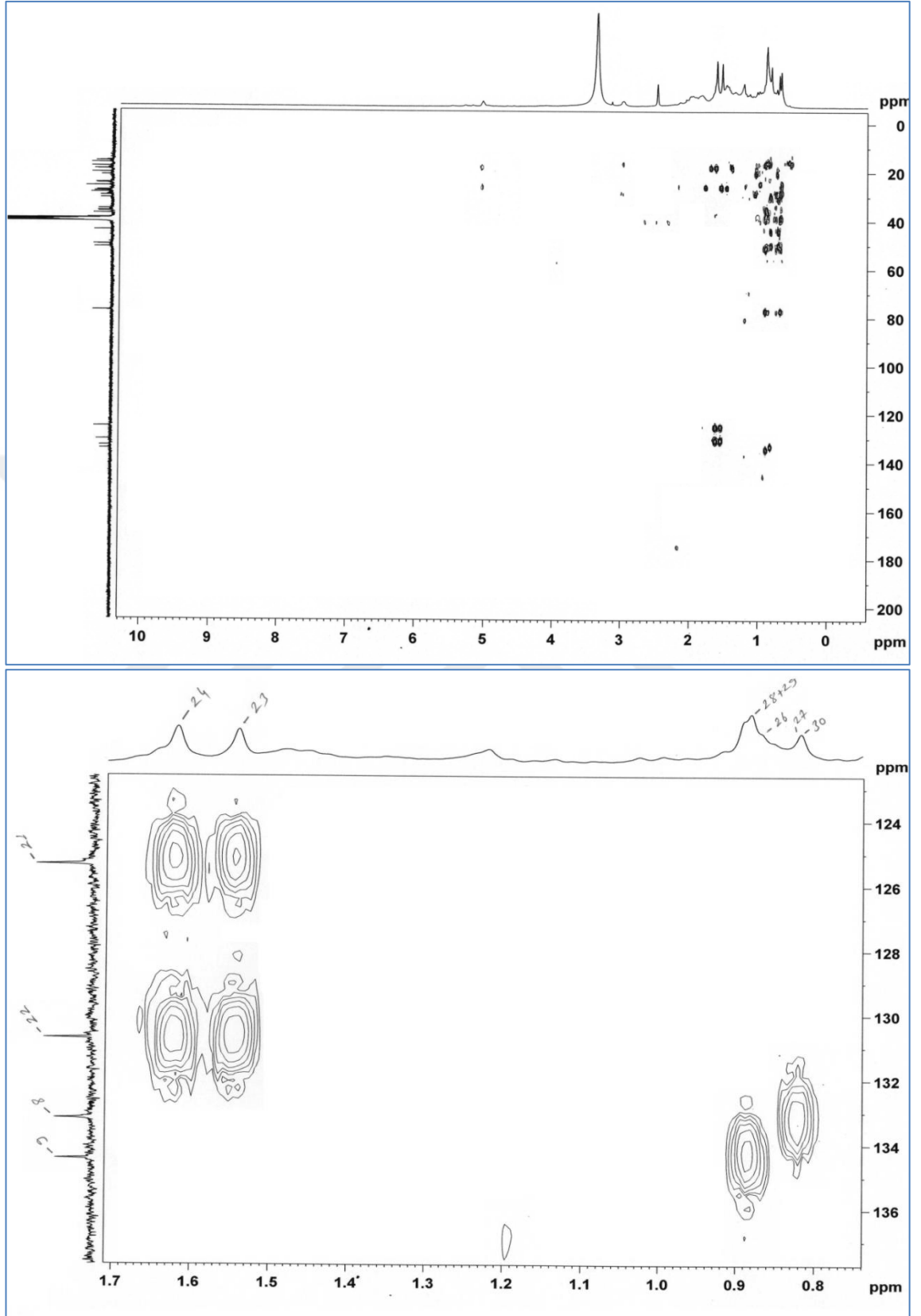
Şekil 3.13. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO-d₆)



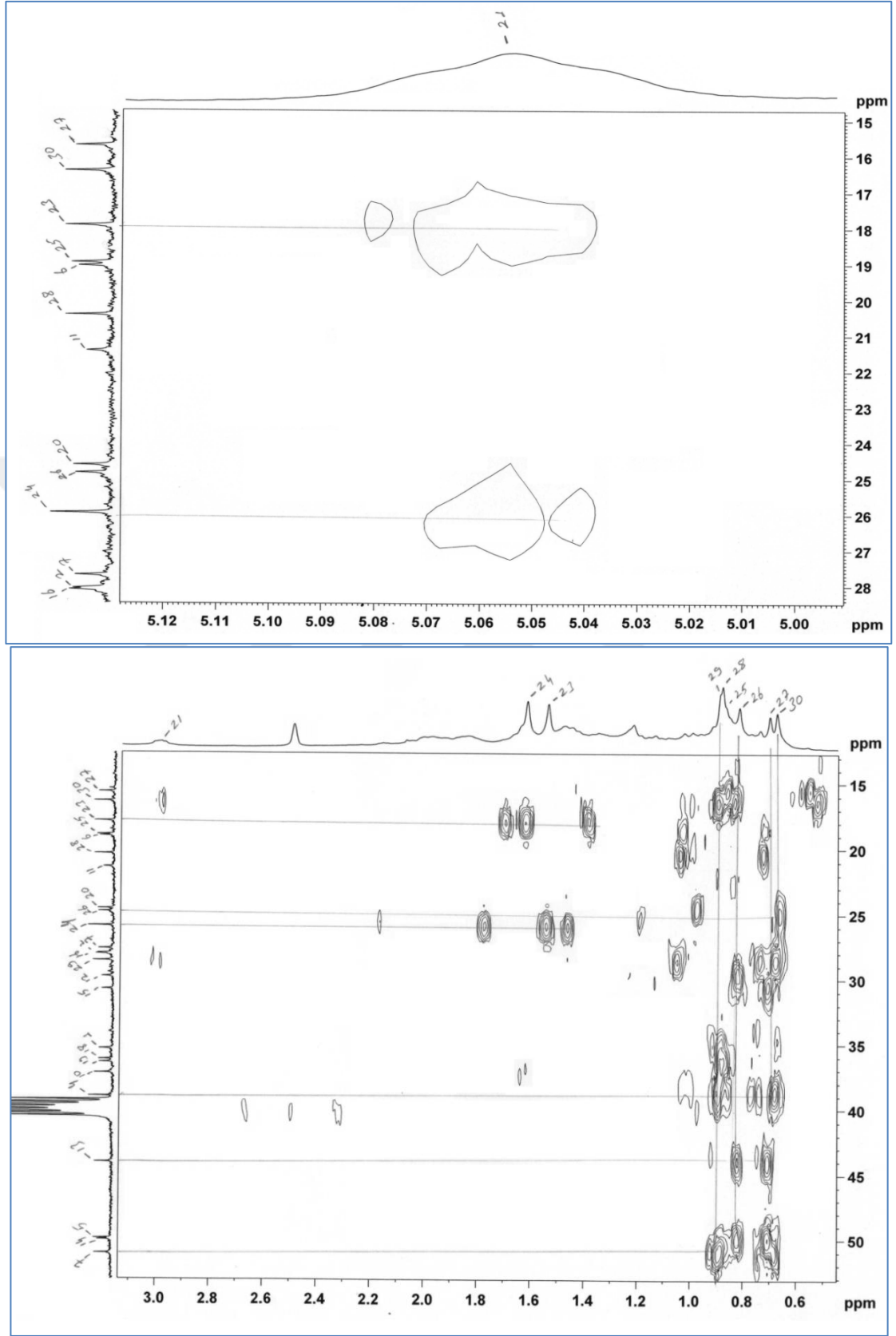
Şekil 3.14. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO- d_6)



Şekil 3.15. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMQC spektrumu (DMSO-d₆)

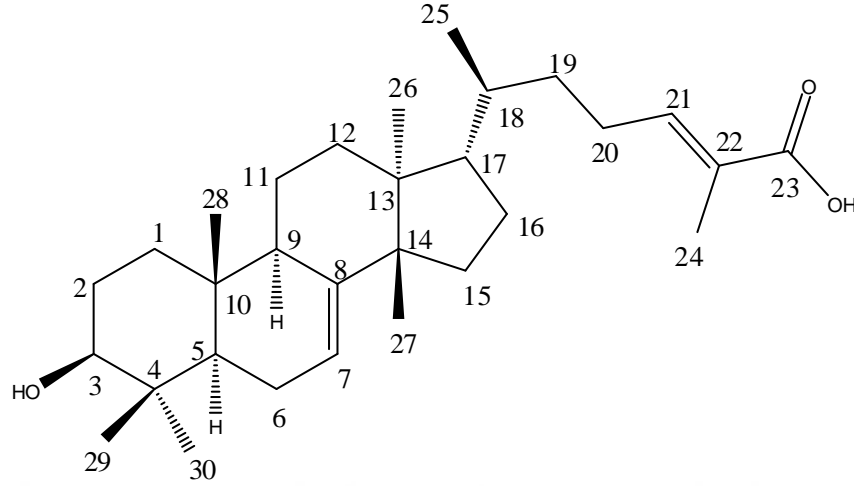


Şekil 3.16. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 3.16. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO-d₆) (Devamı)

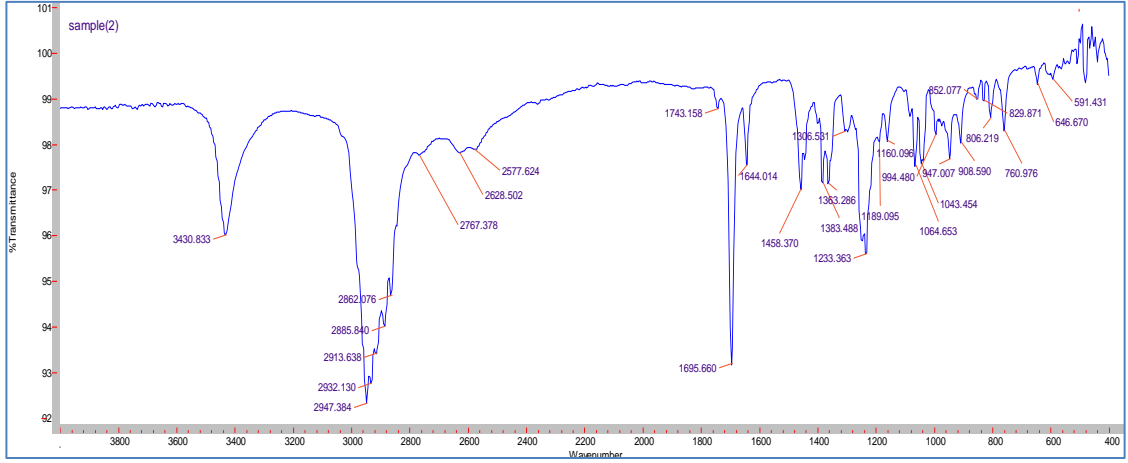
3.2.3. Mastikadienolik Asit (3-Hidroksilanosta-7,24Z-dien-26-oik asit, PVSC-4)



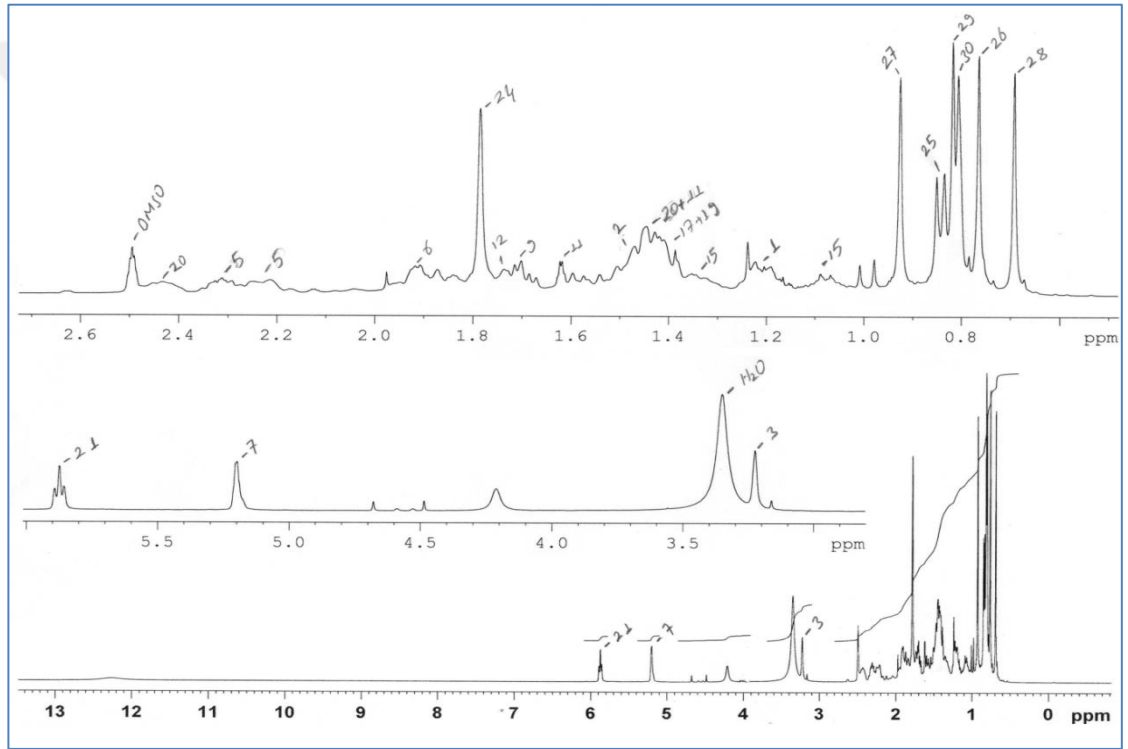
C₃₀H₄₆O₃, Mol Kütlesi: 456,70 g/mol

PVSC-4 molekülü kromatografik çalışmalar ile katı amorf halde saflaştırıldı ve hekzan-EtOAc (6:4) çözücü karışımı üzerinden beyaz iğnemsî kristaller halinde kristallendirildi. **PVSC-4** de daha önce saflaştırılan moleküller gibi İTK'da görünür ışıktaki ve UV₂₅₄ nm de renksiz iken H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi püskürtüldükten ve 105 °C'de ısıtıldıktan sonra kırmızı-mor renk vermektedir. Maddenin H₂SO₄-vanilin (% 1) reaktifi ile kırmızı-mor leke vermesi **PVSC-4**'ün terpenik veya steroidal bir yapıya sahip olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996). **PVSC-4** bileşiğinin molekül yapısı FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC ve ¹H-¹H COSY spektrumlarının yorumlanması ile *Pistacia* türleri için karakteristik bir triterpen olan **mastikadienolik asit** olarak aydınlatıldı. Bileşiğin kimyasal yapısı ayrıca HMBC spektrumu ve daha önce yayınlanmış spektral verilerle de doğrulandı (Assimopoulou ve Papageorgiou, 2005a,b; Sharifi ve Hazell, 2012; Bozorgi ve ark., 2013).

Bileşiğin kimyasal yapısı ile uyumlu olarak molekülün FTIR spektrumunda (Şekil 3.18) 3430,8 cm⁻¹ de -OH titreşim bandı, 2947-2862 cm⁻¹ aralığında alifatik -CH titreşim bantları, 1695,7 cm⁻¹ de karbonil (C=O) titreşim bandı ve 1400-1200 cm⁻¹ aralığında ise alifatik C-C titreşim bantları gözlemlenmiştir (Erdik, 1998; Fessenden ve Fessenden, 2001).



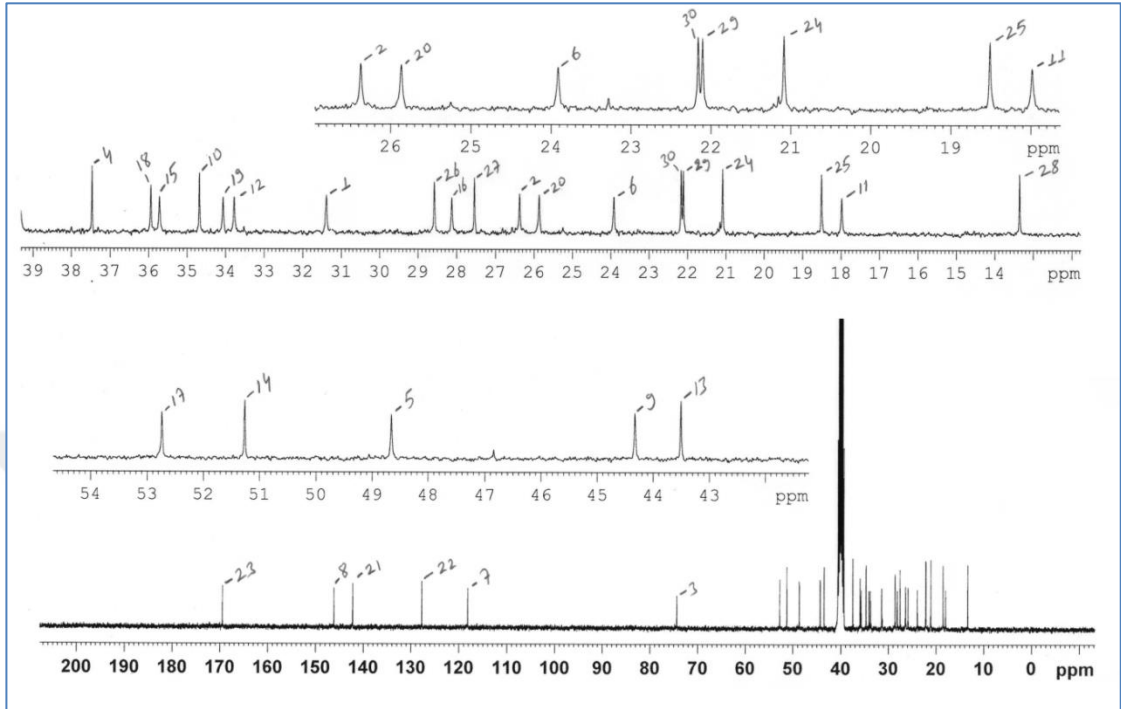
Şekil 3.17. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in FTIR spektrumu (ATR)



Şekil 3.18. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆)

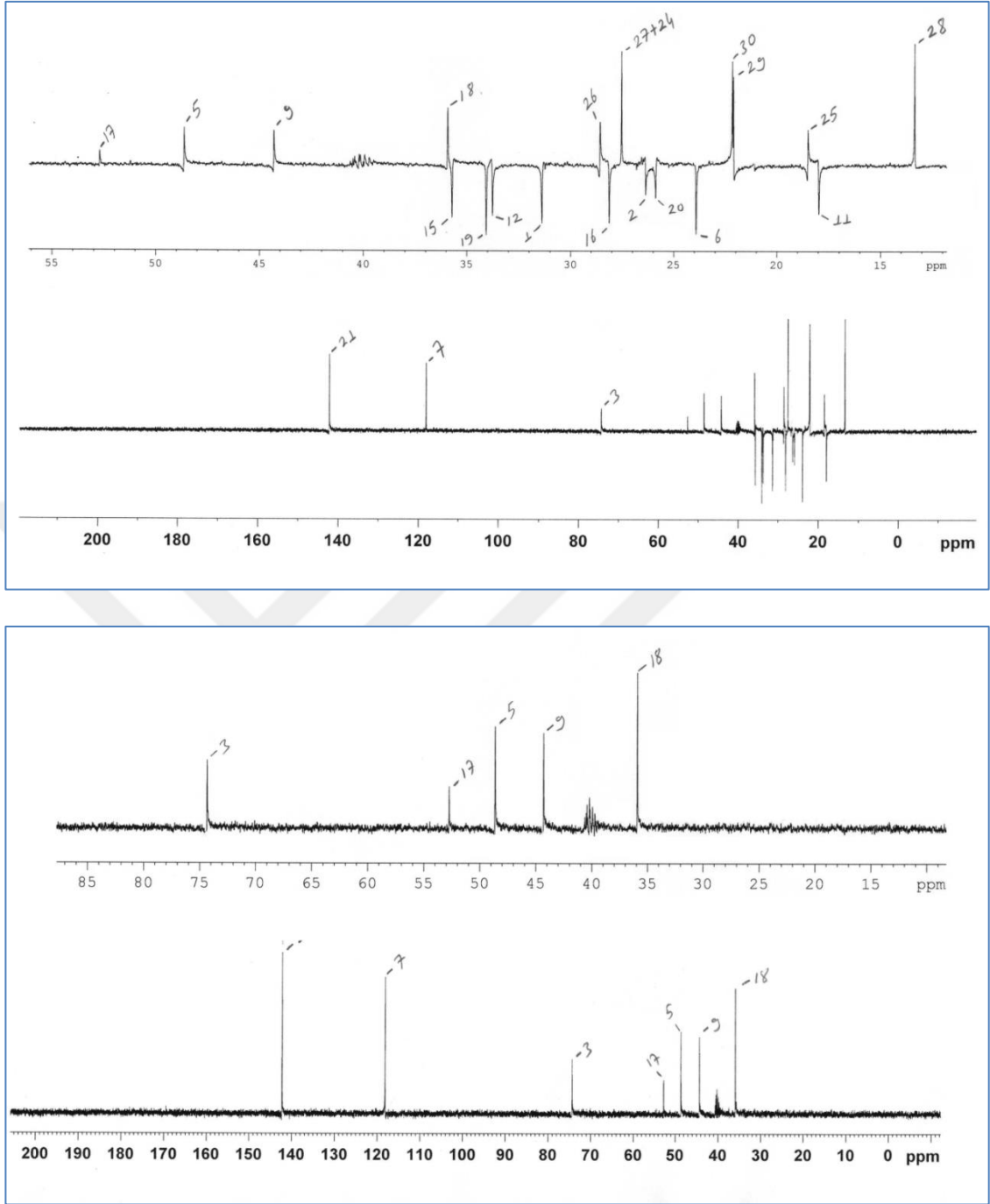
PVSC-4 molekülün ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.19) bir triterpen yapısına uygun olarak altı adet *s* metil sinyali bir adet de *d* metil sinyali gözlemlenmiştir. Bu sinyaller molekülde yedi adet -CH₃ grubunu olduğunu işaret etmiştir. Metil gruplarına ait *s* sinyaller $\delta=0,69$ ppm (H-28), $\delta=0,76$ ppm (H-26), $\delta=0,82$ ppm (H-29), $\delta=0,93$ ppm (H-27) ve $\delta=1,78$ ppm (H-24) de gözlemlenmiştir. İkili bağın etkisinden dolayı H-24 metil sinyali diğer metil grubu sinyallerine göre daha aşağı alanda ($\delta=1,78$ ppm) gözlemlenmiştir. H-25 metil sinyali beklenildiği gibi $\delta=0,84$ ppm de *d* sinyal ($J=6,32$ Hz) vermiştir. H-3 metin sinyali oksijenin indüktif etkisinden dolayı $\delta=3,39$ ppm de *m*

sinyal vererek rezonans olmuştur. Olefinik H-7 ve H-21 sinyalleri sırasıyla $\delta=5,20$ ppm ve $\delta=5,88$ ppm de gözlemlenmiştir.

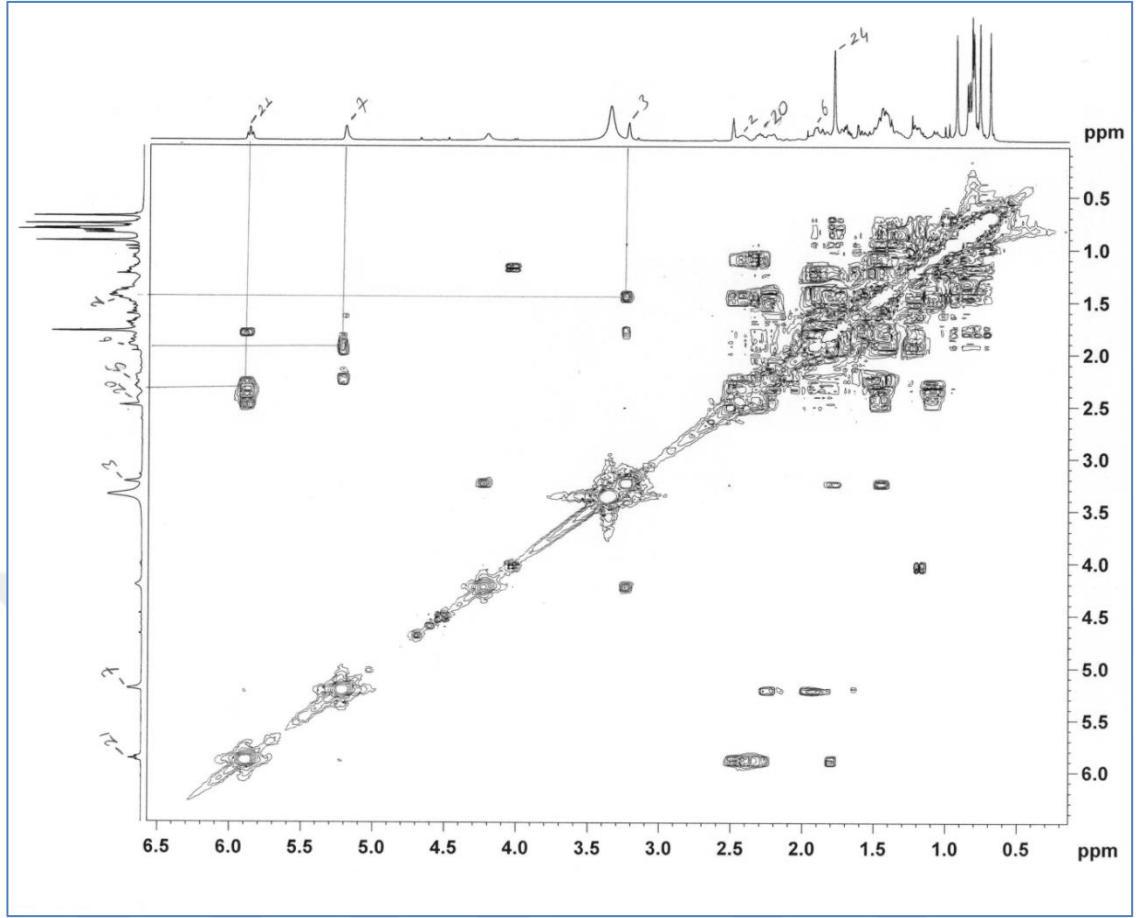


Şekil 3.19. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)

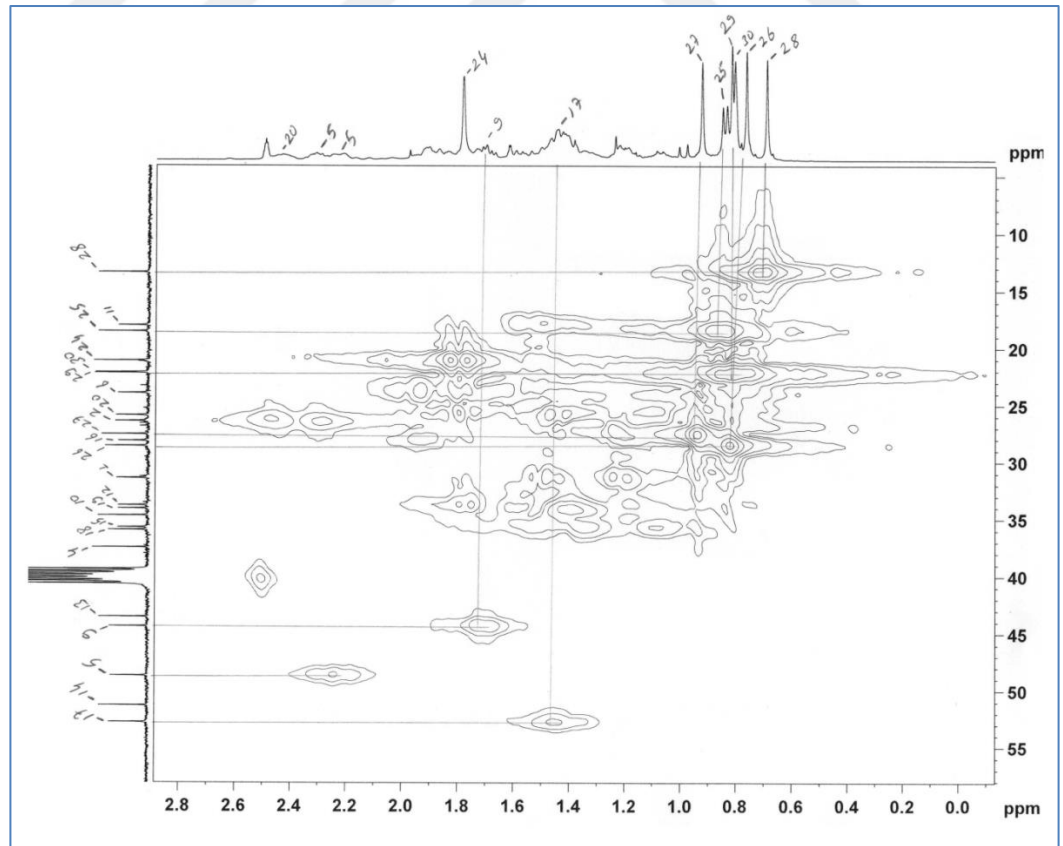
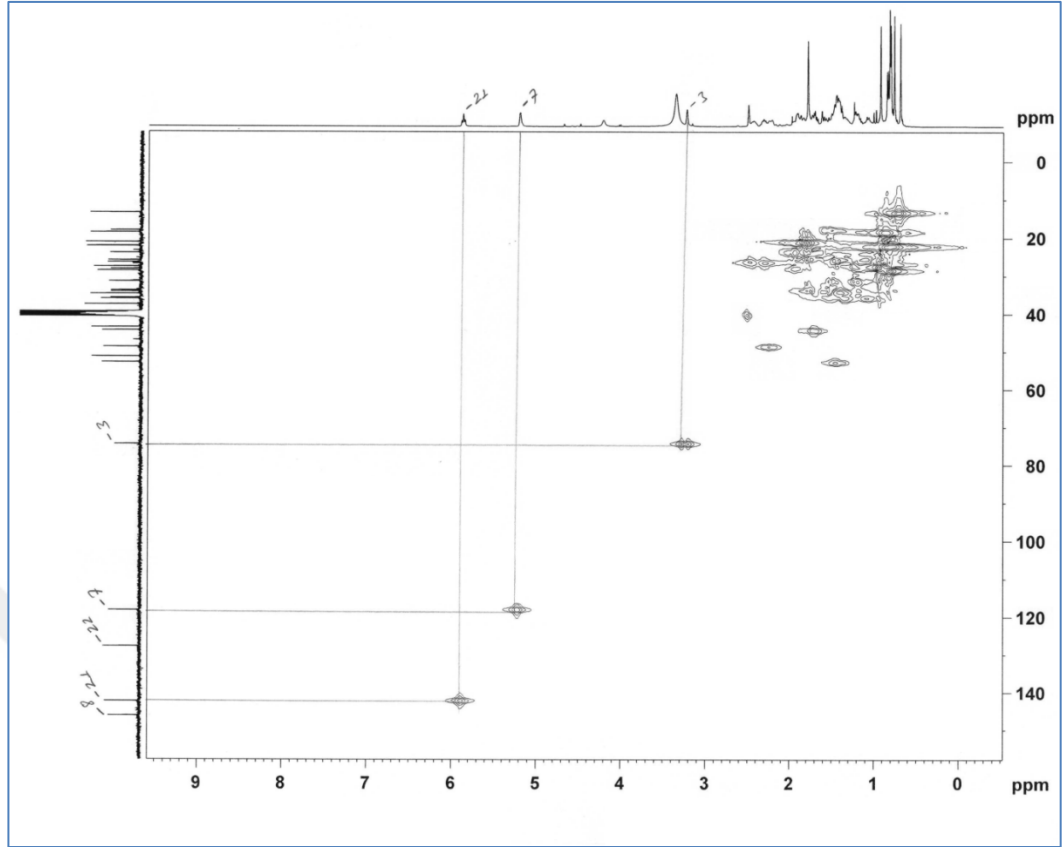
PVSC-4 molekülünün ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.20) bir triterpen yapısına uygun olarak toplamda 30 adet C sinyali gözlemlenmiştir. Moleküldeki karboksilik asidin C sinyali (C-23) $\delta=169,5$ ppm de rezonans olmuştur. Moleküldeki olefinik C-7, C-8, C-21 ve C-22 rezonans sinyalleri sırasıyla $\delta=146,1$, $\delta=142,2$, $\delta=127,7$ ve $\delta=118,13$ ppm de gözlemlenmiştir. $\delta=74,4$ ppm de gözlenen C sinyali ise O atomunun bağlı olduğu C-3'e ait sinyaldir. PVSC-4 molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.21) önerilen molekül yapısına uygun olarak 9 adet metilen C sinyali, 7 adet metin C sinyali ve 7 adet de metil C sinyali belirlendi. Molekülün, ^1H , ^1H - COSY (Şekil 3.22), HMQC (Şekil 3.23) ve HMBC (Şekil 3.24) spektrumlarında gözlenen tüm korelasyonlar PVSC-4 için önerilen kimyasal yapıyı doğrulamaktadır.



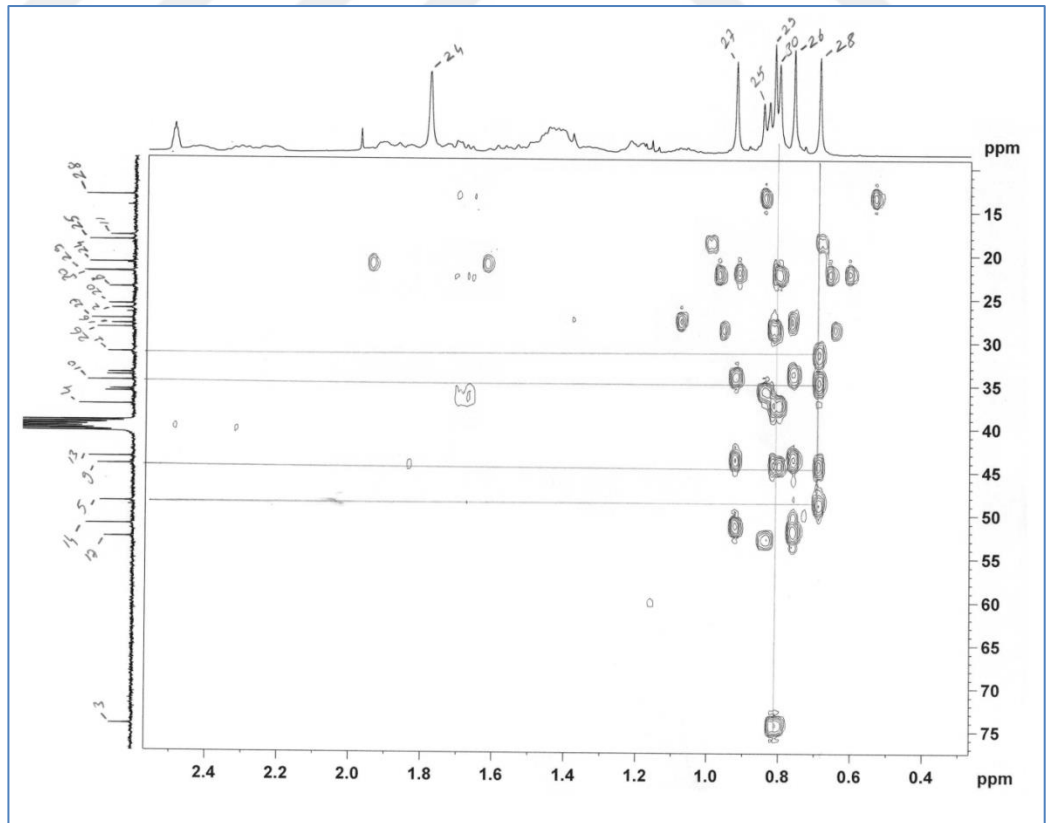
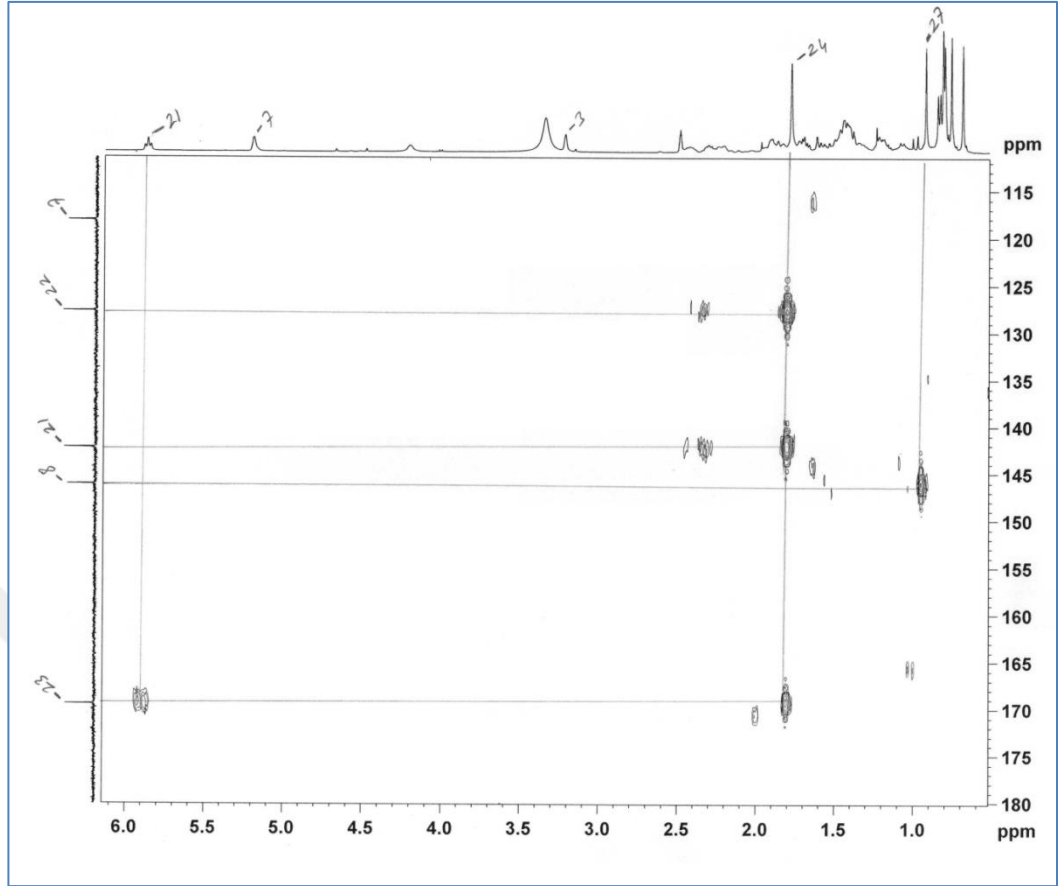
Şekil 3.20. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in sırasıyla DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (DMSO-d₆)



Şekil 3.21. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO-d_6)

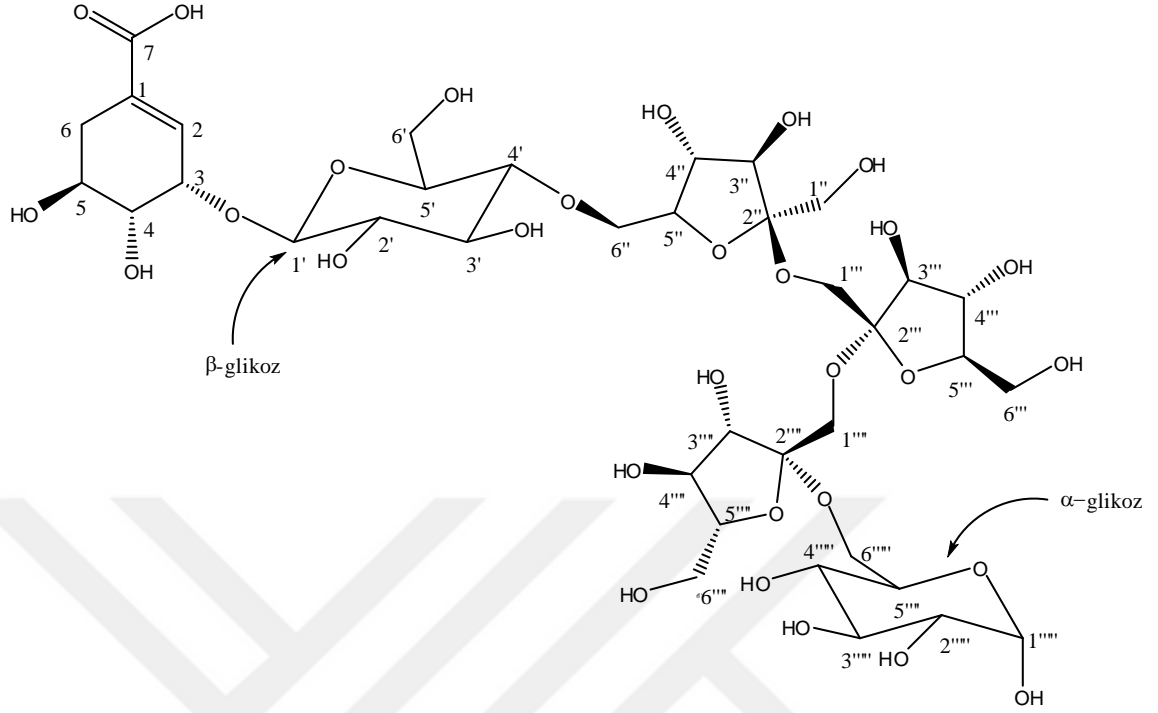


Şekil 3.22. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in HMQC spektrumu (DMSO-d₆)



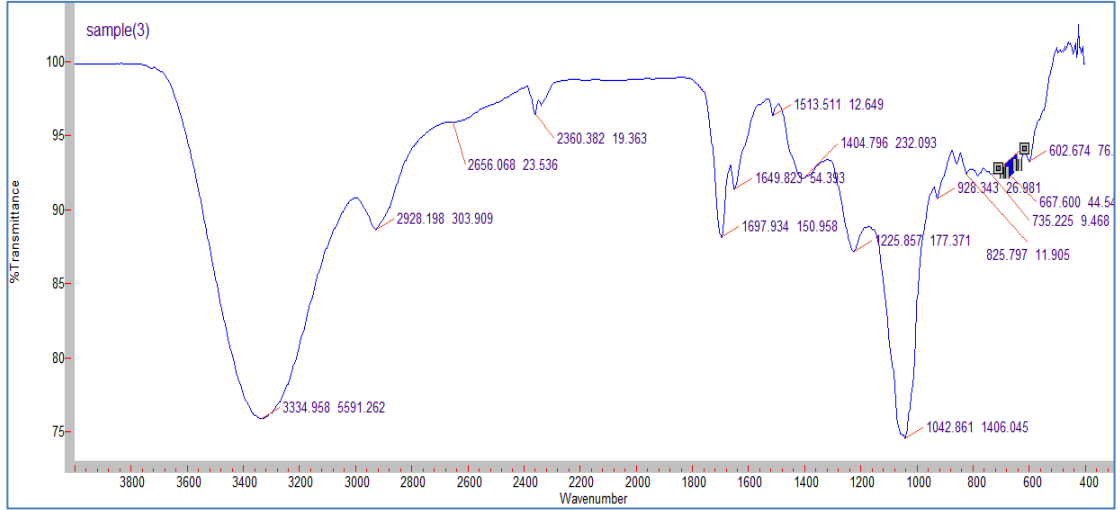
Şekil 3.23. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in HMBC spektrumu (DMSO-d₆)

3.2.4. Pistasionik asit (PVSE-1)



Tahmini Kimyasal yapı: $C_{37}H_{60}O_{30}$, Mol Kütleli: 984,85 g/mol

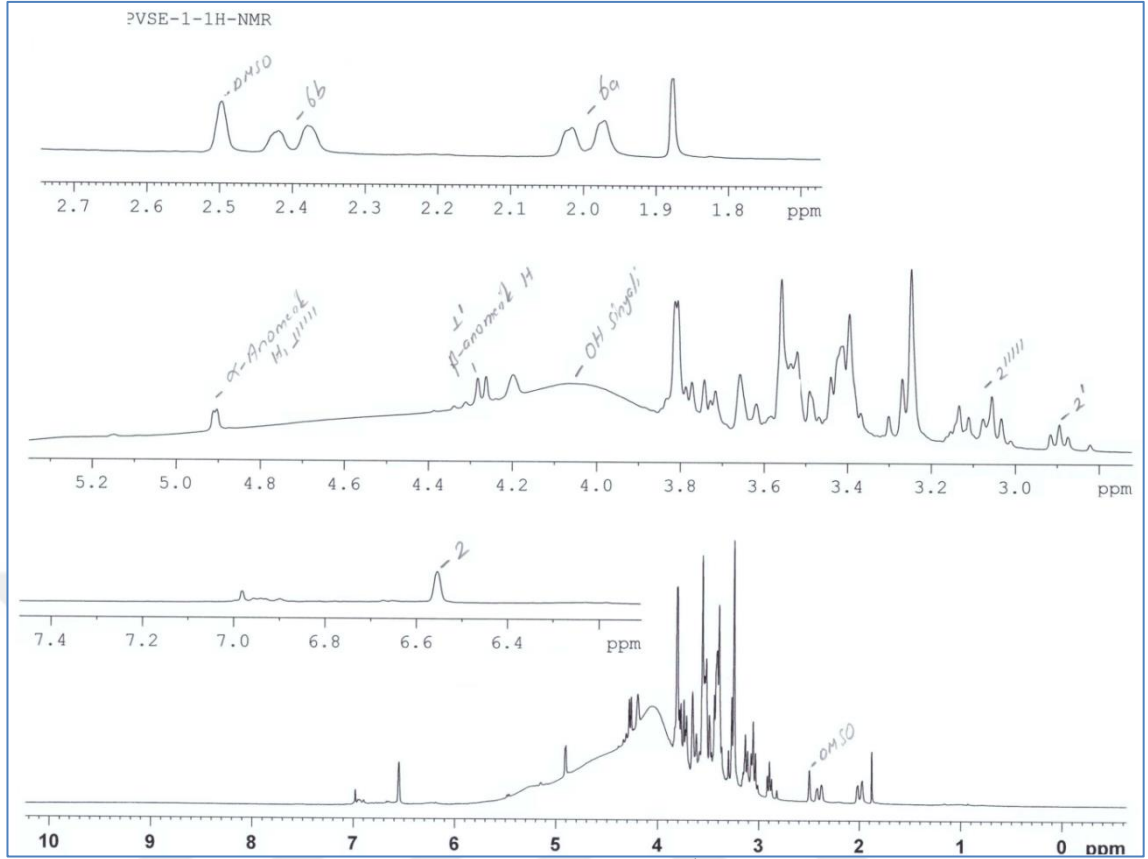
PVSE-1 *P.vera* sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle ana olarak saflaştırılan bir moleküldür. **PVSE-1** etanol ekstresinden saflaştırılan **PVSE-2** den daha polar bir molekül olmasına karşın kromatografik yöntemlerle ana oluşundan dolayı ilk saflaştırılan molekül olduğu için **PVSE-1** olarak kodlandı. **PVSE-1** hafif sarı renkli bir katı olarak elde edildi. Ancak oda şartlarında ortamdan hızla nem çeken bir madde olduğu belirlendi. Bu durum molekülün polar yapılı olduğuna işaret etmektedir. Madde İTK'da görünür ışıktaki ve UV_{254} nm de renksiz iken H_2SO_4 -vanilin (% 1) reaktifi püskürtüldükten ve $105\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ısıtıldıktan sonra hafif yeşilimsi bir renk vermektedir. Bu bilgi molekülün bir sakkarit sınıfı bir madde olabileceğini göstermektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Blatt, 1996). **PVSE-1** molekülünün FTIR spektrumunda (Şekil 3.25) $3334,96\text{ cm}^{-1}$ deki fazla sayıda $-OH$ grubundan ileri gelen çok kuvvetli absorban bantı da molekülün polar bir oligosakkarit olabileceğini göstermektedir. Moleküldeki fazla sayıdaki C-O titreşim bantı $1050,98\text{ cm}^{-1}$ de kuvvetli bir bant olarak gözlemlenirken, C=O titreşim bantı ise $1697,93\text{ cm}^{-1}$ de biraz daha zayıf bant olarak gözlemlendi (Erdik, 1998; Fessenden and Fessenden, 2001).



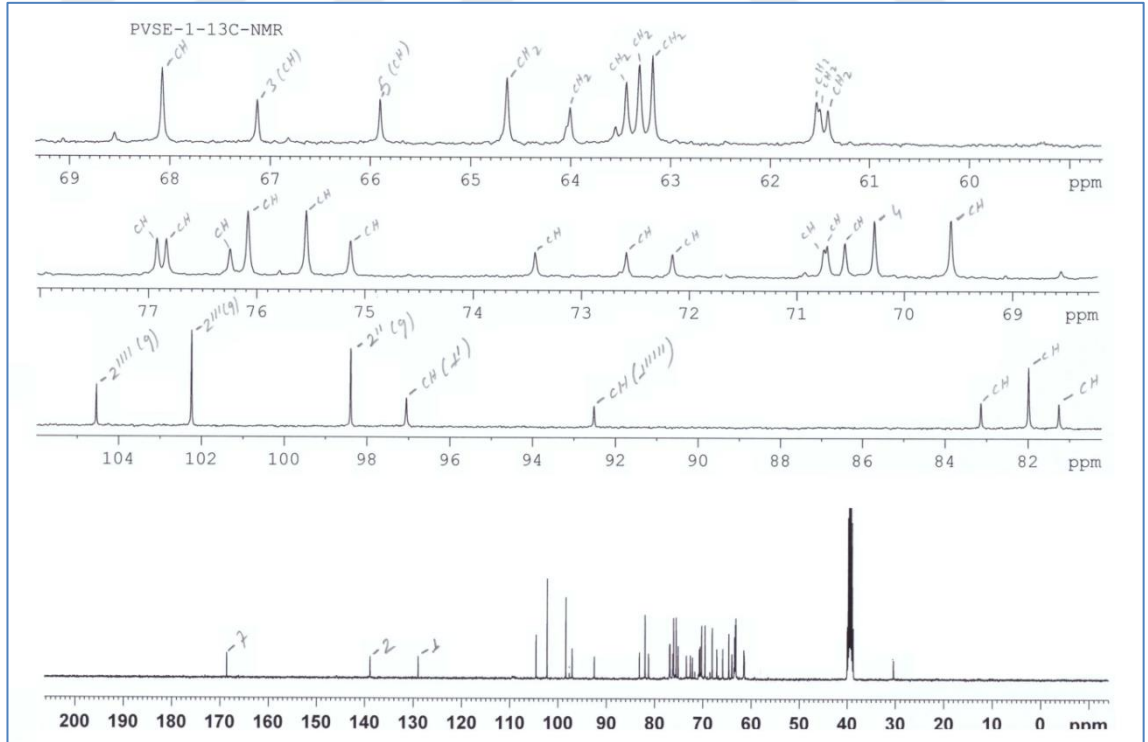
Şekil 3.24. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün FTIR spektrumu (ATR)

PVSE-1 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.26) $\delta=3-5$ ppm aralığındaki kalabalık sinyaller de molekülün bir oligosakkarit olduğunu doğrulamaktadır. Diğer taraftan $\delta=6,56$ ppm deki *s* sinyal ile $\delta=1,99$ ppm ve $\delta=2,40$ ppm civarındaki iki ayrı *d* ($J=17,69$ Hz ve $J=11,86$ Hz) sinyal oligosakkarit molekülünün shikimic asit türevi olduğuna delil oluşturmaktadır. Bu bilginin ışığında molekülün asidik karakterli olabileceği düşüncesinden yola çıkarak, sudaki çözeltisinin pH değeri ölçüldü. Sudaki çözeltisinin pH değerinin 2,56 olarak ölçülmesi molekülün asidik karakterli olduğunda doğrulamaktadır.

PVSE-1 molekülünün shikimic asit türevi olduğu molekülün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.27) $\delta=168,6$ ppm (C-7), $\delta=138,9$ ppm (C-2), $\delta=129,0$ ppm (C-1) ve $\delta=30,4$ ppm de (C-6) gözlenen C sinyalleri ile de uyumludur. PVSE-1 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.27) $\delta=4,27$ ppm ve $\delta=4,91$ ppm de iki adet anomerik H atomlarına ait sinyal gözlemlenmiştir. Anomerik H atomlarına ait $\delta=4,27$ ppm ve $\delta=4,91$ ppm de gözlenen iki *d* sinyal için etkileşme sabitleri sırasıyla $J=7,80$ Hz ve $J=2,96$ Hz olarak hesaplandı. Etkileşme sabitlerinden monosakkaritin kuvvetli ihtimal glikoz olduğu ve birinin α - bağı diğerinin ise β - bağı ile bağlandığı sonucu çıkarıldı. PVSE-1 molekülünün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda $\delta=104,5$ ppm, $\delta=102,2$ ppm ve $\delta=98,4$ ppm de gözlenen üç adet kuarterner C sinyali bizde molekülün üç adet fruktoz birimi içerdiği düşüncesini oluşturdu. Glikoz birimlerine ait anomerik C sinyaller ise $\delta=97,1$ ppm ve $\delta=92,5$ ppm de gözlemlendi.

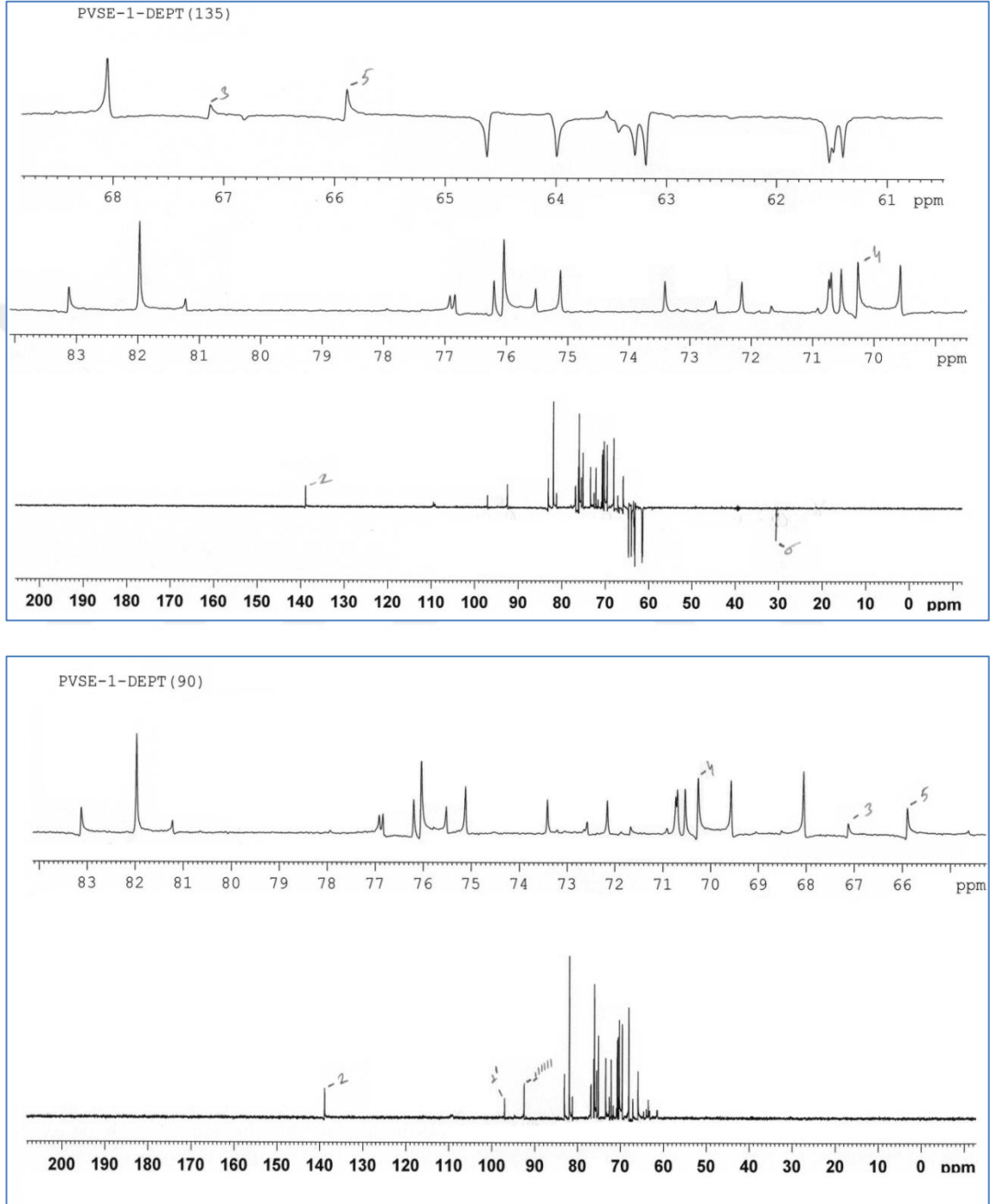


Şekil 3.25. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün ^1H -NMR spektrumu (DMSO- d_6)



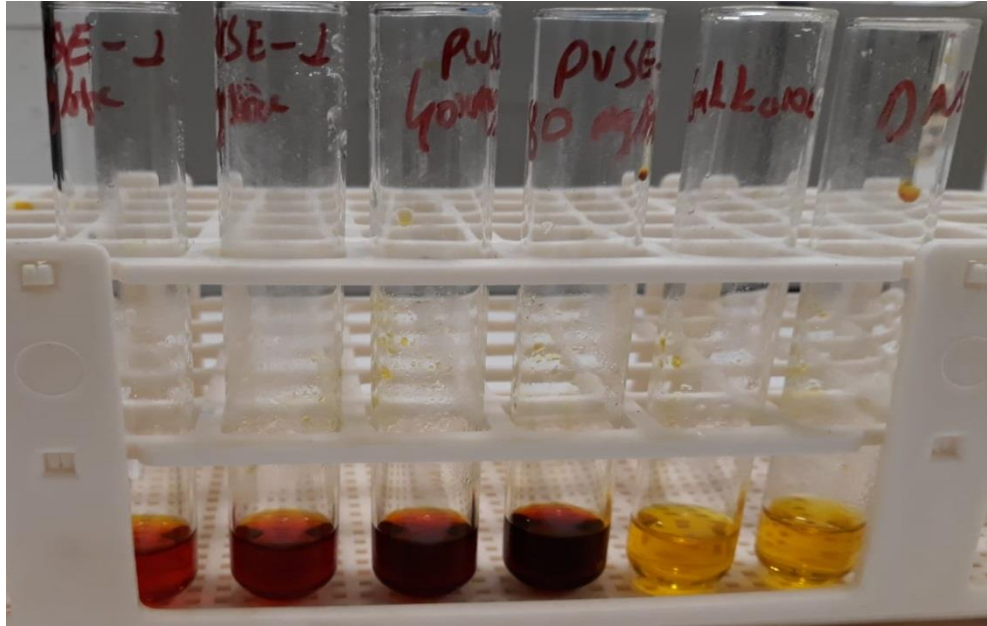
Şekil 3.26. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu (DMSO- d_6)

PVSE-1 molekölünün DEPT-135 ve DEPT-90 ^{13}C -NMR spektrumunda (Şekil 3.28) molekülde sekiz adet metilen ($-\text{CH}_2-$), ve değişik şiddetlerde yirmi adet metin ($-\text{CH}-$) sinyali gözlemlendi. Tüm spektral veriler yorumlanarak molekülün iki glikoz birimi üç adet de fruktoz birimi içerdiği sonucuna varıldı.

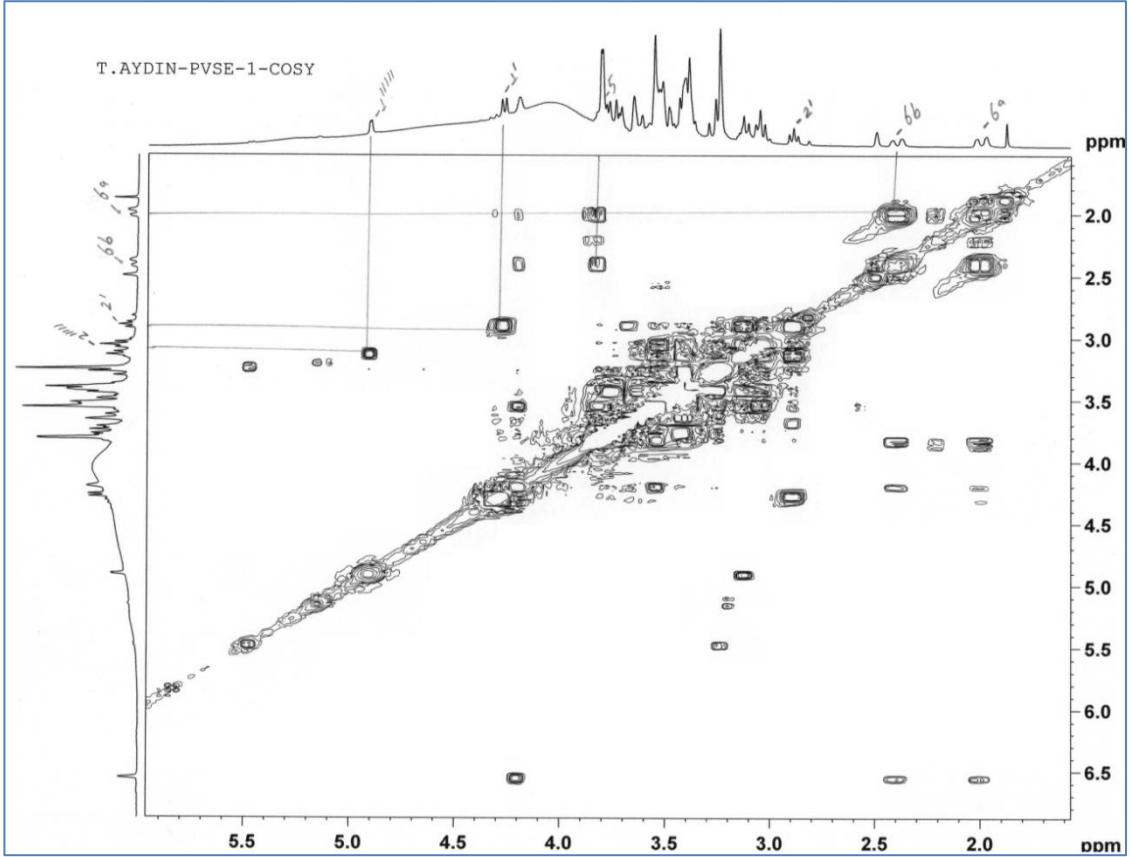
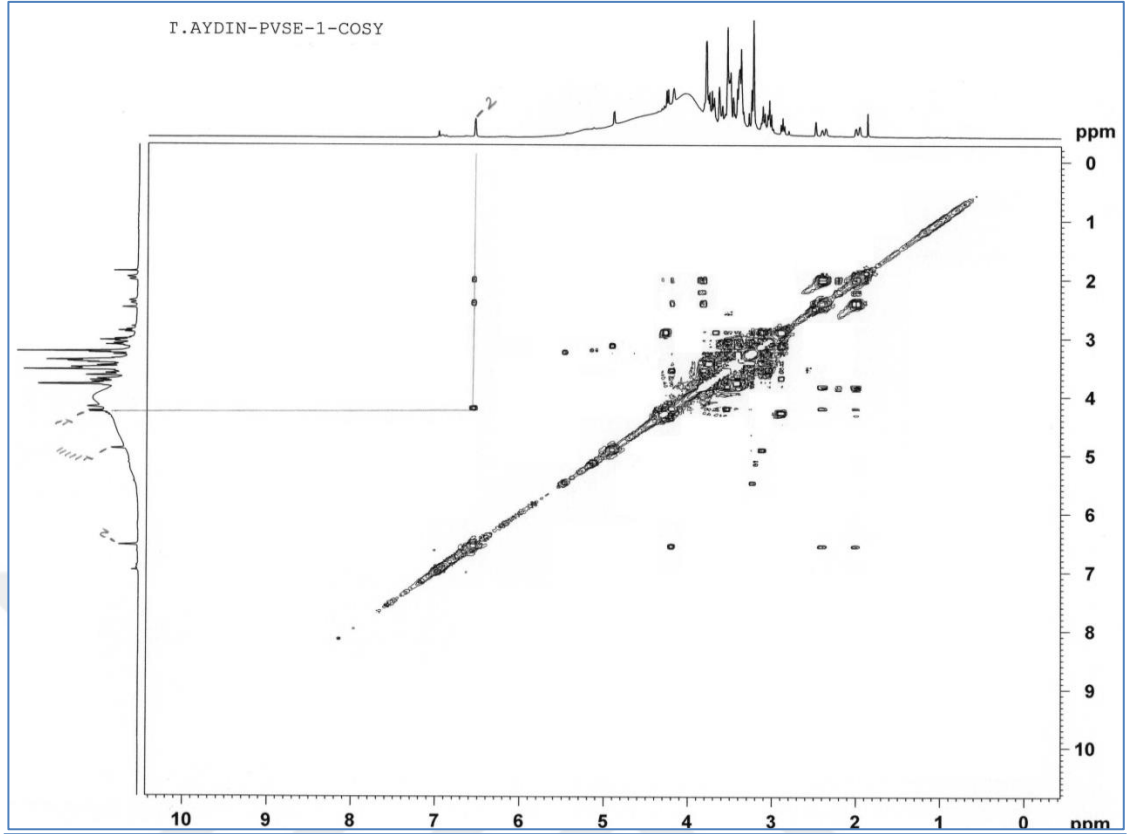


Şekil 3.27. Pistasionikasit (**PVSE-1**)'in DEPT-135 ve -90 spektrumları (DMSO- d_6)

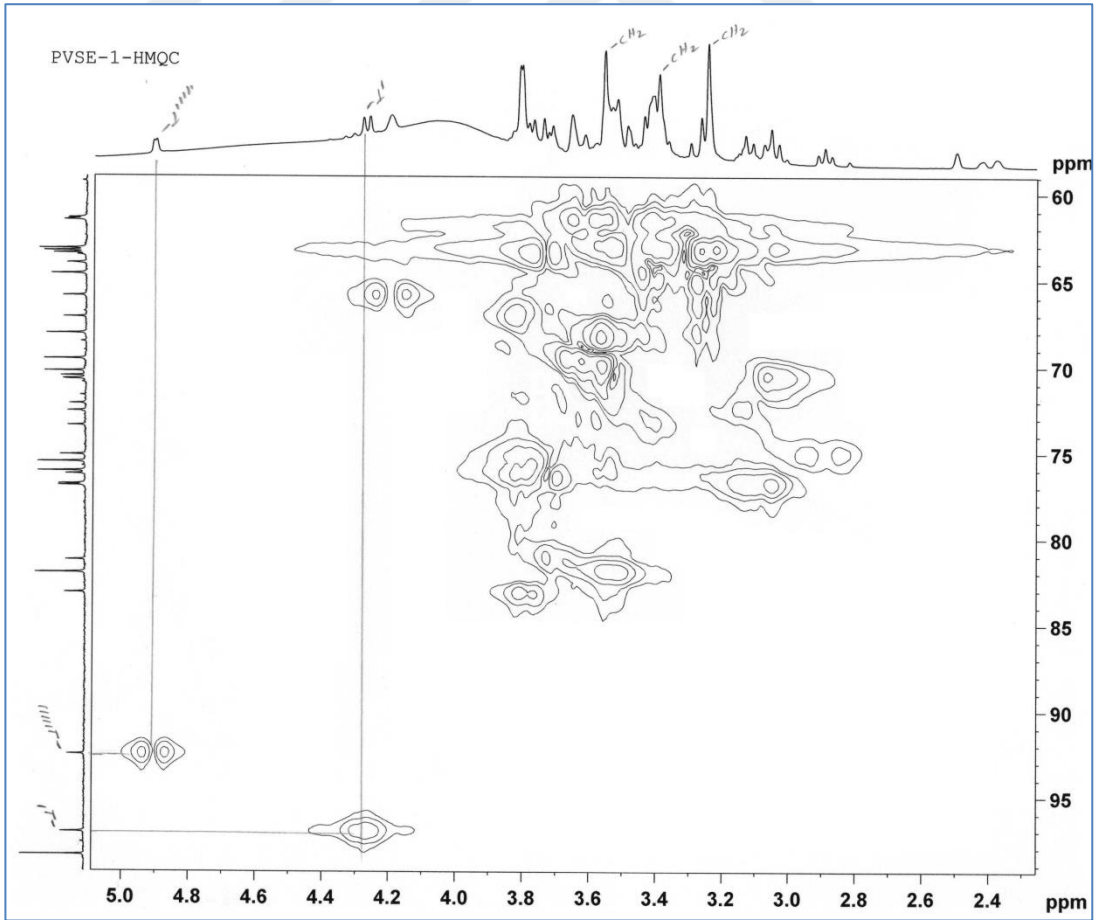
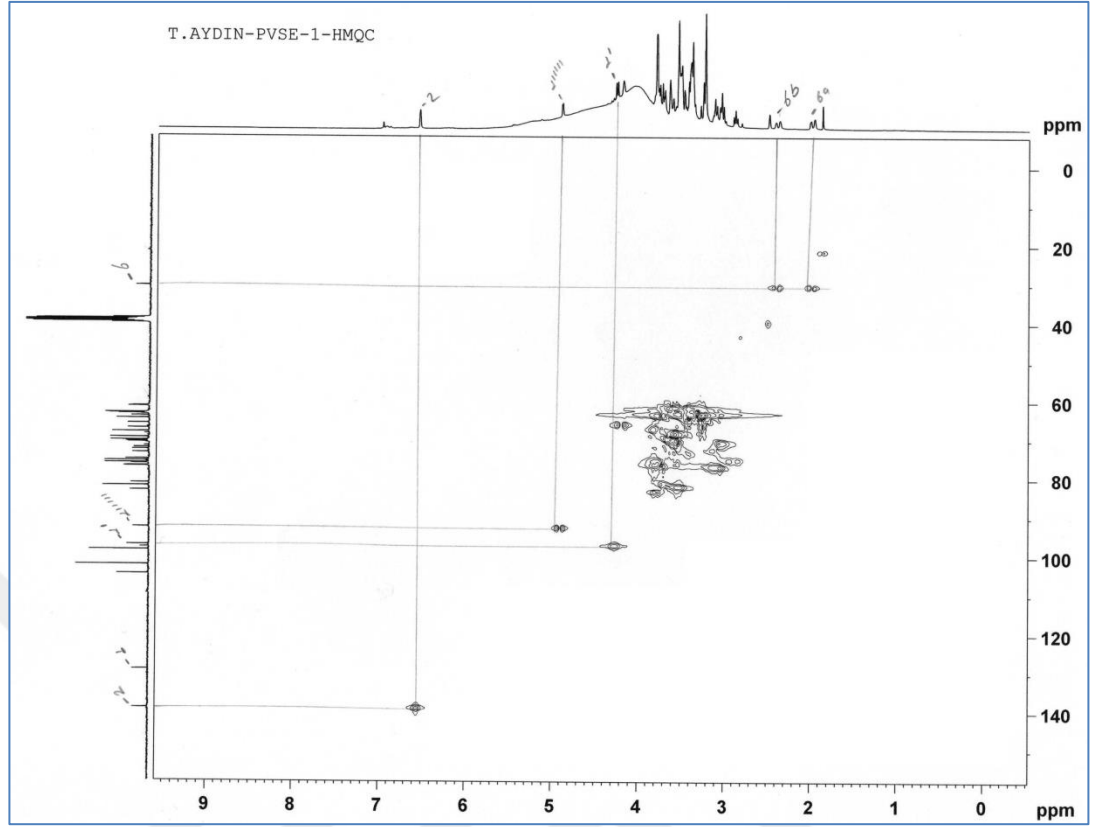
Diğer taraftan molekülünün ^1H , ^1H -COSY spektrumunda (Şekil 3.29) $\delta=6,55$ ppm deki sinyalin (H-2, shikimic aside ait) $\delta=1,99$ ppm ve $\delta=2,40$ ppm deki shikimic asitin H-6 atomlarına ait sinyallerin yanı sıra $\delta=4,27$ ppm deki anomerik H atomuna ait sinyal ile zayıf korelasyonu (uzak bağ etkileşimleri) glikoz biriminin shikimic asitin üç nolu C atomundan β - bağı ile bağlandığına delil oluşturmaktadır. Literatürde oligosakkarit sınıfı bileşiklerin yapısında bulunan D-fruktoz monosakkarit biriminin birbirine genellikle 1 \rightarrow 2 pozisyonunda, D-glikoz ve D-galaktoz gibi monomer birimlerinin ise 1 \rightarrow 4 pozisyonunda bağlandığı bildirilmiştir (Calub ve ark., 1990; Yun ve ark., 1997; Fujishima ve ark., 2009; Jan Mei ve ark., 2010). Bu bilgiler ışığında moleküldeki D-fruktoz monosakkarit birimlerinin birbirine 1 \rightarrow 2 pozisyonundan bağlandığı düşünüldü. **PVSE-1** molekülünün DNS testi ile indirgen bir şeker olduğu tespit edilmiştir. **PVSE-1** molekülünün konsantrasyon artışına bağlı olarak renk şiddetindeki ve absorbansındaki artış indirgen bir şeker olduğuna delil oluşturmaktadır (Resim 3.1.) Tüm deneysel verilerin yorumlanması sonucu **PVSE-1** molekülü için monosakkarit birimlerinin bağlanma pozisyonları tam olarak belirlenememesine karşın yukarıda tahmini bir yapı önerilmiştir. Kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılamamasına karşın **PVSE-1** molekülünün yeni bir molekül olduğu tespit edildi ve bu yeni bileşiğin ismi **pistasionikasit** olarak tarafımızdan adlandırıldı. Molekülün HMQC (Şekil 3.30) ve HMBC (Şekil 3.31) spektrumları da önerilen yapı ile uyumlu görünmektedir.



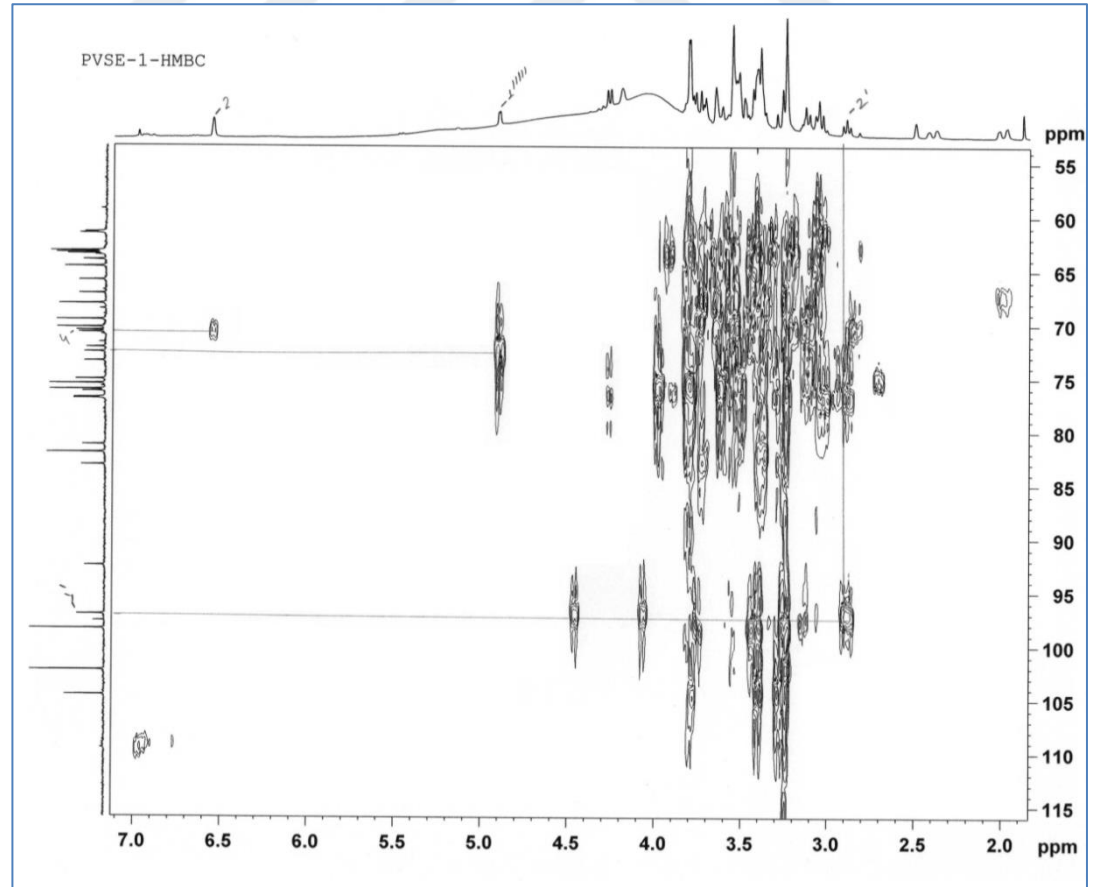
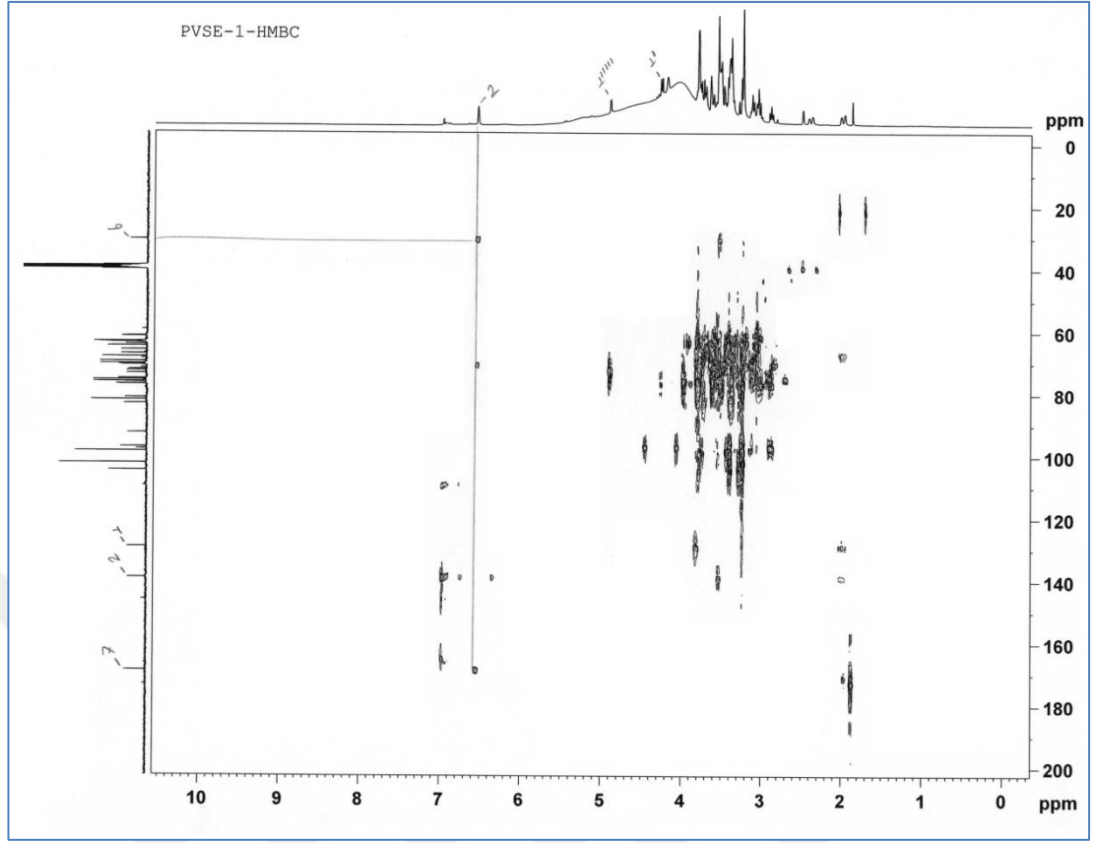
Resim 3.1. Pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülünün DNS testi sonuçları



Şekil 3.28. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün ^1H , ^1H -COSY spektrumu (DMSO-d_6)

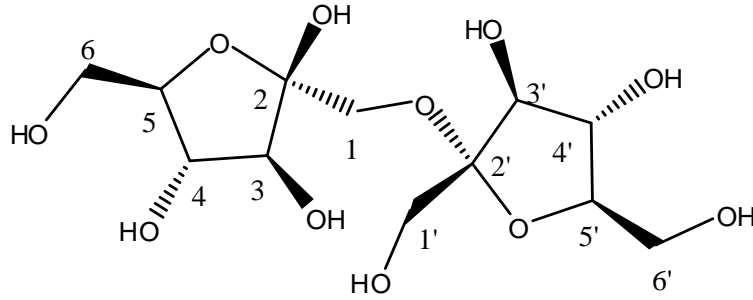


Şekil 3.29. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün HMQC spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 3.30. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO-d₆)

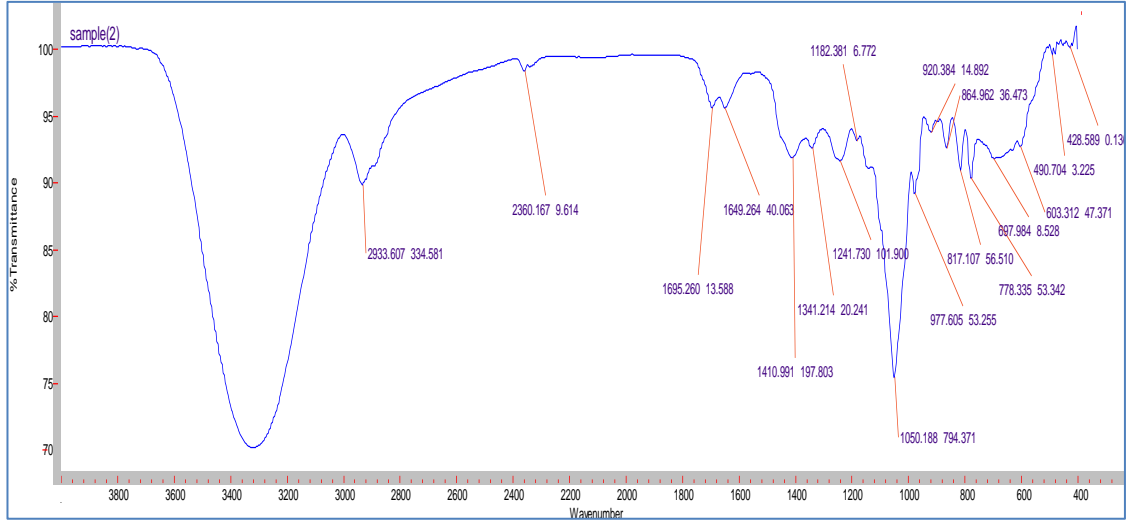
3.2.5. PVSE-2 (İnulobioz, α -D-fruktofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranozit)



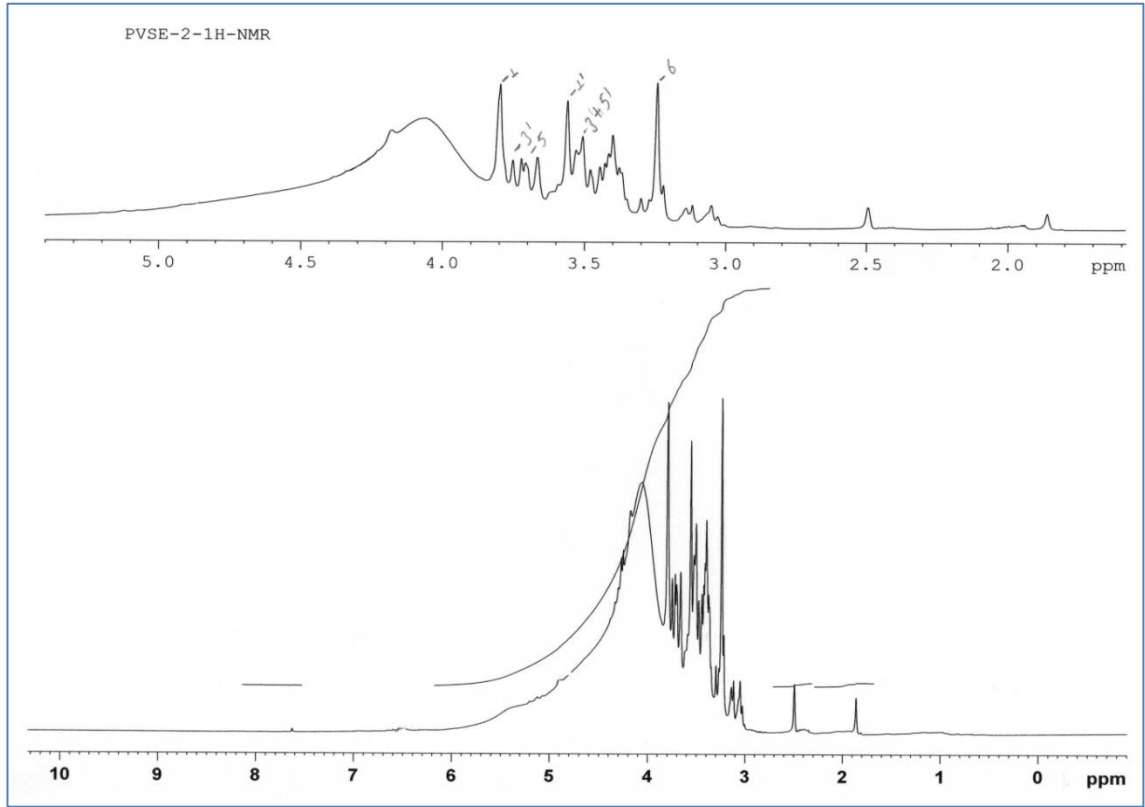
$C_{12}H_{22}O_{11}$, Mol Kütlesi: 342,12 g/mol

PVSE-2 *P.vera* sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan ve **PVSE-1** oligosakkarit molekülünden daha az polar olan bir moleküldür. **PVSE-1** den daha az polar bir molekül olmasına karşın kromatografik yöntemlerle ana **PVSE-1** molekülünden sonra saflaştırıldığından **PVSE-2** olarak kodlandı. **PVSE-2** hafif kırmızımsı renkli bir katı olarak elde edilmesine karşın oda şartlarında hızla ortamdan nem çekme kapasitesine sahip bir moleküldür. Bu durum **PVSE-1** molekülü gibi **PVSE-2** molekülünün de polar yapılı olduğuna işaret etmektedir. Madde İTK da görünür ışıkta ve UV_{254} nm de renksiz iken H_2SO_4 -vanilin (% 1) reaktifi püskürtüldükten ve 105 °C'de ısıtıldıktan sonra hafif sarımsı bir renk vermektedir. Bu bilgi molekülün bir oligosakkarit sınıfı bir madde olabileceğini göstermektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Bladt, 1996). **PVSE-2** molekülünün FTIR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT-135, DEPT-90, $^1H, ^1H$ -COSY, HMQC ve HMBC spektroskopik verilerinden kimyasal yapısı **inulobioz** disakkariti olarak aydınlatıldı (Calub ve ark., 1990).

İnulobioz (**PVSE-2**) molekülünün FTIR spektrumunda (Şekil 3.32) 3300 cm^{-1} deki fazla sayıda $-OH$ grubundan ileri gelen çok kuvvetli absorbands bandı da önerilen yapı ile uyumlu olup molekülün polar bir oligosakkarit olduğuna işaret etmektedir. Moleküldeki fazla sayıdaki C-O titreşim bandı $1050,19\text{ cm}^{-1}$ de kuvvetli bir bant olarak, alifatik C-H titreşim bantları ise $2933,61\text{ cm}^{-1}$ de gözlemlenmiştir (Erdik, 1998; Fessenden ve Fessenden, 2001).



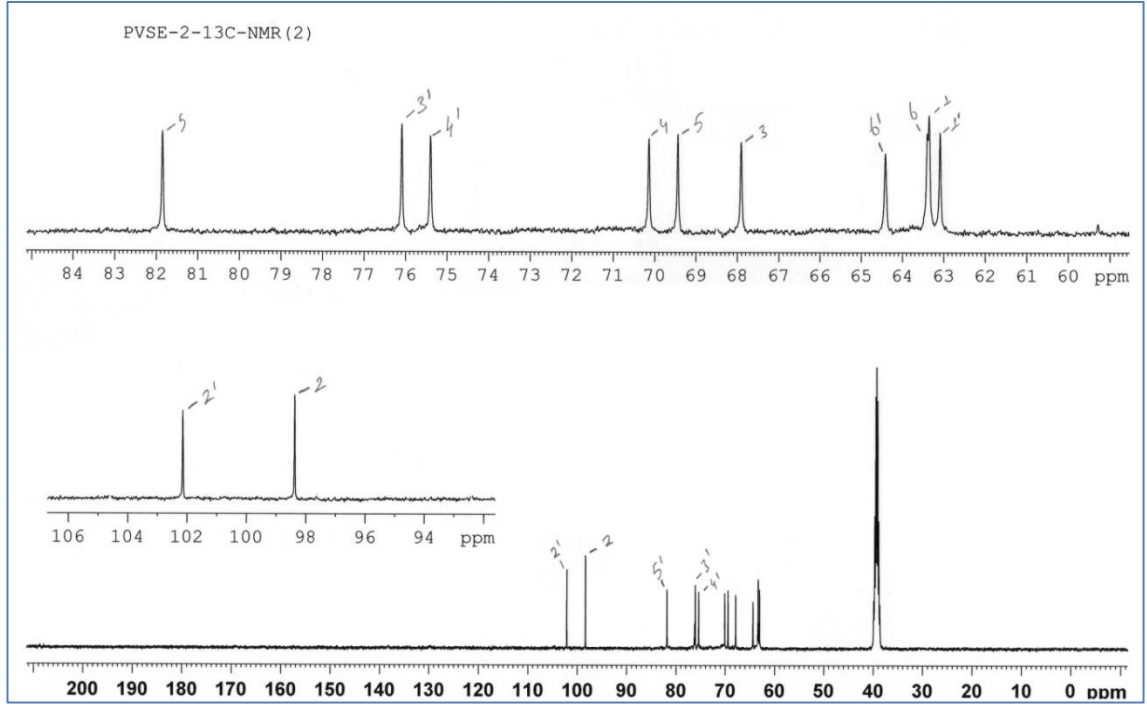
Şekil 3.31. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün FTIR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)



Şekil 3.32. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)

Inulobioz olarak karakterize edilen **PVSE-2** molekülünün ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.33) önerilen yapı ile uyumlu olarak anomerik H sinyalleri gözlenmeden sadece $\delta=3,03-4,50$ ppm aralığında hidrojen sinyalleri gözlemlenmiştir. **PVSE-2** molekülünün ¹³C-NMR spektrumunda (Şekil 3.34) bir disakkarit yapısından beklenildiği gibi toplam 12 C sinyali gözlemlendi. Spektrumda $\delta=104,6$ ppm ve $\delta=102,1$ ppm de gözlenen iki adet kuarternar C sinyali anomerik C atomlarına ait olup molekülün iki fruktoz birimi

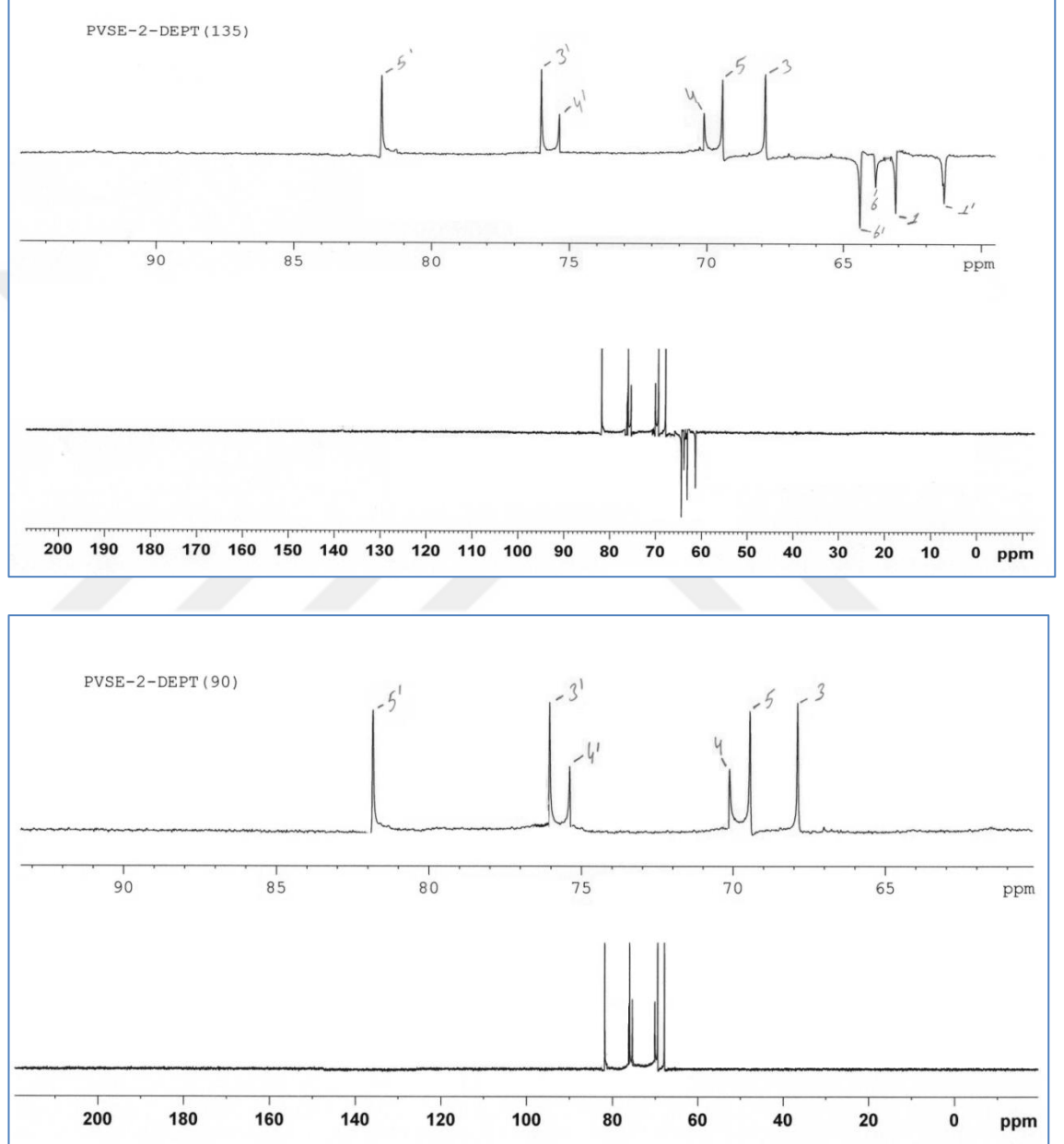
içeren bir difruktan olduğuna işaret etmektedir. Difruktoz molekül yapısına uygun olarak **PVSE-2** molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 ^{13}C -NMR (Şekil 3.35) spektrumunda 4 adet $-\text{CH}_2$ ve altı adet de $-\text{CH}$ sinyali belirlendi. Bileşiğin ^1H , ^1H -COSY (Şekil 3.36), HMQC (Şekil 3.37) ve HMBC (Şekil 3.38) spektroskopik verileri de önerilen yapı ile uyumludur.



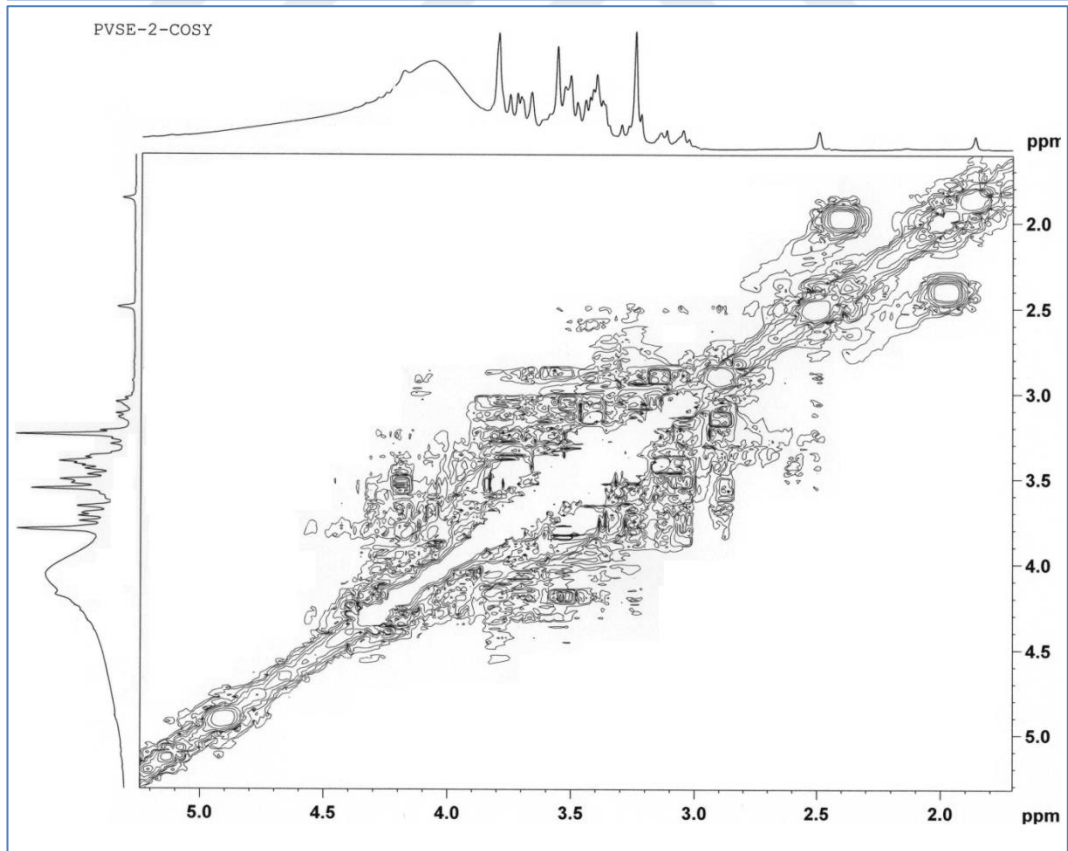
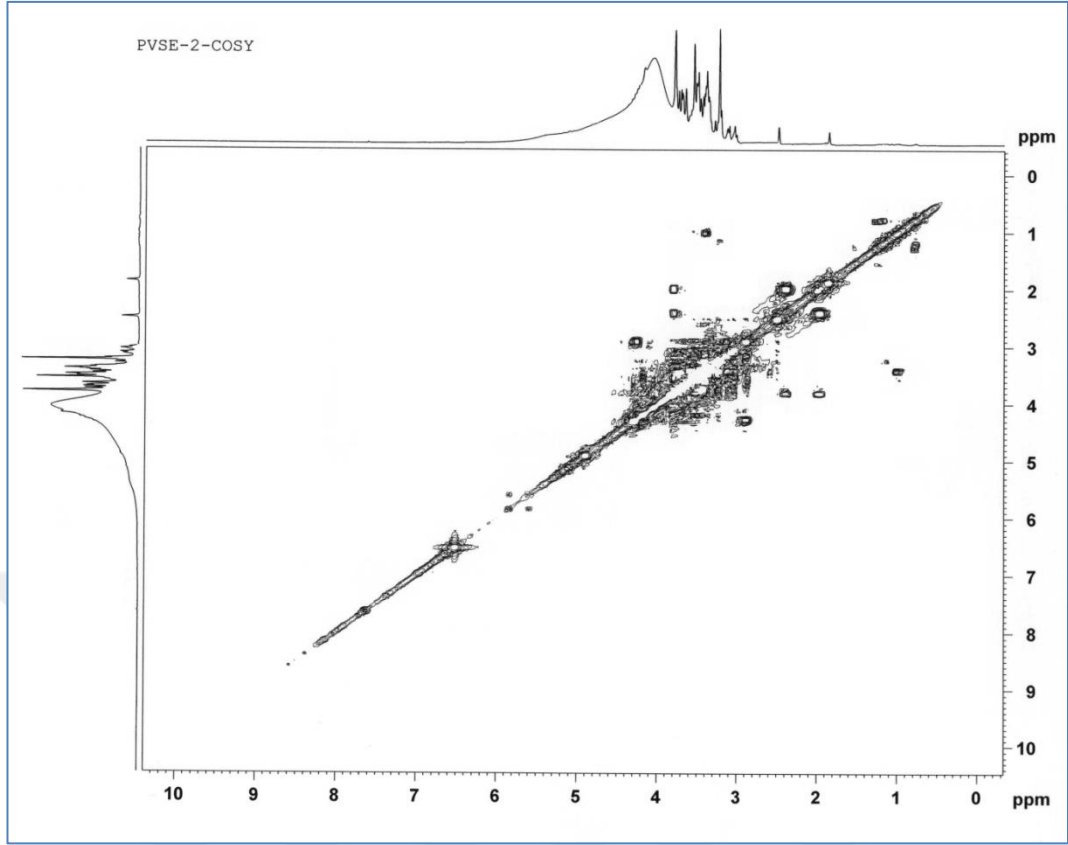
Şekil 3.33. Inulobios (**PVSE-2**) molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3)

Inulobios (1- O - α -D-fructofuranosyl- β -D-fructofuranose) disakkaritinde bağlanma 1 nolu C atomundan iken inulobios molekülünün diğer izomeri olan levanbioz (levanbiose, 6- O - β -D-fructofuranosyl- β -D-fructofuranose) disakkaritinde bağlanma 6 nolu C atomu üzerinden gerçekleşmiştir. Bileşiğin HMBC spektrumundaki (Şekil 3.38) korelasyonlar çok açık bir şekilde gözlemlenemediğinden molekülün birbirine hangi C atomu üzerinden bağlandığı tam olarak belirlenemedi. Bununla beraber, İnulobios (**PVSE-2**) disakkarit molekülü bazı baharat bitkilerinin yanı sıra bir çok bitki türünde daha yaygın olarak bulunan bir moleküldür (Ishiguro ve ark., 2011; Jan Mei ve ark., 2010; Fujishima ve ark., 2009). İnulobios (**PVSE-2**) *Artemisia absinthium* bitkisinin yapraklarının ve *Artemisia dracunculus* (tarragon, tarhun) bitkisinin köklerinin de önemli bir bileşenidir (Ishiguro ve ark., 2011). Bu bilgilerden yola çıkarak bileşiğin kimyasal yapısı bitkiler aleminde daha yaygın olarak bulunan inulobios olarak karakterize edildi ve spektral verileri daha önce yayınlanmış spektral verilerle de ayrıca

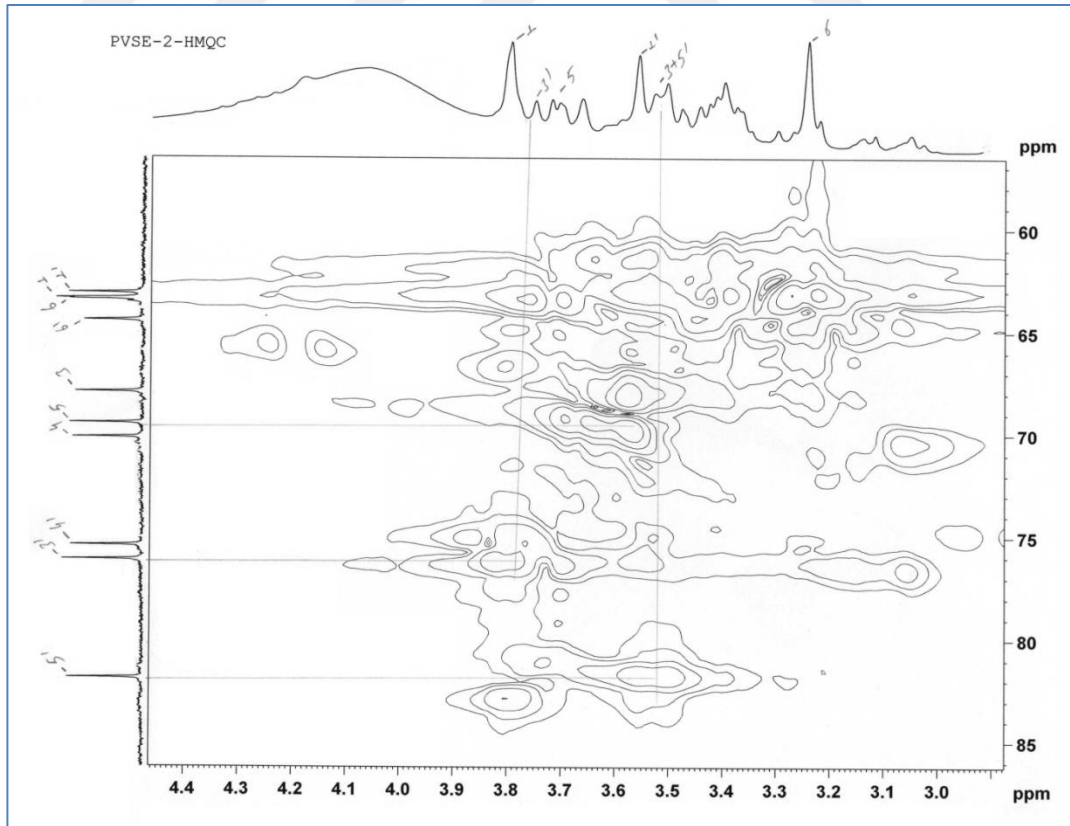
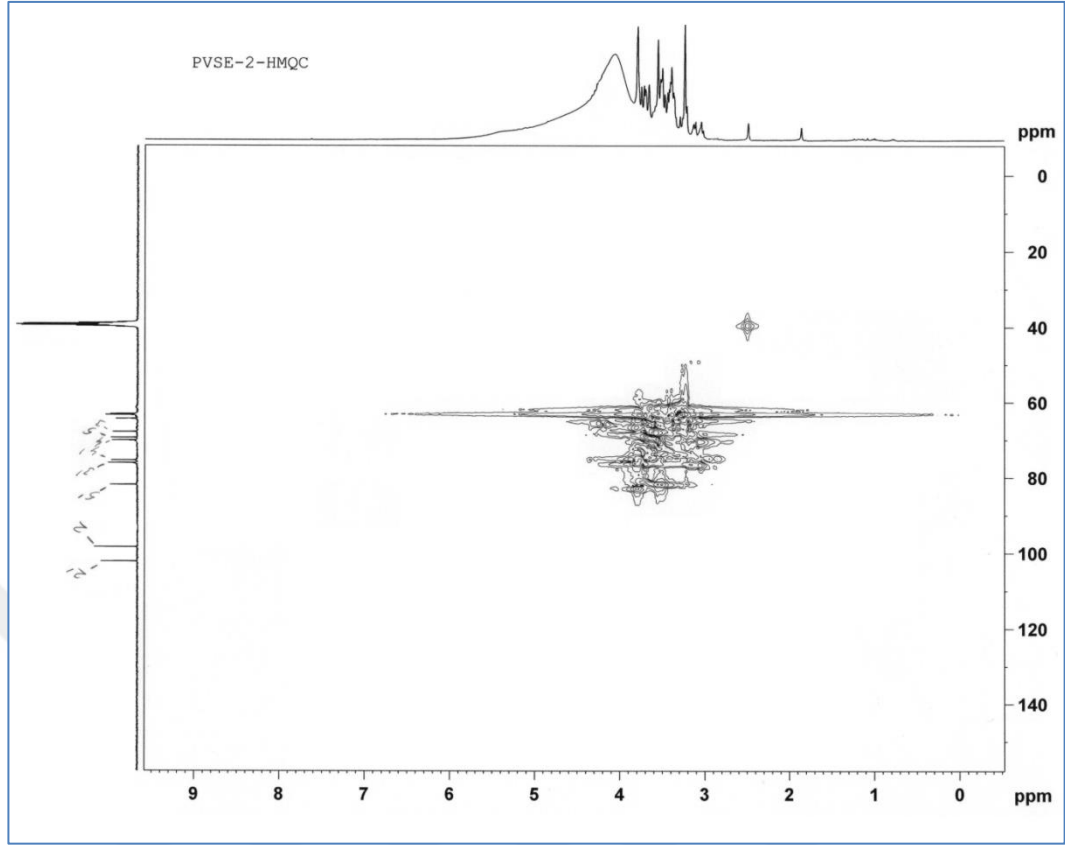
doğrulandı (Yu ve ark., 2015). Inulobioz (**PVSE-2**) molekülü *P. vera* bitkisinde ilk defa bu çalışmada izole edildi ve karakterize edildi. Diğer taraftan, inulinin hidrolizi ile sentezlenen inulobioz böbreğin normal çalışıp çalışmadığını belirlemek üzere medikal uygulamalarda glomerüler filtrasyon hızı (GFR) testi için kullanılan bir moleküldür (Calub ve ark., 1990; Middleton, 1977).



Şekil 3.34. Inulobioz (**PVSE-2**) molekülünün DEPT spektrumları (CDCl₃)



Şekil 3.35. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün ¹H, ¹H-COSY spektrumu (CDCl₃)



Şekil 3.36. Inulobioz (PVSE-2) molekülünün HMQC spektrumu (CDCl_3)

3.3. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları

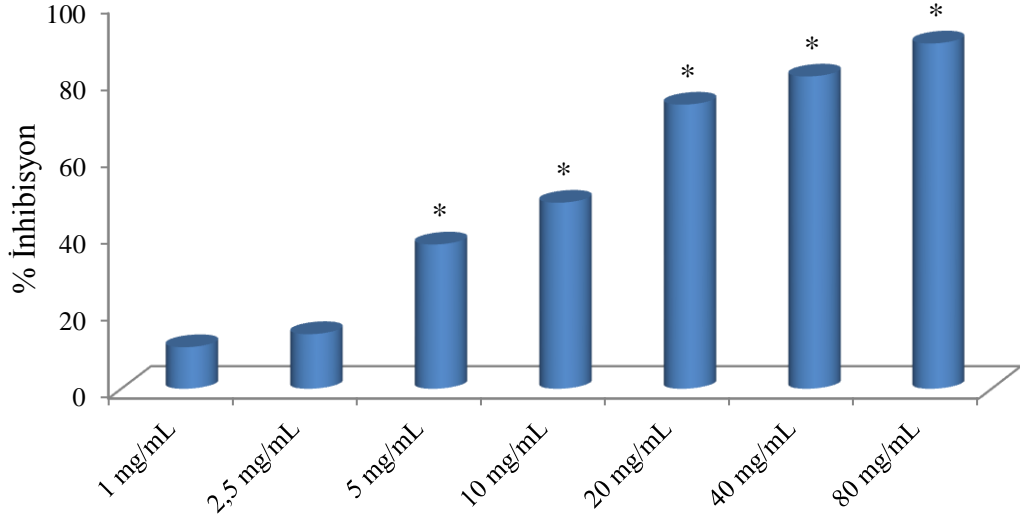
3.3.1. Ekstre ve Saf Metabolitlerin α -Glikozidaz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları

Antep fıstığı sap kısmından farklı organik çözücülerle elde edilen ekstrelerin ve kloroform ve etanol ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan saf metabolitlerin değişik konsantrasyonlarda, *in vitro* şartlarda α -glikozidaz enzimi üzerinde etkileri çizelge ve grafikler halinde sunuldu. Ekstreler ve saf metabolitlerin farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çizelgelerde ortalama absorbans \pm SE ve % inhibisyon halinde verildi. % inhibisyonlar ekstre ve saf maddelerin α -glikozidaz enzim aktiviteleri sonuçları akarboz pozitif kontrolü ile ayrıca mukayese edildi. Akarboz pozitif kontrol olduğu halde çalışılacak konsantrasyonlar olarak belirlenen 1,0 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,1 mg/mL konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi sergilemedi. Bu nedenle çok daha yüksek konsantrasyonlarda (2,5-80 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda) çalışıldı ve 5 mg/mL konsantrasyondan sonra konsantrasyona bağlı olarak artan şiddette bir inhibisyon gözlemlendi. Akarboz ilaç etken maddesinin α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.3 ve Şekil 3.38'de özetlendi. Çizelge 3.3 ve Şekil 3.38'den görüleceği üzere akarbozun 80 mg/mL konsantrasyonda α -glikozidaz enziminin aktivitesini % 89,65 oranında inhibe ettiği tespit edildi.

Çizelge 3.3. Akarbozun α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,396 \pm 0,006fg	-
Enzim + substrat + akarboz	1,0	0,353 \pm 0,009f	10,86
	2,5	0,340 \pm 0,008f	14,14
	5,0	0,248 \pm 0,005e	37,37*
	10	0,205 \pm 0,003d	48,23*
	20	0,104 \pm 0,01c	73,74*
	40	0,073 \pm 0,003b	81,06*
	80	0,041 \pm 0,003a	89,65*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.38. Akarbozun farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi

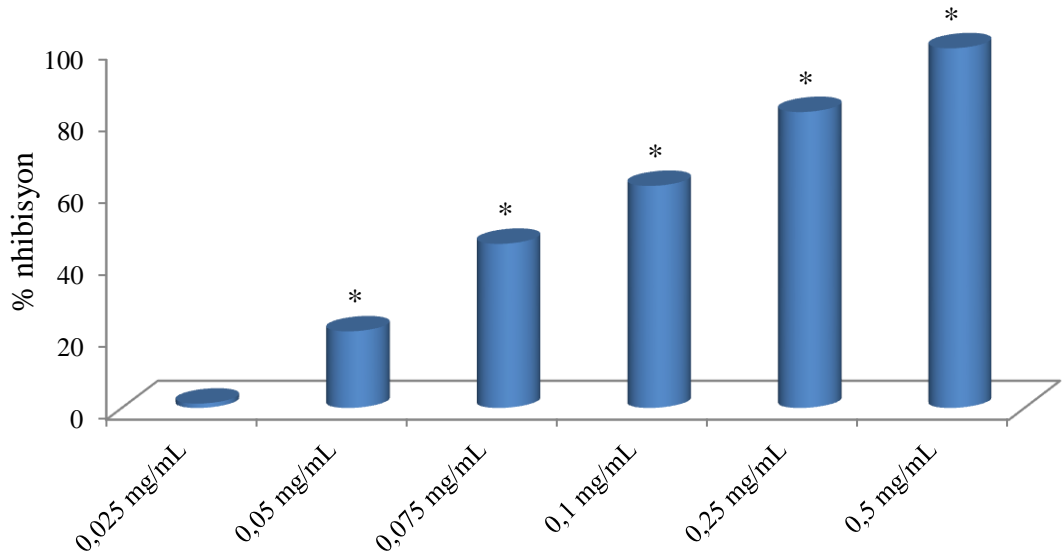
P. vera sap hekzan ekstresinin α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.4'te özetlendi.

Çizelge 3.4. *P. vera* sap hekzan ekstresinin α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,497 \pm 0,009f	-
Enzim + substrat + ekstre	0,025	0,491 \pm 0,004f	1,21
	0,050	0,391 \pm 0,005e	21,33*
	0,075	0,270 \pm 0,004d	45,67*
	0,10	0,190 \pm 0,003c	61,77*
	0,25	0,088 \pm 0,006b	82,29*
	0,50	0,000 \pm 0,000a	100,00*

Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.4'ten görüldüğü üzere hekzan ekstresinin α -glikozidaz enziminin aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi sergiledi. *P. vera* sap hekzan ekstresinin inhibisyon etkisi konsantrasyon artışına bağlı olarak arttı ve 0,50 mg/mL düşük konsantrasyonda tam bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. *P. vera* sap hekzan ekstresinin inhibisyon etkisi ayrıca Şekil 3.39'da gösterildi.



Şekil 3.39. *P. vera* sap hekzan ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -glukozidaz enzimi üzerine etkisi

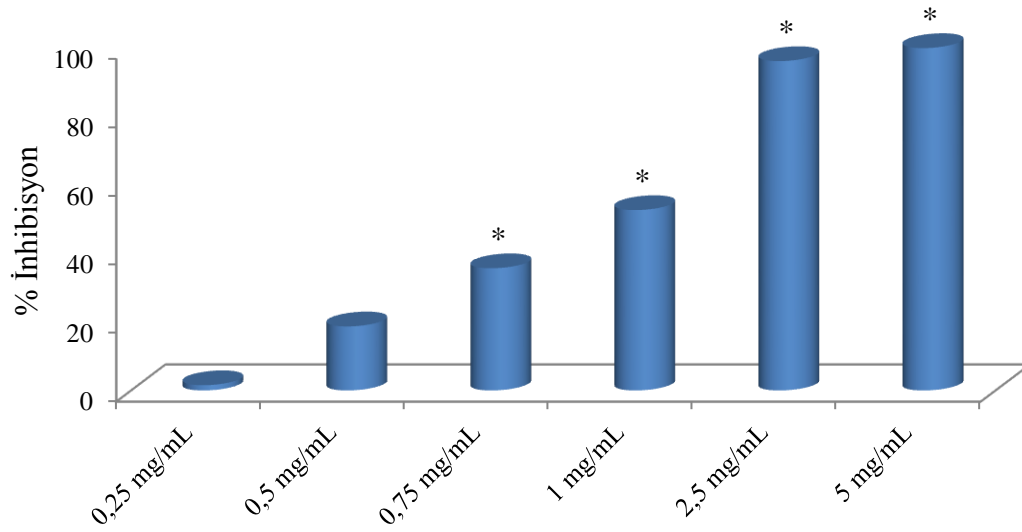
P. vera sap CHCl_3 ekstresinin α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.5'te özetlendi.

Çizelge 3.5. *P. vera* sap CHCl_3 ekstresinin α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,524 \pm 0,005f	-
Enzim + substrat + ekstre	0,25	0,516 \pm 0,003f	1,53
	0,50	0,426 \pm 0,011e	18,70*
	0,75	0,337 \pm 0,003d	35,69*
	1,00	0,248 \pm 0,001c	52,67*
	2,50	0,020 \pm 0,003b	96,18*
	5,00	0,000 \pm 0,000a	100,00*

Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.5'ten görüldüğü üzere kloroform ekstresinin α -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine yüksek konsantrasyonlarda (0,5-5 mg/mL) anlamlı bir inhibisyon etkisi sergilediği tespit edildi. Çizelge 3.5 ve Şekil 3.40'den görüleceği üzere *P. vera* sap kloroform ekstresi 5 mg/mL konsantrasyonda α -glukozidaz enzimini tamamen inhibe etti.



Şekil 3.40. *P. vera* sap kloroform ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -glukozidaz enzimi üzerine etkisi

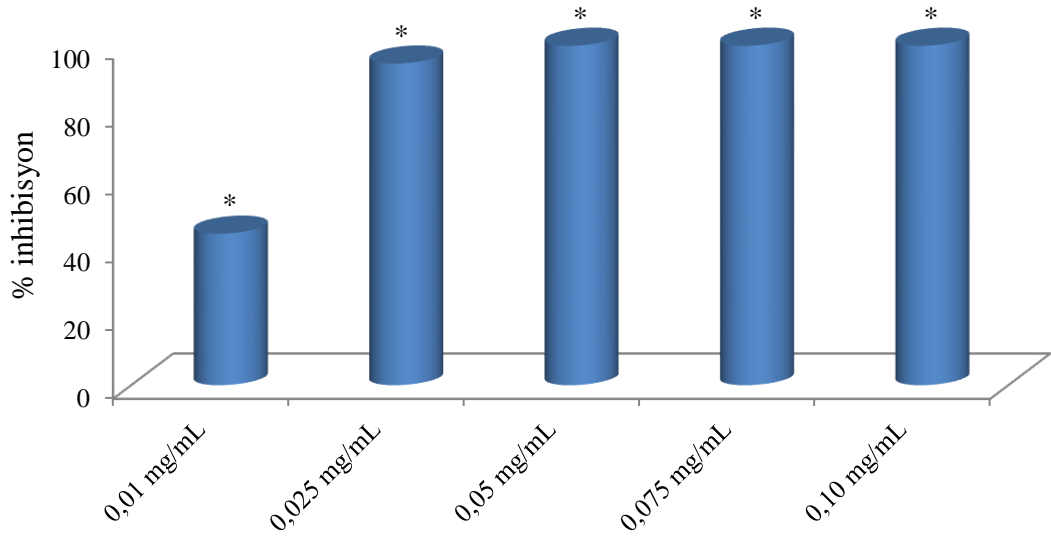
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.6'da özetlendi.

Çizelge 3.6. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**)'in α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,306 \pm 0,006 c	-
Enzim + substrat + mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2)	0,05	0,260 \pm 0,005 c	15,03
	0,1	0,169 \pm 0,013 b	44,77*
	0,25	0,016 \pm 0,004 a	94,77*
	0,5	0,000 \pm 0,000 a	100,00*
	0,75	0,000 \pm 0,000 a	100,00*
	1	0,000 \pm 0,000 a	100,00*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.6'da görüleceği üzere mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün α -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine kloroform ekstresine nazaran çok daha güçlü bir inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülü çok düşük konsantrasyonlarda dahi güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 3.41).



Şekil 3.41. Mastikadionik asit (PVSC-1 ve PVSC-2) molekülünün α-glikozidaz enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan **tirukallol (PVSC-3)** molekülünün α-glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.7. de özetlendi.

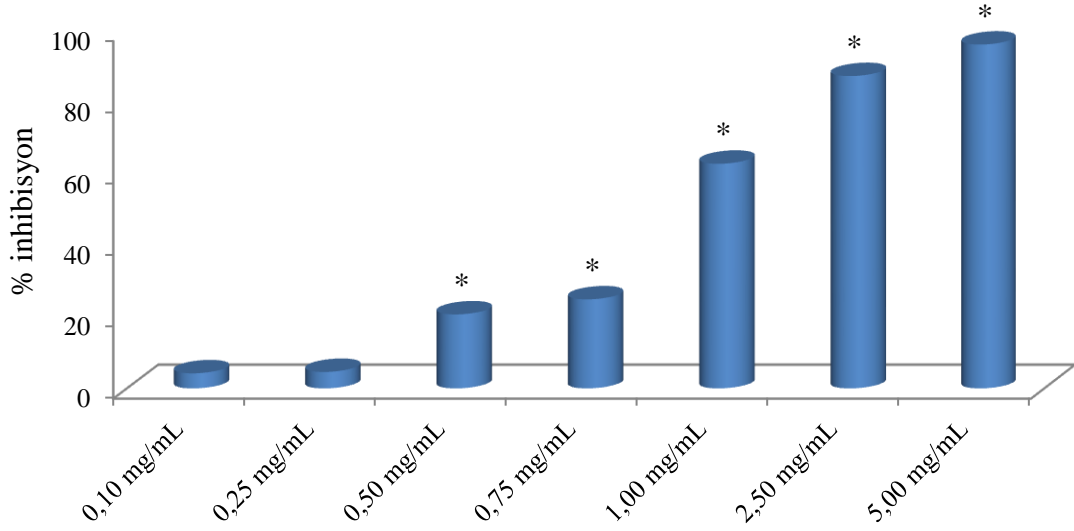
Çizelge 3.7. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün α-glikozidaz enzim üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,261±0,003 e	-
	0,1	0,250±0,006 e	4,21
	0,25	0,249±0,005 e	4,60
	0,5	0,207±0,008 d	20,69*
Enzim + substrat + PVSC-3	0,75	0,196±0,005 d	24,90*
	1	0,097±0,004 c	62,83*
	2,5	0,033±0,003 b	87,36*
	5	0,010±0,000 a	96,17*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.7 ve Şekil 3.42'den görüleceği üzere **tirukallol (PVSC-3)** molekülünün α-glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine istatiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisinin olduğu tespit edildi. Ancak, **tirukallol (PVSC-3)** molekülünün inhibisyon etkisi daha

yüksek konsantrasyonlarda gözlemlendi (0,50-5 mg/mL konsantrasyon aralığı) ve madde 5 mg/mL konsantrasyonda enzimi % 96,17 oranında inhibe etti.



Şekil 3.42. Tirukallol (PVSC-3) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α-glikozidaz enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan **mastikadienolik asit (PVSC-4)** molekülünün α-glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.8’de özetlendi.

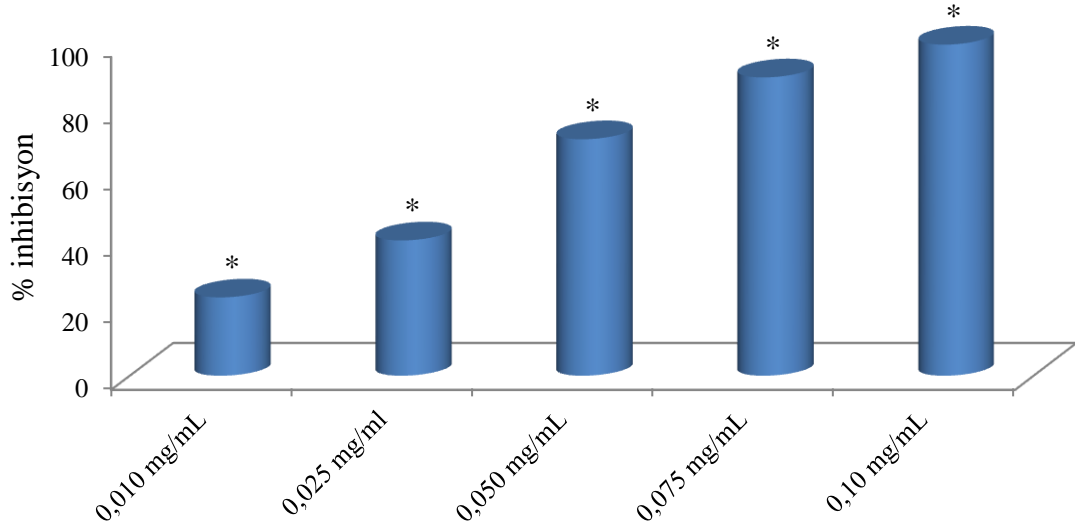
Çizelge 3.8. Mastikadienolik asit (PVSC-4)’in α-glikozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,356±0,012 f	-
Enzim + substrat + PVSC-4	0,010	0,272±0,009 e	23,60*
	0,025	0,211±0,012 d	40,73*
	0,050	0,103±0,004 c	71,07*
	0,075	0,037±0,004 b	89,61*
	0,1	0,002±0,001 a	99,44*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.8 ve Şekil 3.43. den görüleceği üzere **mastikadienolik asit (PVSC-4)**’ in düşük konsantrasyonlarda dahi α-glikozidaz enziminin aktivitesi üzerine istatiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. **Mastikadienolik asit**

(PVSC-4)' in enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi konsantrasyon artışına bağlı olarak da artmaktadır.



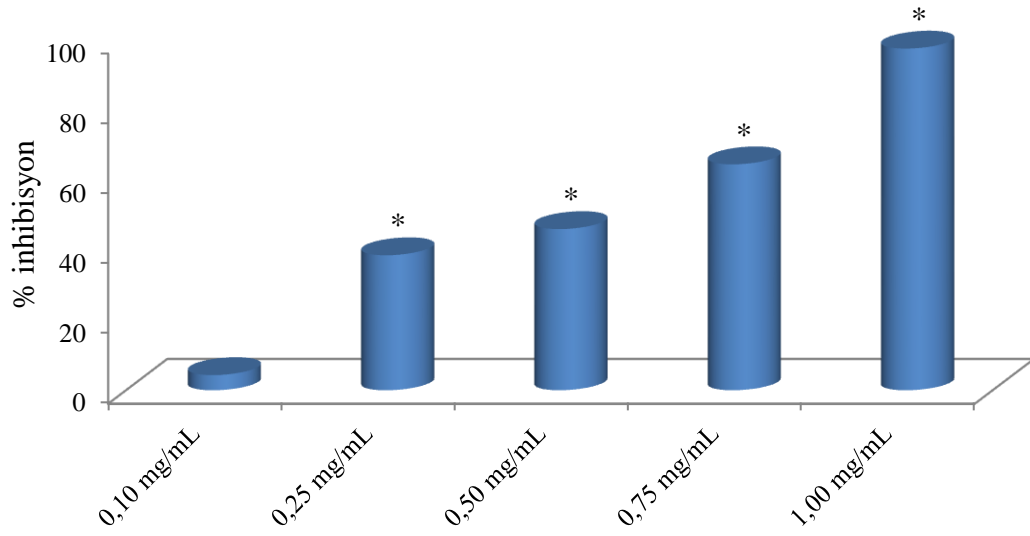
Şekil 3.43. Mastikadienolik asit (PVSC-4)'in farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarından elde edilen etanol ekstresinin α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.9'de özetlendi.

Çizelge 3.9. *P. vera* sap etanol ekstresinin α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,254 \pm 0,004 e	-
Enzim + substrat + PVSE	0,10	0,243 \pm 0,001 e	4,33
	0,25	0,156 \pm 0,001 d	38,58*
	0,50	0,137 \pm 0,001 c	46,06*
	0,75	0,090 \pm 0,001 b	64,57*
	1	0,006 \pm 0,001 a	97,64*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.44. Etanol ekstresinin α -glukozidaz enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.9 ve Şekil 3.44'ten görüldüğü üzere etanol ekstresinin α -glukozidaz enziminin aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon etkisinin olduğu tespit edildi. Etanol ekstresinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmakta olup, ekstrenin 1 mg/mL konsantrasyonunun α -glukozidaz enzimini % 97,64 oranında inhibe ettiği belirlendi.

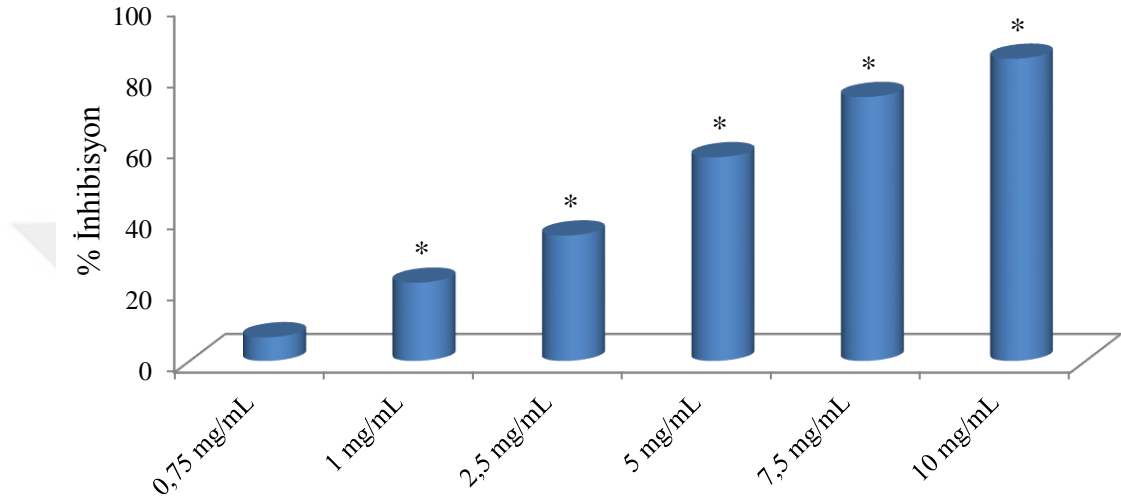
P. vera sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle yeni bir bileşik olarak saflaştırılan ve **pistasionikasit** olarak kodlanan **PVSE-1** molekülünün α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.10'da özetlendi.

Çizelge 3.10. PVSE-1 molekülünün α -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,437 \pm 0,003fg	-
Enzim + substrat + pistasionikasit (PVSE-1)	0,75	0,408 \pm 0,004f	6,64
	1	0,341 \pm 0,006e	21,97*
	2,5	0,283 \pm 0,006d	35,24*
	5	0,187 \pm 0,005c	57,21*
	7,5	0,113 \pm 0,006b	74,14*
	10	0,066 \pm 0,006a	84,90*

*İstatistiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.10 ve Şekil 3.45'ten görüleceği üzere **pistasionikasit PVSE-1** molekülünün α -glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine yüksek konsantrasyonlarda anlamlı inhibisyon etki sergilediği belirlendi. Diğer taraftan **pistasionikasit (PVSE-1)** molekülünün saflaştırıldığı etanol ekstresi saf moleküle nazaran α -glikozidaz enzimine karşı daha güçlü bir inhibitör olarak davrandığı gözlemlendi.



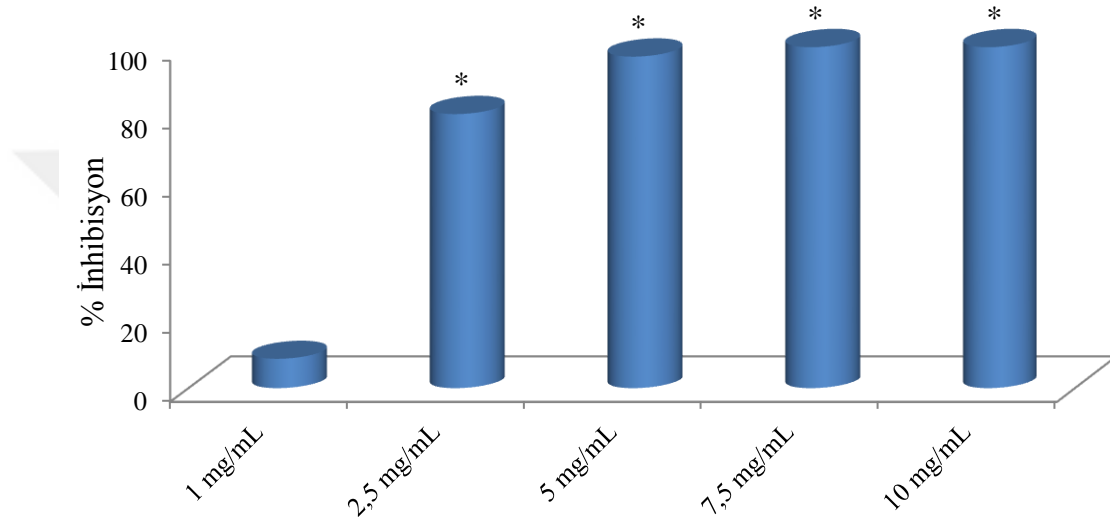
Şekil 3.45. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi *P. vera* sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan difruktan disakkarit (**inulobioz, PVSE-2**) molekülünün α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.11' de özetlendi.

Çizelge 3.11. **PVSE-2** molekülünün α -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,471±0,006de	-
Enzim + substrat + inulobioz (PVSE-2)	1	0,430±0,006d	8,70
	2,5	0,092±0,004c	80,47*
	5	0,013±0,001b	97,24*
	7,5	0,000±000a	100,00*
	10	0,000±000a	100,00*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.11 ve Şekil 3.46’da görüleceği üzere **inulobioz (PVSE-2)** disakkarit molekülünün α -glikozidaz enzimi aktivitesi üzerine, düşük konsantrasyonlarda herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenememişken, yüksek konsantrasyonlarda önemli bir inhibisyon etkisi belirlenmiştir. **İnulobioz (PVSE-2)** molekülünün saflaştırıldığı etanol ekstresi saf moleküle göre α -glikozidaz enzimine karşı daha güçlü bir inhibitör olarak davranmıştır. Diğer taraftan **inulobioz (PVSE-2)** molekülünün inhibisyon etkisi **pistasionik asit (PVSE-1)** molekülüne nazaran daha yüksek oranda tespit edildi.



Şekil 3.46. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün α -glikozidaz enzimi üzerine etkisi

Hem ekstre hem de saf metabolitler farklı konsantrasyonlarda α -glikozidaz enzimine karşı değişik enzim aktiviteleri sergilemiştir. Enzim aktivitelerini kendi aralarında mukayese etmek üzere enzim aktivitesi sergileyen her bir uygulama için IC_{50} ve IC_{90} değerleri belirlenmiş ve Çizelge 3.12’de sunulmuştur.

Çizelge 3.12. α -Glikozidaz enzimine karşı etkili uygulamaların IC_{50} ve IC_{90} değerleri

Uygulama ismi	IC_{50} (mg/mL)	IC_{90} (mg/mL)
Akarboz	10,30	66,95
Hekzan ekstresi	0,09	0,38
Kloroform ekstresi	0,98	2,19
Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve 2)	0,13	0,23
Tirukallol (PVSC-3)	1,07	2,46
Mastikadienolik asit (PVSC-4)	0,03	0,08
Etanol ekstresi	0,52	0,95
Pistasionik asit (PVSE-1)	4,44	10,16
Inulobioz (PVSE-2)	1,87	3,81

Çizelge 3.12’de görüldüğü üzere en düşük IC_{50} ve IC_{90} değerleri kloroform ekstresinden saflaştırılan mastikadienolik asit (**PVSC-4**) için (sırasıyla 0,03 ve 0,08 mg/mL) hesaplanmıştır. Bu veriler test edilen uygulamalar arasında α -glukozidaz enzimi için en iyi inhibitörün mastikadienolik asit (**PVSC-4**) olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan pozitif kontrol akarboz ile mukayese edildiğinde tüm uygulamaların akarboza göre çok daha güçlü inhibitörler olduğu belirlenmiştir. Mastikadienolik asitten (**PVSC-4**) sonraki en güçlü inhibitörler olarak en düşük IC_{50} ve IC_{90} değerlerine göre mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) ($IC_{50}=0,13$ mg/mL ve $IC_{90}=0,23$ mg/mL) molekülleri ile hekzan ekstresi ($IC_{50}=0,09$ mg/mL ve $IC_{90}=0,38$ mg/mL) belirlenmiştir. Çalışma sonuçları bize ayrıca etanol ekstresinin daha düşük IC_{50} ve IC_{90} değerleri ile ($IC_{50}=0,52$ mg/mL ve $IC_{90}=0,95$ mg/mL) bu ekstreden saflaştırılan pistasionikasit (**PVSE-1**) ($IC_{50}=4,44$ mg/mL ve $IC_{90}=10,16$ mg/mL) ve inulobioz (**PVSE-2**) ($IC_{50}=1,87$ mg/mL ve $IC_{90}=3,81$ mg/mL) oligosakkarit moleküllerine nazaran daha güçlü bir inhibitör olduğunu göstermiştir.

3.3.2. Ekstre ve Saf Metabolitlerin α -Amilaz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları

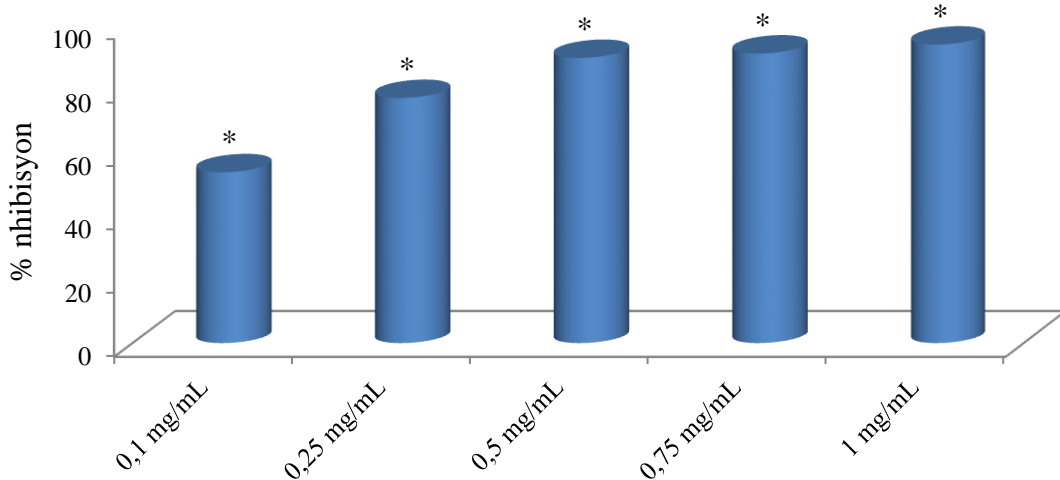
Antep fıstığı sap kısmından farklı organik çözücülerle elde edilen ekstrelerin ve kloroform ve etanol ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan saf metabolitlerin değişik konsantrasyonlarda α -amilaz enzim aktiviteleri sonuçları çizelge ve grafikler halinde sunuldu. Ekstreler ve saf metabolitlerin farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çizelgelerde ortalama absorban \pm SE ve % inhibisyonlar halinde verildi. İnhibisyonlar % olarak hesaplandı ve çizelgelerde verildi. Ekstre ve saf maddelerin α -amilaz enzim aktiviteleri sonuçları akarboz ile ayrıca mukayese edildi.

Akarbozun α -amilaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.13 ve Şekil 3.47. de özetlendi.

Çizelge 3.13. Akarbozun α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,215 \pm 0,004e	-
	0,10	0,099 \pm 0,002d	53,95*
	0,25	0,049 \pm 0,003c	77,21*
Enzim + substrat + akarboz	0,50	0,022 \pm 0,001b	89,77*
	0,75	0,019 \pm 0,002ab	91,16*
	1,00	0,013 \pm 0,002a	93,95*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.47. Akarbozun farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.13 ve Şekil 3.47 de görüldüğü üzere insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabetin tedavisinde kullanılan ilaç etken maddesi psödotetrasakkarit akarboz molekülünün α -amilaz enzimini beklenildiği gibi kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği görülmektedir.

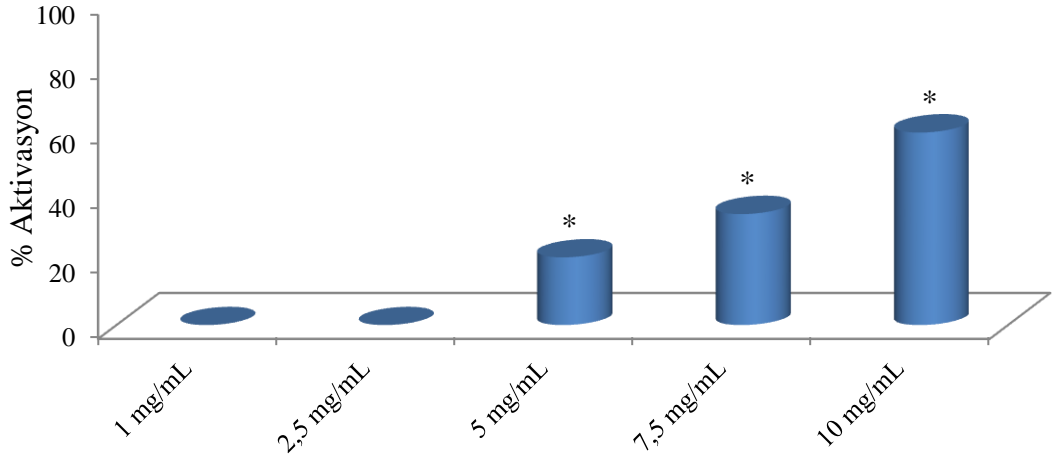
α -Amilaz enzimine yönelik yapılan enzim inhibisyon çalışmalarında maddelerin α -glikozidaz enziminin aksine daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğu gözlemlendi. Bu nedenle ekstreler ve saf metabolitlerin α -amilaz enziminin aktivitesine karşı etkilerini belirlemek üzere 10 mg/mL, 7,5 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL ve 1,0 mg/mL konsantrasyonlar kullanıldı. Bazı maddelerin ise bu konsantrasyonlarda dahi etkili olmadığı belirlendiği için daha yüksek konsantrasyonlarda çalışıldı ve sonuçlar aşağıda sunuldu.

P. vera sap hekzan ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.14 ve Şekil 3.48’de özetlendi.

Çizelge 3.14. *P. vera* sap hekzan ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,275±0,004 a	-
	1	0,271±0,005 a	1,46
	2,5	0,269±0,004 a	2,18
Enzim + substrat + ekstre	5,0	0,333±0,002 b	-21,09*
	7,5	0,370±0,005 c	-34,55*
	10	0,439±0,006 d	-59,64*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.48. Sap hecizan ekstresinin α -amilaz enzimi üzerine etkisi

Şekil 3.48 den görüldüğü üzere hecizan ekstresinin α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine düşük konsantrasyonlarda (1 mg/mL ve 2,5 mg/mL) istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisi yok iken 5,0 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda enzimin aktivitesini artırmıştır. Çizelge 3.14 ve Şekil 3.48’de görüldüğü üzere hecizan ekstresi enzimin aktivitesini % 59,64 oranında artırmıştır.

P. vera sap kloroform ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.15’de özetlendi.

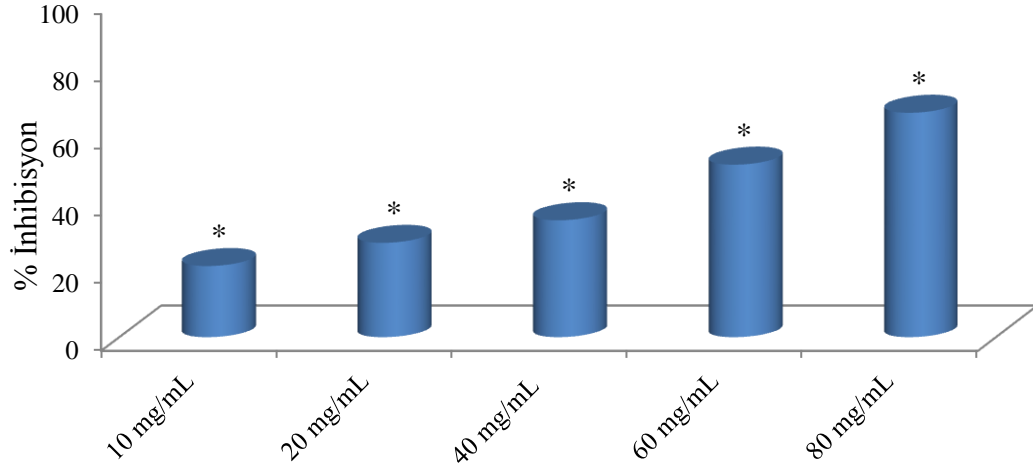
Çizelge 3.15. *P. vera* sap CHCl_3 ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,448 \pm 0,009f	-
	10	0,353 \pm 0,008e	21,21*
	20	0,322 \pm 0,013d	28,13*
Enzim + substrat + ekstre	40	0,274 \pm 0,004c	38,84*
	60	0,218 \pm 0,002b	51,34*
	80	0,149 \pm 0,003a	66,74*

*İstatistiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.15 ve Şekil 3.49’de görüleceği üzere kloroform ekstresi yüksek konsantrasyonlarda α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı

inhibisyon etkisi sergiledi ve ekstrenin 80 mg/mL konsantrasyonunun enzim aktivitesini % 66,74 oranında inhibe ettiği belirlendi.



Şekil 3.49. Sap CHCl₃ ekstresinin α -amilaz enzimi üzerine etkisi

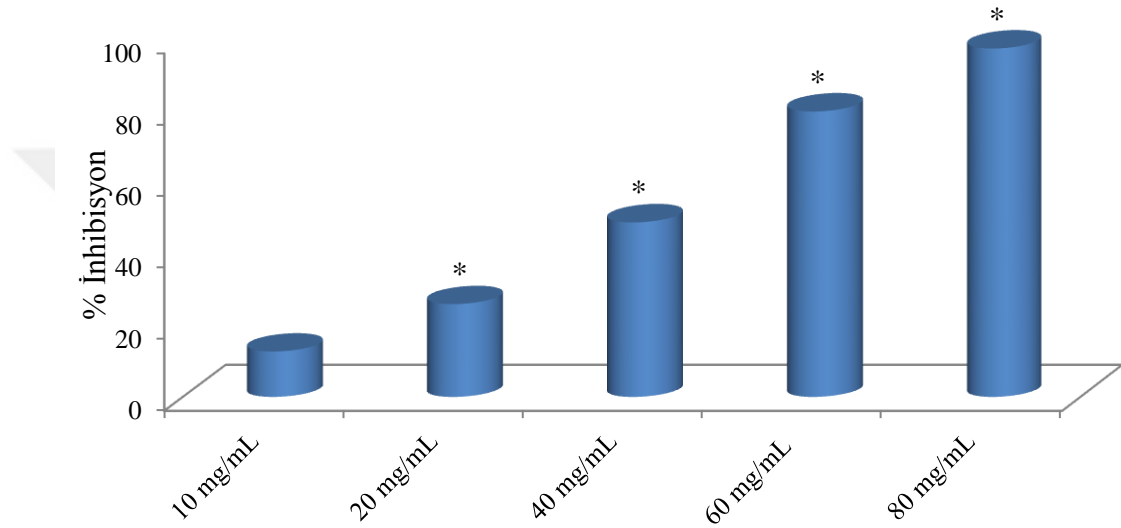
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün α -amilaz enziminin aktivitesine karşı inhibisyon etkisini test etmek üzere önce düşük konsantrasyonlarda çalışıldı. Ancak, 10 mg/mL konsantrasyona kadar herhangi bir inhibisyon etkisi belirlenemedi. Bu nedenle çalışma daha yüksek konsantrasyonlar da tekrarlandı ve sonuçlar Çizelge 3.16 de özetlendi.

Çizelge 3.16. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,359 \pm 0,002ef	-
Enzim + substrat + mastikadienonik asit (PVSC-1 ve 2)	10	0,313 \pm 0,010e	12,81
	20	0,265 \pm 0,004d	26,18*
	40	0,183 \pm 0,009c	49,03*
	60	0,072 \pm 0,002b	79,94*
	80	0,009 \pm 0,001a	97,49*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.16 ve Şekil 3.50’de görüleceği üzere mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülü 20 mg/mL ve bu değerin üstündeki konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi sergiledi. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün enzim inhibisyon etkisi konsantrasyon artışı ile beraber artarak 80 mg/mL yüksek konsantrasyonda % 97,49 oranında bir inhibisyon etkisi gösterdi.



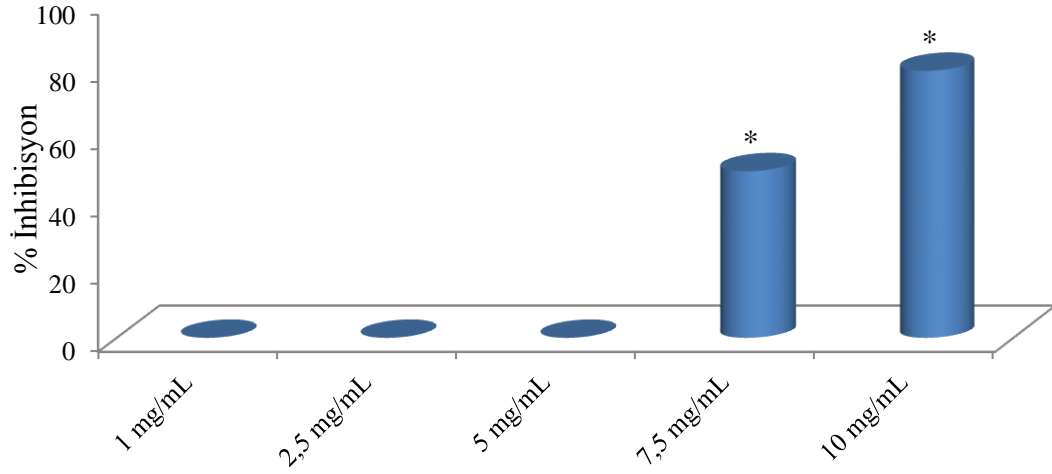
Şekil 3.50. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan **tirukallol (PVSC-3)** molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.17’de özetlendi.

Çizelge 3.17. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün α -amilaz enzimi aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,305±0,008 c	-
Enzim + substrat + PVSC-3	1	0,310±0,009 c	-1,64
	2,5	0,305±0,006 c	0,00
	5,0	0,309±0,009 c	-1,31
	7,5	0,154±0,004 b	49,51*
	10	0,063±0,006 a	79,34*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.51. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.17 ve Şekil 3.51’de görüldüğü üzere tirukallol (**PVSC-3**) molekülü yüksek konsantrasyonlarda (7,5 mg/mL ve 10 mg/mL) α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine önemli oranda bir inhibisyon etkisi sergiledi.

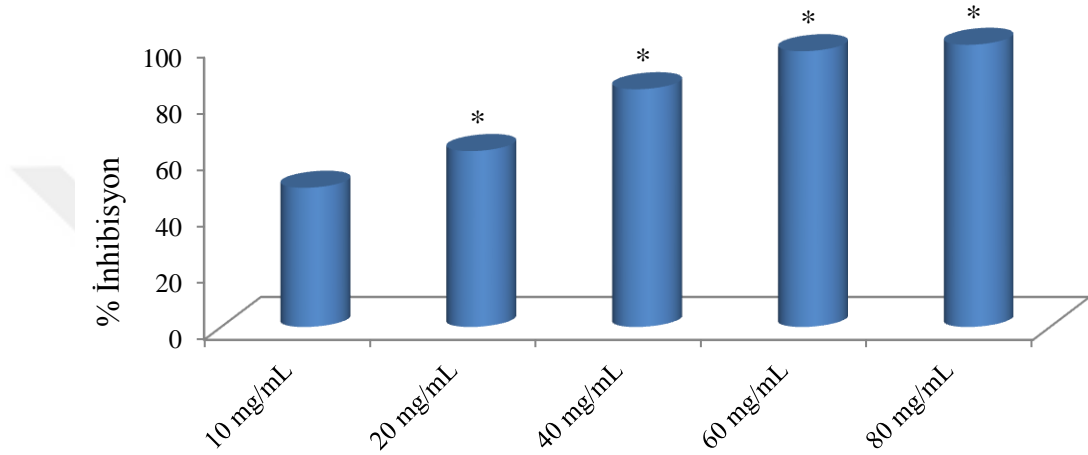
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan **mastikadienolik asit (PVSC-4)** molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.18’de özetlendi.

Çizelge 3.18. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**)’in α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,439 \pm 0,011e	-
Enzim + substrat + mastikadienolik asit (PVSC-4)	10	0,222 \pm 0,006d	49,43*
	20	0,165 \pm 0,003c	62,42*
	40	0,069 \pm 0,005b	84,28*
	60	0,010 \pm 0,001a	97,72*
	80	0,000 \pm 0,000a	100,00*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün α -amilaz enziminin aktivitesine karşı inhibisyon etkisini test etmek üzere önce düşük konsantrasyonlarda çalışılmış ancak 10 mg/mL konsantrasyona kadar herhangi bir inhibisyon etkisi belirlenmemiştir. Çizelge 3.18 ve Şekil 3.52’de görüleceği üzere Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülü 10 mg/mL konsantrasyonda α -amilaz enziminin aktivitesini % 49,43 oranında inhibe ederken, 60 mg/mL konsantrasyonda % 97,92 oranında inhibe ettiği belirlendi.



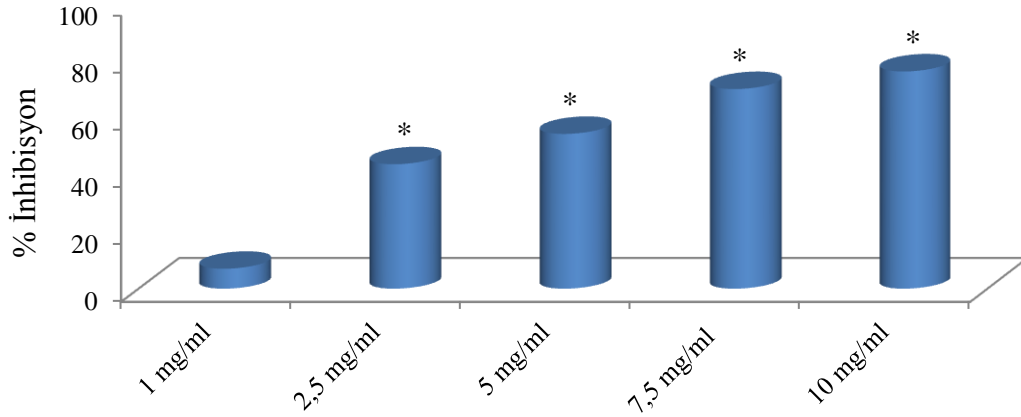
Şekil 3.52. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarından elde edilen etanol ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.19’da özetlendi.

Çizelge 3.19. *P. vera* sap etanol ekstresinin α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,358±0,004 ef	-
Enzim + substrat + PVSE	1	0,333±0,005 e	6,98
	2,5	0,202±0,006 d	43,58*
	5,0	0,164±0,002 c	54,19*
	7,5	0,108±0,007 b	69,83*
	10	0,086±0,006 a	75,98*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.53. Etanol ekstresinin farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi

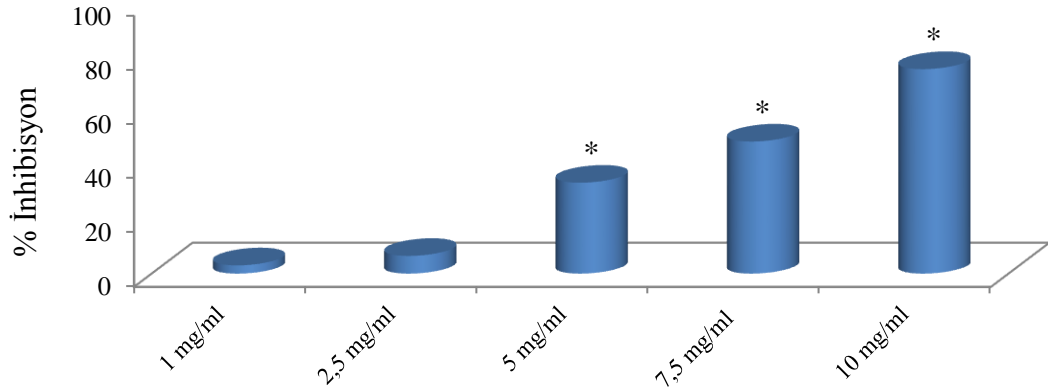
Çizelge 3.19 ve Şekil 3.53'te görüldüğü üzere etanol ekstresinin α -amilaz enziminin aktivitesi üzerine 1 mg/mL konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon etkisinin olduğu tespit edildi. Etanol ekstresinin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi konsantrasyon artışına bağlı olarak da artmış ve 10 mg/mL konsantrasyonu % 75,98 inhibisyon neden olmuştur.

P. vera sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle yeni bir molekül olarak saflaştırılan ve pistasionikasit olarak isimlendirilen **PVSE-1** molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.20'de özetlendi.

Çizelge 3.20. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,229 \pm 0,003 d	-
Enzim + substrat + PVSE-1	1	0,222 \pm 0,003 d	3,06
	2,5	0,214 \pm 0,004 d	6,55
	5,0	0,152 \pm 0,007 c	33,63*
	7,5	0,124 \pm 0,004 b	45,85*
	10	0,056 \pm 0,004 a	75,55*

*İstatistiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.



Şekil 3.54. Pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülünün farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.20 ve Şekil 3.54'te görüldüğü üzere pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülünün α -amilaz enzimi aktivitesi üzerine, yüksek konsantrasyonlarda (5 mg/mL, 7,5 mg/mL ve 10 mg/mL) konsantrasyon artışına bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon etkisi sergilediği gözlemlendi. Diğer taraftan pistasionikasit (**PVSE-1**)'in saflaştırıldığı etanol ekstresi **PVSE-1**'e nazaran daha güçlü bir inhibitör olarak davranmıştır.

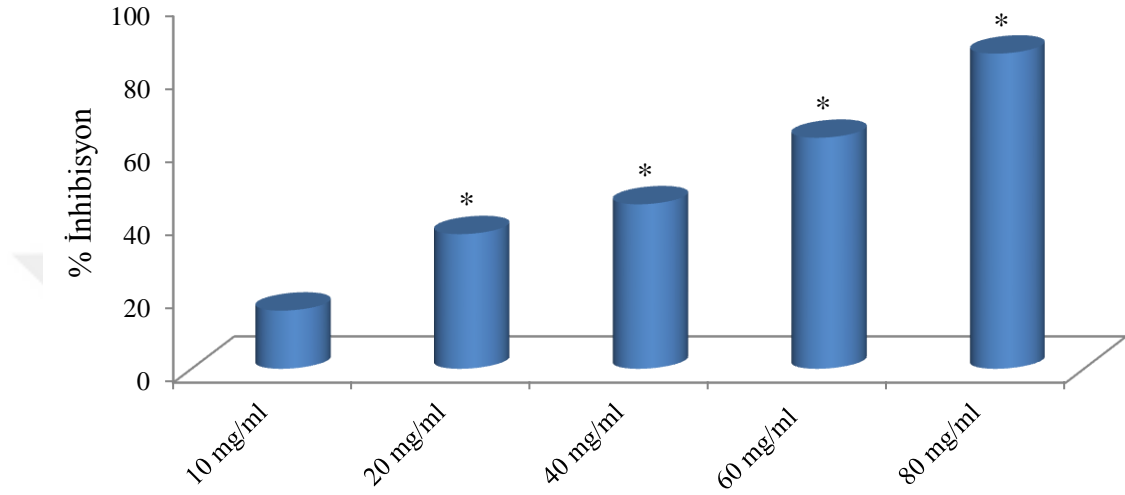
P. vera sap kısımlarının etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan disakkarit molekülü inulobioz (**PVSE-2**) molekülü düşük konsantrasyonlarda (1-10 mg/mL konsantrasyon aralığı) α -amilaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek üzere test edildi. Ancak düşük konsantrasyonlarda inulobioz (**PVSE-2**) molekülü herhangi bir inhibisyon etkisi göstermedi. Bu nedenle madde daha yüksek konsantrasyonlarda α -amilaz enzimine karşı test edildi ve deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.21'de özetlendi.

Çizelge 3.21. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,479±0,005f	-
Enzim + substrat + inulobioz	10	0,403±0,006e	15,87*
	20	0,303±0,004d	36,74*
	40	0,264±0,012c	44,89*
	60	0,177±0,004b	63,04*
	80	0,067±0,009a	86,01*

*İstatistiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.21 ve Şekil 3.55'ten görüleceği üzere inulobioz (**PVSE-2**) molekülü α -amilaz enziminin aktivitesine karşı yüksek konsantrasyonlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak anlamlı bir inhibisyon etkisi sergiledi. İnulobioz (**PVSE-2**) molekülü 80 mg/mL konsantrasyonda enzim aktivitesini % 86,01 oranında inhibe ettiği gözlemlendi.



Şekil 3.55. İnulobioz (**PVSE-2**) molekülünün α -amilaz enzimi üzerine etkisi

Hem ekstre hem de saf metabolitler farklı konsantrasyonlarda α -amilaz enzimine karşı değişik enzim aktiviteleri sergilemiştir. Enzim aktivitelerini kendi aralarında mukayese etmek üzere enzim aktivitesi sergileyen her bir uygulama için IC_{50} ve IC_{90} değerleri belirlenmiş ve Çizelge 3.22'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. α -Amilaz enzimine karşı aktif uygulamaların IC_{50} ve IC_{90} değerleri

Uygulama ismi	IC_{50} (mg/mL)	IC_{90} (mg/mL)
Akarboz	0,07	0,66
Hekzan ekstresi	-	-
Kloroform ekstresi	55,89	118,84
Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve -2)	39,45	71,79
Tirukalol (PVSC-4)	7,58	10,59
Mastikadienolik asit (PVSC-5)	8,22	49,54
Etanol ekstresi	5,17	10,97
Pistasionikasit (PVSE-1)	7,35	11,94
Inulobioz (PVSE-2)	40,72	88,81

-:Aktif olmadığı için değerler hesaplanmadı.

Çizelge 3.22'den görüldüğü üzere en düşük IC_{50} ve IC_{90} değerleri insüline bağlı ve insüline bağlı olmayan diyabet tedavisinde kullanılan akarboz ilaç etken maddesi için belirlenmiştir. Örnekler için belirlenen IC_{50} ve IC_{90} değerleri akarbozun *P. vera* sap kısmından elde edilen ekstreler ile kloroform ekstresinden izole edilen saf metabolitlere nazaran çok daha güçlü bir inhibitör olduğunu göstermektedir. Mevcut sonuçlar test edilen tüm örnekler arasında en aktif uygulamaların en düşük IC_{50} ve IC_{90} değerleri ile etanol ekstresi ($IC_{50}=5,17$ mg/mL ve $IC_{90}=10,97$ mg/mL), pistasionikasit (**PVSE-1**) ($IC_{50}=7,35$ mg/mL ve $IC_{90}=11,94$ mg/mL) ve tirukallol (**PVSC-3**) ($IC_{50}=7,58$ mg/mL ve $IC_{90}=10,59$ mg/mL) molekülleri olduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçlar bize ayrıca etanol ekstresinin ve etanol ekstresinden saflaştırılan pistasionikasit (**PVSE-1**) ve de inulobioz (**PVSE-2**) oligosakkaritlerine göre daha iyi bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

3.3.3. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Asetilkolin Esteraz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları

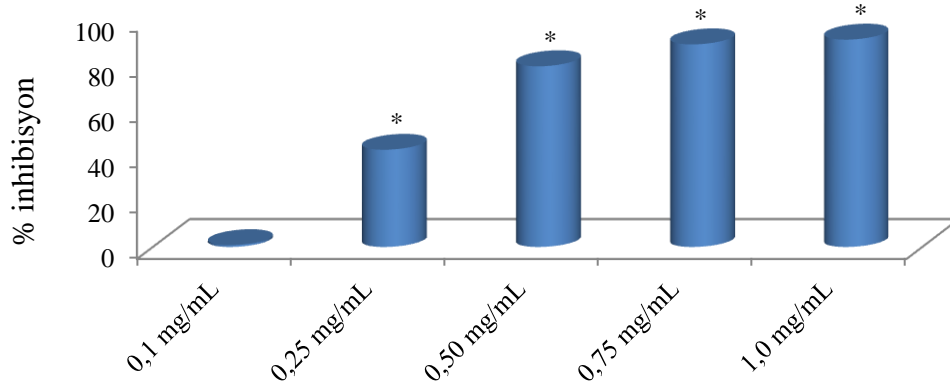
Antepfıstığı sap kısmından farklı organik çözücülerle elde edilen ekstrelerin ve kloroform ve etanol ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan saf metabolitlerin değişik konsantrasyonlarda asetilkolin esteraz enzim aktiviteleri sonuçları çizelge ve grafikler halinde sunuldu. Ekstreler ve saf metabolitlerin farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine olan etkileri çizelgelerde ortalama absorbans \pm SE ve % inhibisyonlar halinde verildi. Ekstre ve saf maddelerin asetilkolin esteraz enzim aktiviteleri sonuçları neostigmin ve galantamin ile ayrıca mukayese edildi.

Kolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılan neostigmin ve galantamin moleküllerinin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.23 ve 3.24’te özetlendi.

Çizelge 3.23. Neostigmin molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,240 \pm 0,008 d	-
Enzim + substrat + neostigmin	0,10	0,238 \pm 0,010 d	0,83
	0,25	0,137 \pm 0,004 c	42,92*
	0,50	0,049 \pm 0,006 b	79,58*
	0,75	0,026 \pm 0,004 a	89,17*
	1,00	0,021 \pm 0,002 a	91,25*

*İstatistiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

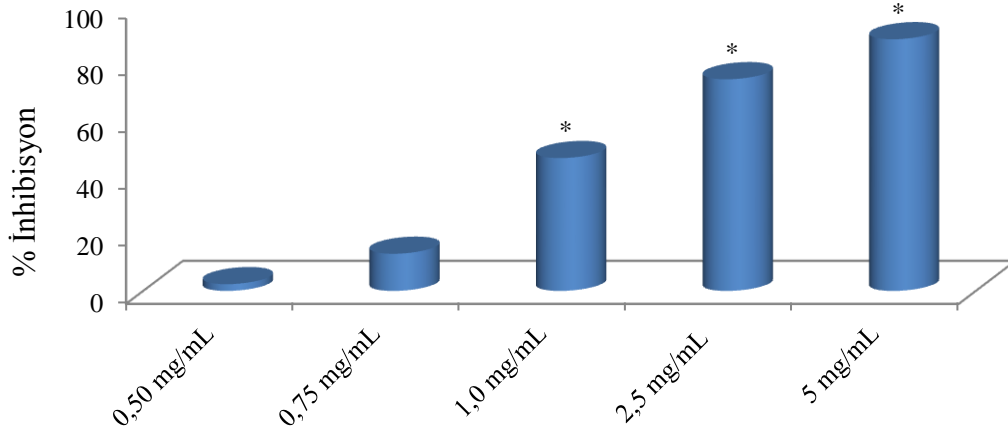


Şekil 3.56. Neostigmin molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.24. Galantamin molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,421±0,004e	-
Enzim + substrat + galantamin	0,10	0,420±0,006e	0,24
	0,25	0,424±0,003e	-0,71
	0,50	0,411±0,004e	2,38
	0,75	0,366±0,002de	13,06
	1,00	0,224±0,004c	46,72*
	2,50	0,108±0,007b	74,35*
	5,00	0,049±0,002a	88,36*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.57. Galantamin molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.23, Çizelge 3.24 ve Şekil 3.56 ve Şekil 3.57 de görüldüğü üzere kolinesteraz enzim inhibitörleri olan neostigmin ve galantamin AChE enziminin aktivitesi üzerine beklenildiği gibi bir inhibisyon etkisi sergilemişlerdir.

Diğer taraftan mevcut çalışmada kullanılan tüm ekstreler ile saf metabolitlerin çalışılan düşük konsantrasyonlarda (0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 1 mg/mL) AChE enzimini aktivitesi üzerine istatiksel olarak anlamlı her hangi bir inhibisyon etkisi göstermediği belirlendi. Düşük konsantrasyonlarda tüm ekstreler ile saf metabolitlerin AChE üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisi sergilemedikleri için tüm çalışmalar daha yüksek konsantrasyonlarda tekrarlandı ve tüm sonuçlar çizelge ve şekillerle özetlenerek sunuldu.

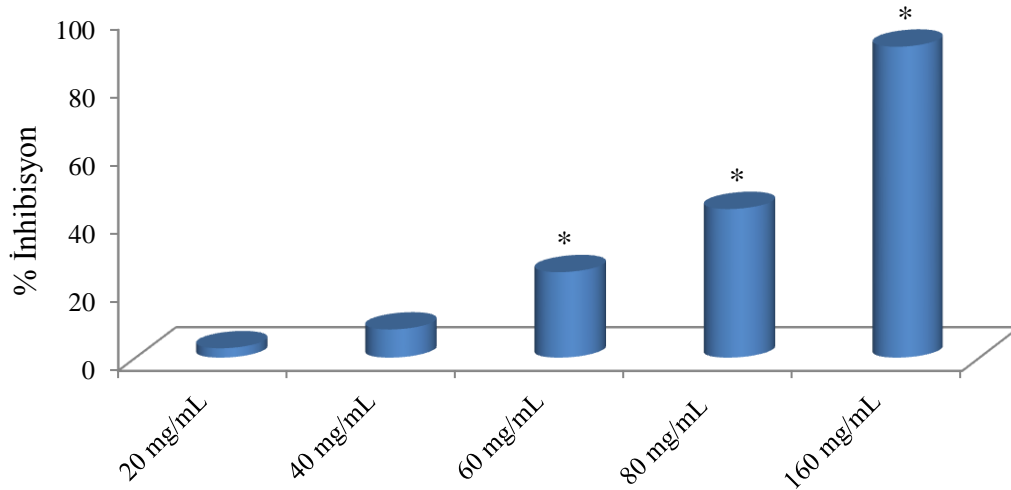
P. vera sap hekzan ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.25’de özetlendi.

Çizelge 3.25. Sap hekzan ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,362±0,002e	-
Enzim + substrat + ekstre	10	0,359±0,005e	0,83
	20	0,352±0,008de	2,76
	40	0,332±0,004d	8,29
	60	0,271±0,008c	25,14*
	80	0,204±0,004b	43,65*
	160	0,032±0,005a	91,16*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.25 ve Şekil 3.58’de görüleceği üzere *P. vera* sap hekzan ekstresi pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin ve galantamin kimyasallarının aksine çok yüksek konsantrasyonlarda AChE enzim aktivitesi üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisi sergiledi. Hekzan ekstresi 80 mg/mL konsantrasyonda % 43,65 lik inhibisyon etkisi sergilerken ancak 160 mg/mL gibi çok yüksek bir konsantrasyonda % 91,16 oranında bir inhibisyon etkisi gösterdi.



Şekil 3.58. *P. vera* sap hekzan ekstresinin AChE enzimi üzerine etkisi

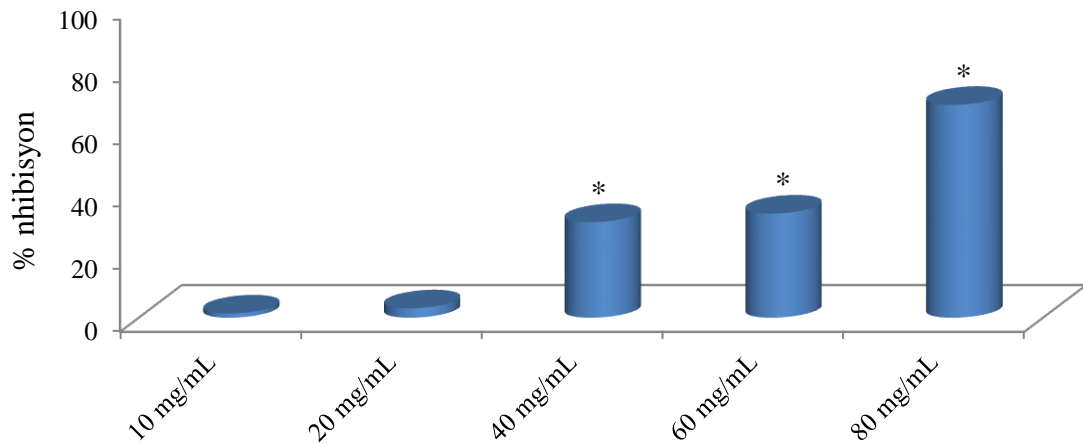
P. vera sap CHCl_3 ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.26’da özetlendi.

Çizelge 3.26. Sap kloroform ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,365±0,002c	-
	10	0,360±0,007c	1,37
	20	0,354±0,002c	3,01
Enzim + substrat + ekstre	40	0,253±0,005b	30,68*
	60	0,243±0,010b	33,43*
	80	0,116±0,003a	68,22*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.26 ve Şekil 3.59’den görüleceği üzere *P. vera* sap kloroform ekstresi de pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin ve galantamin kimyasallarının aksine çok yüksek konsantrasyonlarda AChE enzim aktivitesi üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisi sergiledi. Ekstre test edilen en yüksek konsantrasyonda (80 mg/mL) enzim aktivitesini % 68,22 oranında azalttı.



Şekil 3.59. *P. vera* sap kloroform ekstresinin AChE enzimi üzerine etkisi

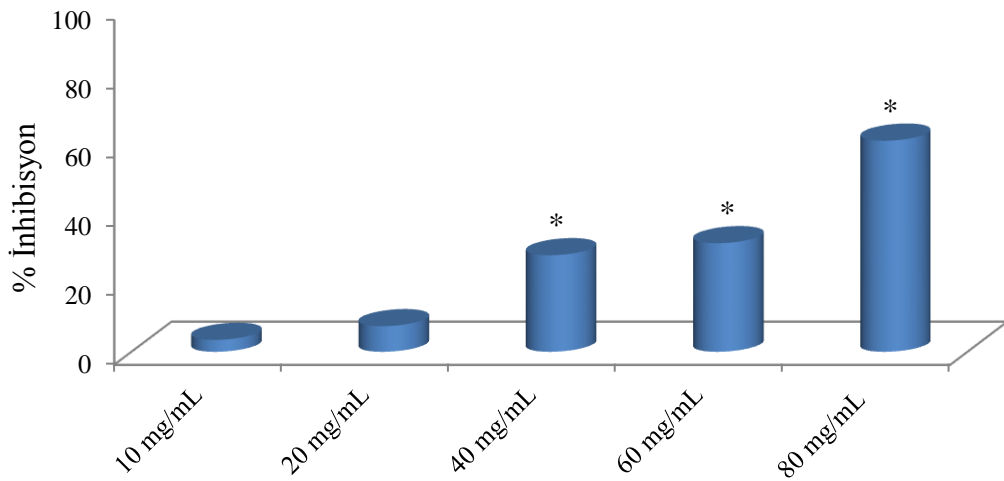
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.27’de özetlendi.

Çizelge 3.27. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,401±0,011c	-
Enzim + substrat + PVSC-1 ve 2	10	0,387±0,004c	3,49
	20	0,371±0,006bc	7,48
	40	0,288±0,004b	28,18*
	60	0,274±0,005b	31,67*
	80	0,155±0,005a	61,35*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.27 ve Şekil 3.60’dan görüleceği üzere Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün yüksek konsantrasyonlarda zayıf veya orta derecede bir inhibitör olarak davrandığı tespit edildi. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülü 80 mg/mL konsantrasyonda AChE enzimini ancak % 61,35 oranında inhibe etti.



Şekil 3.60. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün AChE enzim üzerine etkisi

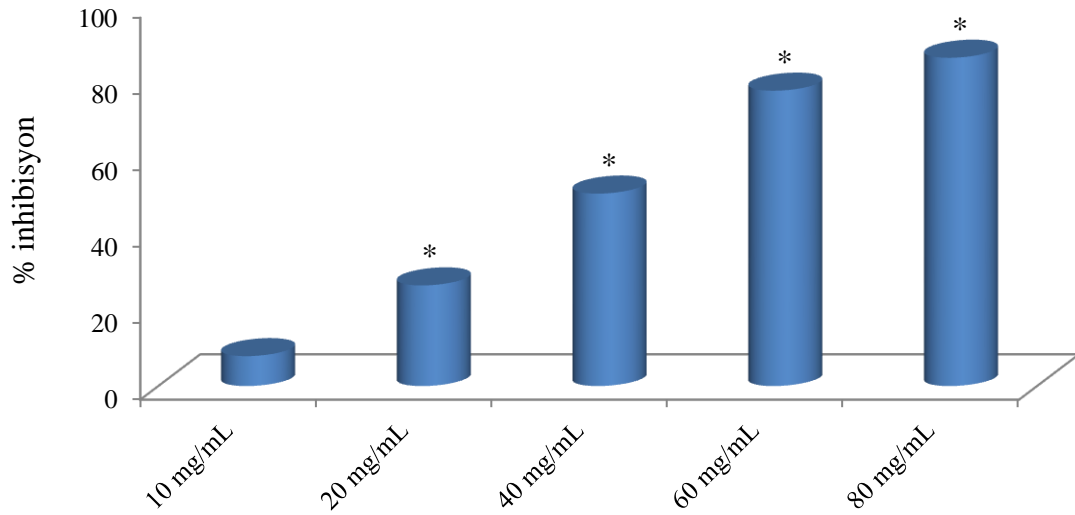
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.28’de özetlendi.

Çizelge 3.28. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,383±0,003ef	-
Enzim + substrat + PVSC-3	10	0,356±0,006e	7,83
	20	0,282±0,008d	26,37*
	40	0,190±0,003c	50,39*
	60	0,087±0,010b	77,29*
	80	0,054±0,001a	85,90*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.28 ve Şekil 3.61’den görüleceği üzere tirukallol (**PVSC-3**) molekülü 20 mg/mL konsantrasyondan itibaren AChE enziminin aktivitesini (% 26,37 oranında) azaltmaya başladı ve madde 80 mg/mL konsantrasyonda % 85,90 oranında inhibe etti.



Şekil 3.61. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi

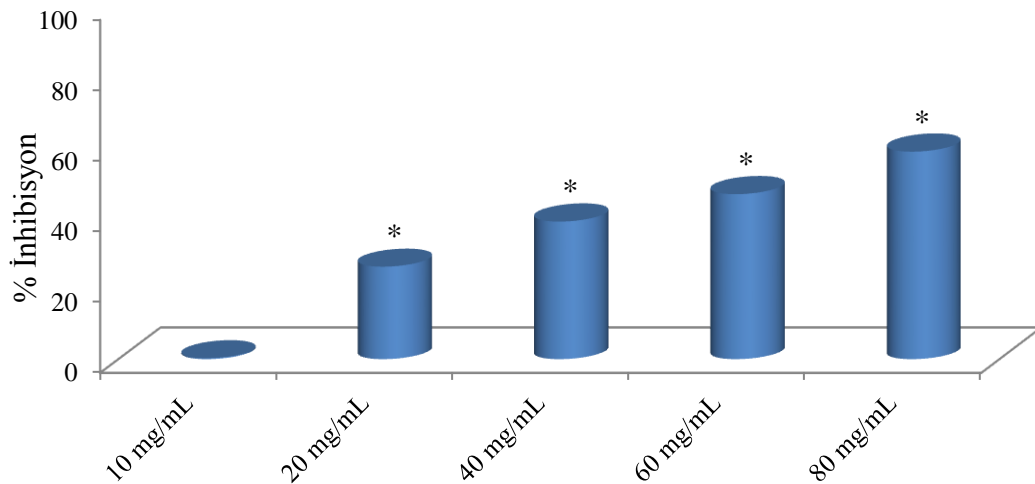
P. vera sap kısımlarının kloroform ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.29’da özetlendi.

Çizelge 3.29. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,375±0,005e	-
Enzim + substrat + PVSC-4	10	0,374±0,003e	0,27
	20	0,276±0,007d	26,40*
	40	0,228±0,005c	39,20*
	60	0,199±0,002b	46,93*
	80	0,154±0,003a	58,93*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.29 ve Şekil 3.62 den görüleceği üzere mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülü de 10 mg/mL konsantrasyonda etkisiz iken, 20 mg/mL konsantrasyonda AChE enziminin aktivitesini % 26,40 oranında baskılamıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon etkisi artan madde, 80 mg/mL konsantrasyonda AChE enzim aktivitesini % 58,93 oranında azaltmıştır.



Şekil 3.62. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün AChE enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kısımlarının etanol ekstresi ile bu ekstreden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan oligosakkarit sınıfı metabolitler, pistasionikasit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) molekülünün AChE enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.30-3.32’de özetlendi. Bu çizelgelerden görüleceği üzere hem ekstre hem de pistasionikasit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) molekülleri 10, 20, 40, 60 ve 80 mg/mL konsantrasyonlarda AChE enziminin aktivitesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir inhibisyon etkisi sergilemediler. Bu sonuçlar hem etanol ekstresinin hem de etanol ekstresinden saflaştırılan metabolitlerin AChE enzimi üzerine aktif olmadığını göstermektedir.

Çizelge 3.30. Sap etanol ekstresinin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,419±0,003bc	-
Enzim + substrat + ekstre	10	0,409±0,003b	2,42
	20	0,409±0,001b	2,42
	40	0,404±0,002ab	3,58
	60	0,403±0,003ab	3,82
	80	0,383±0,007a	8,59

Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.31. Pistasionikasit (**PVSE-1**)’in AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,437±0,003a	-
Enzim + substrat + PVSE-1	10	0,441±0,014a	-0,91
	20	0,446±0,002a	-2,06
	40	0,443±0,009a	-1,37
	60	0,422±0,004a	3,43
	80	0,421±0,001a	3,66

Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Çizelge 3.32. İnulobioz (**PVSE-2**) disakkaritin AChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,400±0,004	-
Enzim + substrat + PVSE-2	10	0,397± 0,001a	0,75
	20	0,395±0,002a	1,25
	40	0,397±0,009a	0,75
	60	0,392± 0,002a	2,00
	80	0,386±0,002a	3,50

Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı.

Hem ekstre hem de saf metabolitler farklı konsantrasyonlarda AChE enzimine karşı değişik oranlarda sergiledikleri tespit edildi. Enzim aktivitelerini kendi aralarında mukayese etmek üzere enzim aktivitesi sergileyen her bir uygulama için IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri belirlendi ve Çizelge 3.33'te sunuldu.

Çizelge 3.33. AChE enzimine karşı aktif uygulamaların IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri

Uygulama ismi	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₉₀ (mg/mL)
Neostigmin	0,41	0,83
Galantamin	1,08	5,04
Hekzan ekstresi	96,92	156,34
Kloroform ekstresi	65,86	105,83
Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve 2)	71,49	119,85
Tirukallol (PVSC-3)	42,55	77,55
Mastikadienolik asit (PVSC-4)	63,28	117,51
Etanol ekstresi	-	-
Pistasionikasit (PVSE-1)	-	-
Inulobioz (PVSE-2)	-	-

-:Aktif olmadığı için değerler hesaplanmadı.

Çizelge 3.33 de görüldüğü üzere AChE enziminin aktivitesini azaltmaya yönelik olarak en düşük IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin (IC₅₀=0,41 mg/mL, IC₉₀= 0,83 mg/mL) ve galantamin için (IC₅₀=1,08 mg/mL, IC₉₀= 5,04 mg/mL) hesaplandı. Bu değerler pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin molekülünün galantamin molekülüne göre AChE enzimine karşı daha iyi bir inhibitör olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan AChE enzimine karşı daha yüksek konsantrasyonlarda aktif olan ekstre ve saf metabolit uygulamaları için beklenildiği gibi daha yüksek IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri belirlendi. Bu değerlere göre uygulamalar arasında en düşük IC₅₀ (42,55 mg/mL) ve IC₉₀ (77,55 mg/mL) değerleri ile tirukallol (**PVSC-3**) molekülü AChE enzimine karşı en etkin reaktif olarak tespit edildi. Mevcut sonuçlar bize hem kloroform ekstresinin hem de kloroform ekstresinden saflaştırılan mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**), tirukallol (**PVSC-3**) ve mastikadienolik asit (**PVSC-4**) moleküllerinin AChE enzimine karşı zayıf inhibitörler olduğunu gösterdi.

3.3.4. Ekstre ve Saf Metabolitlerin Butirikolin Esteraz Enzim Aktiviteleri Çalışma Bulguları

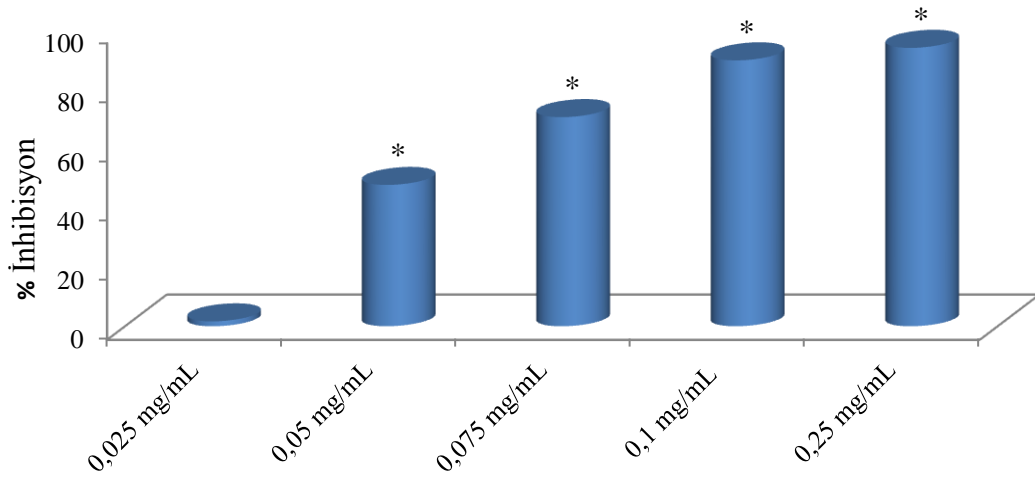
Antepfıstığı sap kısmından farklı organik çözücülerle elde edilen ekstreler ile kloroform ve etanol ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan saf metabolitlerin değişik konsantrasyonlarda BChE enzim aktiviteleri sonuçları çizelgelerde ortalama absorbans \pm SE ve % inhibisyonlar halinde sunuldu. Ekstre ve saf maddelerin BChE enzim aktiviteleri sonuçları neostigmin ve galantamin pozitif kontrolleri ile ayrıca mukayese edildi.

Kolinesteraz inhibitörleri olarak kullanılan neostigmin ve galantamin moleküllerinin BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.34 ile 3.35 ve Şekil 3.63 ile Şekil 3.64'te özetlendi.

Çizelge 3.34. Neostigmin molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs \pm SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,241 \pm 0,004e	-
Enzim + substrat + neostigmin	0,025	0,237 \pm 0,006e	1,66
	0,050	0,126 \pm 0,003d	47,72*
	0,075	0,071 \pm 0,004c	70,54*
	0,10	0,025 \pm 0,004b	89,63*
	0,25	0,004 \pm 0,001a	98,34*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p < 0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

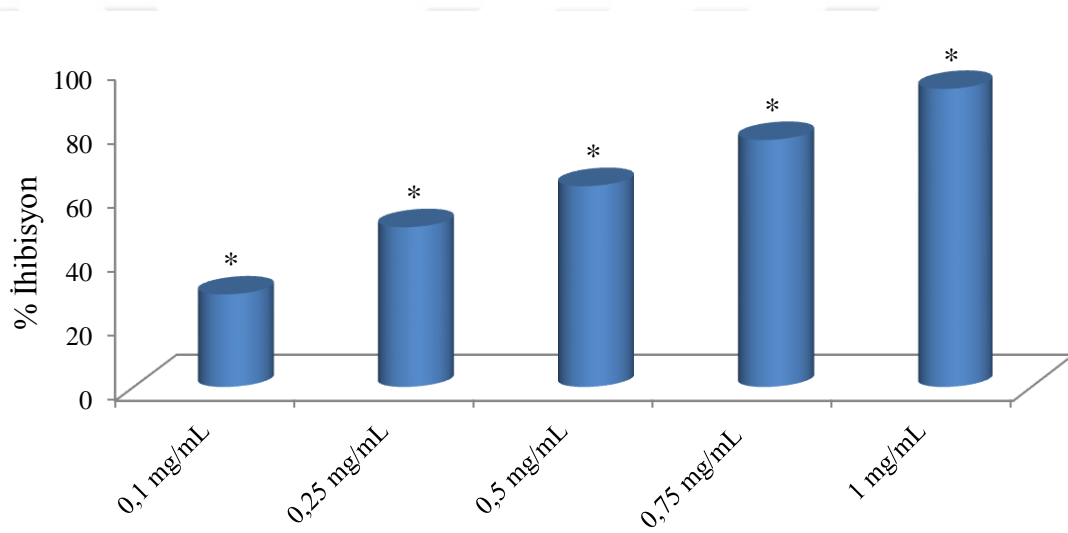


Şekil 3.63. Neostigmin molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.35. Galantamin molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,258±0,008f	-
Enzim + substrat + galantamin	0,10	0,183±0,004e	29,07*
	0,25	0,129±0,008d	50,00*
	0,50	0,096±0,002c	62,79*
	0,75	0,059±0,005b	77,13*
	1,00	0,018±0,008a	93,02*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.64. Galantamin molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

Çizelge 3.34 ile 3.35 ve Şekil 3.63 ile Şekil 3.64'ten görüldüğü üzere kolinesteraz enzim inhibitörleri olan neostigmin ve galantamin molekülleri BChE enziminin aktivitesi üzerine beklenildiği gibi bir inhibisyon etkisi sergilemişlerdir. Diğer taraftan, neostigmine molekülünün galantamin göre daha düşük konsantrasyonlarda dahi daha güçlü bir inhibitör olduğu belirlendi.

Bununla beraber, mevcut çalışmada, AChE enzim inhibisyon çalışmalarında olduğu gibi kullanılan tüm ekstratlar ile saf metabolitlerin çalışılan düşük konsantrasyonlarda (0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 1 mg/mL) BChE enziminin aktivitesi üzerine istatiksel olarak anlamlı her hangi bir inhibisyon etkisi göstermediği görüldü. Düşük konsantrasyonlarda tüm ekstratlar ile saf metabolitlerin BChE enzim

aktivitesi üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisi sergilememesi nedeniyle daha yüksek konsantrasyonlarda çalışmalar tekrarlandı. Yüksek konsantrasyonlarda bazı örneklerin BChE enziminin aktivitesini değişik oranlarda inhibe ettiği belirlendi ve çalışma bulguları çizelge ve şekillerle özetlenerek aşağıda sunuldu.

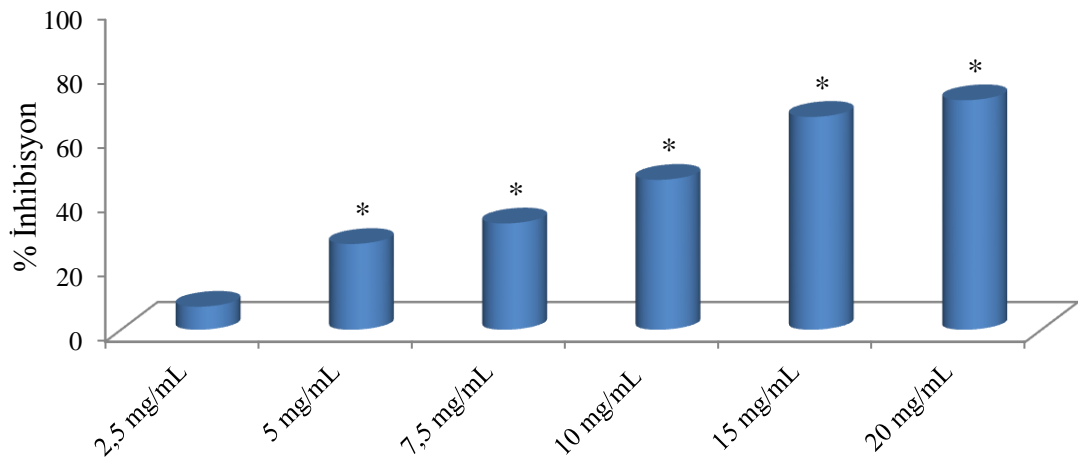
P. vera sap hekzan ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.36. da özetlendi.

Çizelge 3.36. Sap hekzan ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,251±0,002fg	-
Enzim + substrat + ekstre	2,5	0,233±0,006f	7,17
	5	0,184±0,002e	26,69*
	7,5	0,168±0,000d	33,07*
	10	0,134±0,002c	46,61*
	15	0,085±0,004b	66,14*
	20	0,072±0,006a	71,32*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.36 ve Şekil 3.65 ten görüleceği üzere *P. vera* sap kısımlarından elde edilen hekzan ekstresi 5 mg/mL konsantrasyon ve daha yüksek konsantrasyonlarda % 26,69-% 71,32 oranında bir inhibisyon etkisi gösterdi.



Şekil 3.65. *P. vera* sap hekzan ekstresinin BChE enzim üzerine etkisi

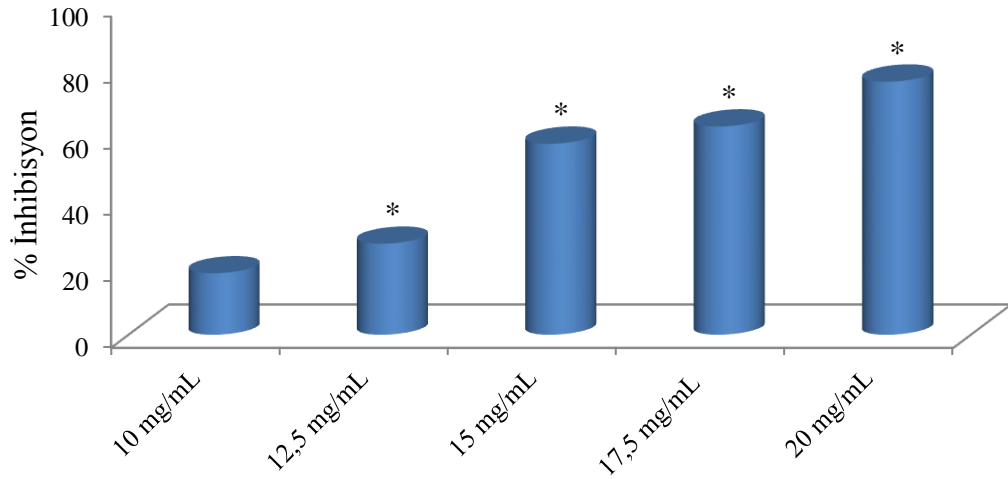
P. vera sap kloroform ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.37’ de sunuldu.

Çizelge 3.37. Sap kloroform ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,289±0,006e	-
Enzim + substrat + ekstre	10	0,235±0,005d	18,69*
	12,5	0,209±0,004c	27,68*
	15	0,122±0,006b	57,79*
	17,5	0,107±0,006b	62,98*
	20	0,068±0,001a	76,47*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.37 ve Şekil 3.66’da görüldüğü üzere *P. vera* sap kısımlarından elde edilen kloroform ekstresi de hekzan ekstresine benzer bir inhibisyon etkisi gösterdi. Ekstre 12,5 mg/mL ve daha üst konsantrasyonlarda BChE enzimine karşı inhibitör olarak davrandı ve 20 mg/mL lik konsantrasyonda % 76,47 oranında bir inhibisyon etkisi sergiledi.



Şekil 3.66. *P. vera* sap kloroform ekstresinin BChE enzimi üzerine etkisi

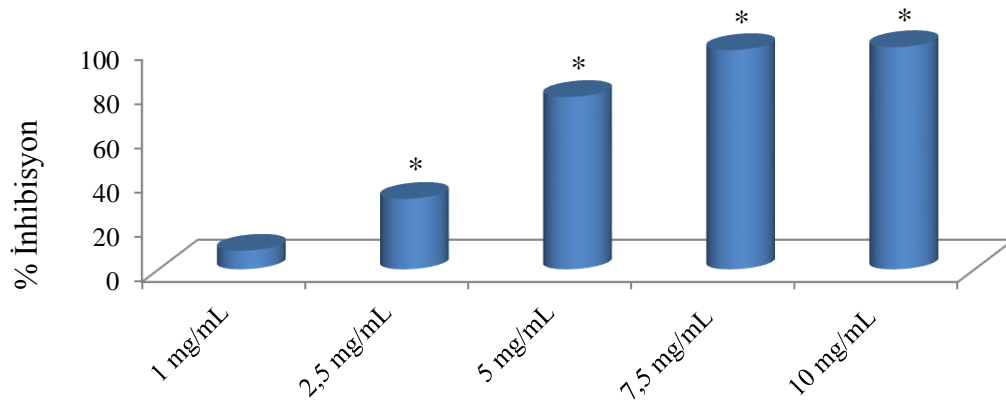
P. vera sap kloroform ekstresinde kromatografik yöntemlerle saflaştırılan Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.38. de sunuldu.

Çizelge 3.38. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,299±0,006de	-
Enzim + substrat + PVSC-1	1	0,274±0,005d	8,36
	2,5	0,204±0,002c	31,77*
	5	0,067±0,004b	77,59*
	7,5	0,004±0,004a	98,66*
	10	0,000±0,000a	100,00*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.

Çizelge 3.38. ve Şekil 3.67.' den görüleceği üzere çalışma bulguları Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün saflaştırıldığı kloroform ekstresine göre daha düşük konsantrasyonlarda BChE enziminin aktivitesini inhibe ettiğini gösterdi. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülü 7,5 mg/mL konsantrasyonda % 98,66 oranında inhibisyon etkisi sergilerken 10 mg/mL konsantrasyonda ise tam bir inhibisyon etkisi gösterdi. Oysa kloroform ekstresi 10 mg/mL konsantrasyonda % 18,69 oranında istatiksel olarak anlamsız bir inhibisyon etkisi sergilemişti (Çizelge 3.37 ve Şekil 3.66).



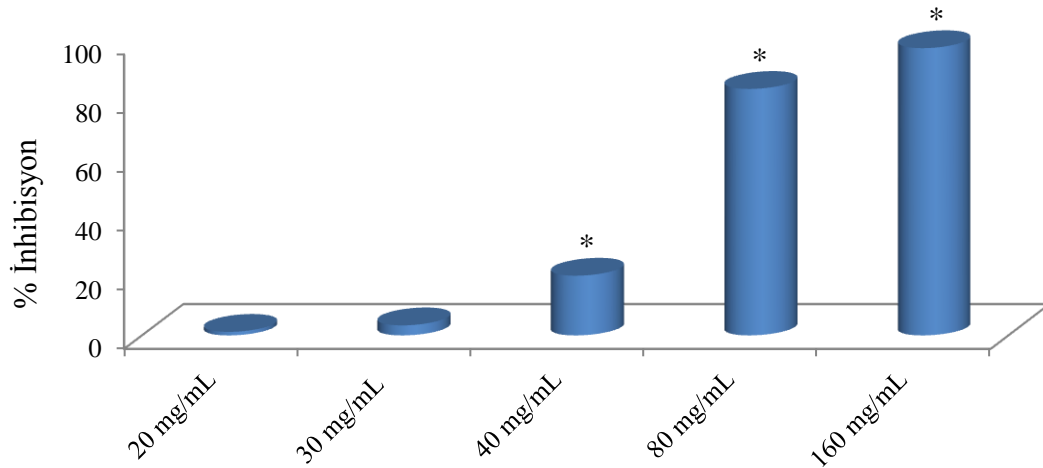
Şekil 3.67. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

P. vera sap kloroform ekstresinde kromatografik yöntemlerle saflaştırılan tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.39’ da sunuldu.

Çizelge 3.39. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,498±0,004d	-
Enzim + substrat + PVSC-3	5	0,498±0,004d	0,00
	10	0,491±0,007d	1,41
	20	0,489±0,008d	1,81
	30	0,481±0,010d	3,41
	40	0,397±0,002c	20,28*
	80	0,081±0,006b	83,74*
	160	0.012±0,002a	97,59*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.68. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

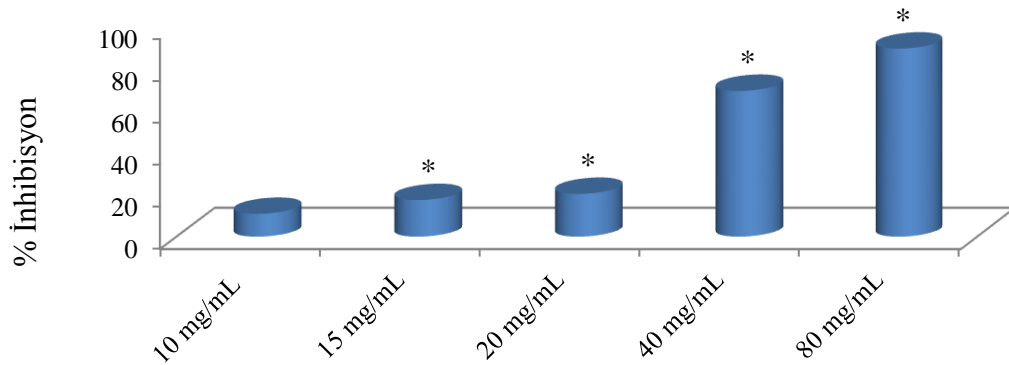
Çizelge 3.39. ve Şekil 3.68.’ de görüldüğü üzere tirukallol (**PVSC-3**) triterpen molekülü düşük konsantrasyonlarda BChE enzimi üzerine etkisiz iken 40 mg/mL konsantrasyonda ancak % 20,28 oranında istatiksel olarak anlamlı düşük bir inhibisyon etkisi sergiledi. Tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün inhibisyon etkisi konsantrasyon artışına bağlı olarak artarak 160 mg/mL gibi yüksek konsantrasyonda % 97,59 oranında bir inhibisyon etkisi gösterdi. Bu sonuçlar tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün akarboza göre çok daha zayıf bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

P. vera sap kloroform ekstresinde kromatografik yöntemlerle saflaştırılan mastikadienolik asit (**PVSC-4**) triterpen molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.40. de sunuldu. Çizelge 3.40.' dan görüleceği üzere mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülü de diğer moleküler gibi ancak 20 mg/mL konsantrasyondan sonra artan oranda BChE enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sergiledi. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün 40 mg/mL konsantrasyonu enzimi % 69,41 oranında inhibe ederken, 80 mg/mL konsantrasyonu ancak % 89,47 oranında inhibisyon etkisi gösterdi (Şekil 3.69). Bu sonuçlar da mastikadienolik asit (**PVSC-4**) triterpen molekülünün pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin ve galantamin reaktiflerine göre çok daha zayıf bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.40. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,304±0,008de	-
Enzim + substrat + PVSC-4	2,5	0,286±0,005d	5,92
	5	0,276±0,002d	9,21
	7,5	0,271±0,002d	10,86
	10	0,271±0,001d	10,86
	15	0,251±0,005c	17,43*
	20	0,242±0,008c	20,39*
	40	0,093±0,004b	69,41*
80	0,032±0,004a	89,47*	

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



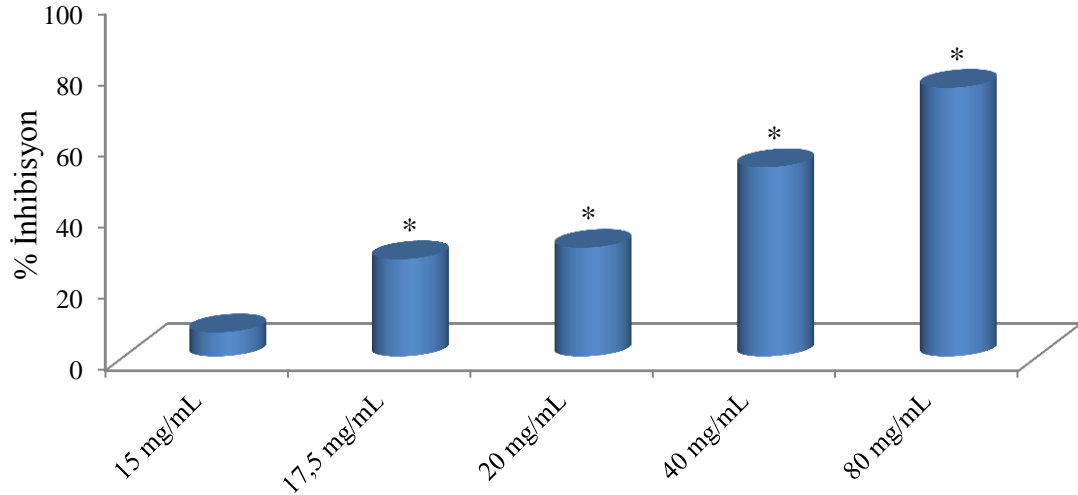
Şekil 3.69. Mastikadienolik asit (**PVSC-4**) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

P. vera sap etanol ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.41. ve Şekil 3.70.' de özetlendi. Bu çizelge ve şekilden görüleceği üzere etanol ekstresi de ancak yüksek konsantrasyonlarda (17,5-80 mg/mL) BChE enzim aktivitesi üzerine anlamlı bir inhibisyon etkisi gösterdi. Ekstrenin test edilen en yüksek konsantrasyonu (80 mg/mL) BChE enzim aktivitesini % 75,37 oranında inhibe etti.

Çizelge 3.41. *P. vera* sap etanol ekstresinin BChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,341±0,006e	-
Enzim + substrat + ekstre	10	0,340±0,003e	0,29
	12,5	0,339±0,003e	0,59
	15	0,318±0,004de	6,75
	17,5	0,248±0,004c	27,27*
	20	0,237±0,002c	30,50*
	40	0,160±0,003b	53,08*
	80	0,084±0,003a	75,37*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



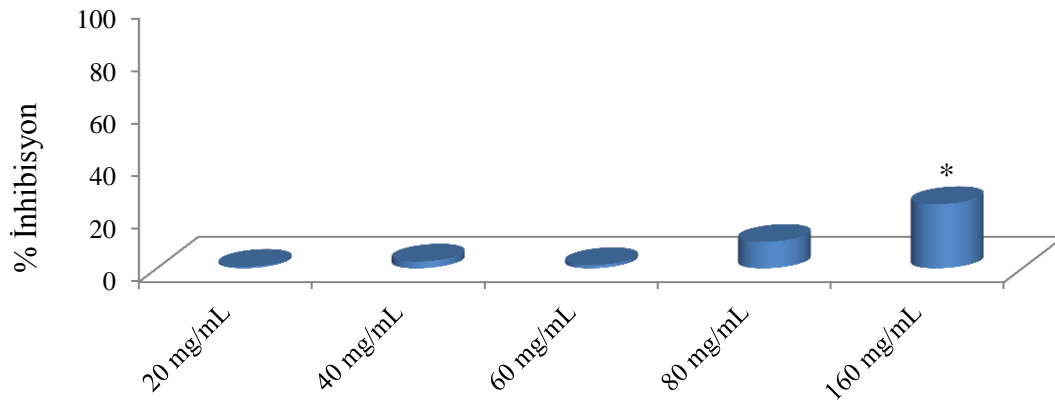
Şekil 3.70. *P. vera* sap etanol ekstresinin BChE enzimi üzerine etkisi

P. vera sap etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan yeni molekül pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.42. ve Şekil 3.71.' de sunuldu. Bu çizelgeden görüldüğü üzere etanol ekstresinin aksine pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülünün 160 mg/mL' lik konsantrasyonu, BChE enziminin aktivitesini % 24,39 oranında zayıf bir şekilde azalttığı gözlemlendi. Çok daha yüksek konsantrasyonlarda ise çözünürlük problemlerinden dolayı ilave çalışmalar yapılmadı. Bu sonuçlar pistasionikasit (**PVSE-1**) molekülüne nazaran etanol ekstresinin çok daha güçlü bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.42. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,464±0,006a	-
Enzim + substrat + PVSE-1	10	0,469±0,004a	-1,08
	12,5	0,457±0,004a	1,51
	15	0,461±0,004a	0,65
	17,5	0,448±0,006a	3,45
	20	0,452±0,003a	0,61
Enzim + substrat	-	0,328±0,004c	-
	40	0,326±0,002c	2,59
	60	0,324±0,004bc	1,22
	80	0,295±0,001b	10,06
	160	0,248±0,002a	24,39*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



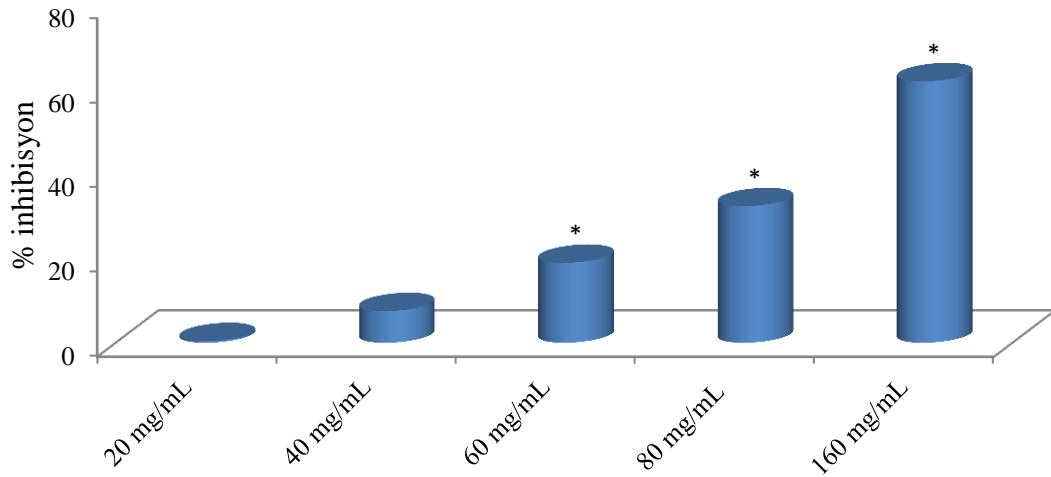
Şekil 3.71. Pistasionikasit (PVSE-1) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

P. vera sap etanol ekstresinden kromatografik yöntemlerle saflaştırılan inulobioz (**PVSE-2**) disakkarit molekülünün BChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışma bulguları Çizelge 3.43. ve Şekil 3.72.' de verildi. Bu çizelge ve şekilden görüldüğü üzere pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün aksine inulobioz (**PVSE-2**) molekülü BChE enzimine karşı daha güçlü bir inhibitör olarak davrandı. Ancak inulobioz (**PVSE-2**) molekülünün inhibitör etkisi etanol ekstresine göre daha düşük düzeyde bulundu. Etanol ekstresi 80 mg/mL konsantrasyonda BChE enzim aktivitesini % 75,37 oranında (Çizelge 3.41. ve Şekil 3.70.) inhibe ederken, inulobioz (**PVSE-2**) molekülünün aynı konsantrasyonun inhibisyon etkisi % 32,28 oranında tespit edildi (Çizelge 3.43. ve Şekil 3.72.).

Çizelge 3.43. İnulobioz (PVSE-2) disakkarit molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/mL)	Abs±SE	% İnhibisyon
Enzim + substrat	-	0,254±0,005d	-
Enzim + substrat + PVSE-2	20	0,253±0,008d	0,39
	40	0,235±0,005d	7,48
	60	0,206±0,002c	18,90*
	80	0,172±0,011b	32,28*
	160	0,097±0,004a	61,81*

*İstatiksel olarak kontrolden (enzim + substrat) farklı ($p<0,05$). Satırlardaki farklı harfler Duncan testine göre istatiksel olarak farklı.



Şekil 3.72. İnulobioz (PVSE-2) molekülünün BChE enzimi üzerine etkisi

BChE enzimine karşı hem ekstre hem de saf metabolitlerin farklı konsantrasyonlarda değişik oranlarda enzim aktiviteleri sergiledikleri gözlemlendi. Enzim aktivitelerini kendi aralarında mukayese etmek üzere BChE enzimine karşı inhibitör özelliği sergileyen her bir örnek için IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri belirlendi ve Çizelge 3.44.' de sunuldu.

Çizelge 3.44. BChE enzimine karşı aktif uygulamaların IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri

Uygulama ismi	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₉₀ (mg/mL)
Neostigmin	0,06	0,10
Galantamin	0,33	0,93
Hekzan ekstresi	12,28	23,26
Kloroform ekstresi	15,20	21,84
Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve 2)	3,72	6,52
Tirukallol (PVSC-3)	73,96	131,94
Mastikadienolik asit (PVSC-4)	36,87	75,30
Etanol ekstresi	42,47	97,96
Pistasionik asit (PVSE-1)	-	-
Inulobioz (PVSE-2)	131,67	223,61

-:Aktif olmadığı için değerler hesaplanmadı.

Çizelge 3.44.' den görüldüğü üzere test edilen ekstre ve saf metabolitlerin çoğu yüksek konsantrasyonlarda da olsa BChE enzimine karşı inhibitör olarak davrandılar. Bununla beraber, düşük IC₅₀ ve IC₉₀ değerlerine sahip olan örnekler daha güçlü inhibitör olarak değerlendirildi. Bu bilgiler ışığında test edilen örnekler arasında en düşük IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri (IC₅₀=3,72 mg/mL ve IC₉₀=6,52 mg/mL) ile en iyi inhibitör olarak Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) dikkat çekmektedir. Mastikadienonik asit molekülünün izole edildiği kloroform ekstresi saf molekülün aksine daha büyük IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri (IC₅₀=15,20 mg/mL, IC₉₀=21,84 mg/mL) ile daha zayıf bir inhibitör olarak davranmıştır. Diğer taraftan, etanol ekstresinin bu ekstreden saflaştırılan pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) moleküllerinden çok daha güçlü bir inhibitör olduğu gözlemlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tıbbi ve aromatik bitkiler içerdikleri etken maddeler bakımından hastalıkların tedavisinde ve de baharat ve çeşni olarak kullanılan bitkiler olarak tanımlanırlar. Yüzyıllar boyunca çevresel faktörler, savaşlar ve doğal afetler gibi değişik etkenler insanların bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara karşı insanları savunmasız bırakmıştır. İnsanlar insanlığın varoluşundan beri sihir ve büyü gibi doğaüstü olayların yanı sıra yaratılıştan kaynaklanan aklını, araştırma ve öğrenme becerilerini de kullanarak çevresindeki hayvansal ve bitkisel droglarla da tedavi olma olanaklarını araştırmışlardır. Bu doğal kaynakların içerisinde şüphesiz bitkiler en önemli yeri tutmaktadır (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Dewick, 2002). Bu düşüncelerden yola çıkılarak tıbbi ve aromatik bitkilerin değişik hastalıkların tedavisinde kullanımı insanlık tarihinin başlaması ile başladığı tahmin edilmektedir. Yazılı kaynaklara göre M.Ö 3000 yıllarında hüküm süren Sümer, Mısır, Çin, Akad ve Asur Medeniyetlerinde tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Dewick, 2002). Bitkilerin tedavi edici etkileri çaresizlik anında merak, gözlem ve araştırma sonucunda ortaya konmasına karşın bazen de tesadüfen keşfedilmiştir. Kazanılan bilgiler bazen söylemlerle bazen de yazılı kaynaklarla daha sonraki dönemlere aktarılmıştır. Yıllar geçtikçe insanların bitkilerin farklı hastalıklara karşı tedavi edici özellikleri hakkındaki bilgileri daha da artmıştır. Günümüze daha yakın dönemlerde ise bitkiler beslenme, tat ve aroma verici, iştah açıcı, tedavi edici etkileri nedeniyle kültüre alınmış ve üretimlerine geçilmiştir (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Dewick, 2002).

İnsanların araştırma merakı ya da tesadüfi olarak yaptıkları bilimsel gözlemleri sonucunda elde ettikleri bilgiler kuşaktan kuşağa aktarılarak modern tıbbın ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine önemli katkılar sağlamıştır. (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992). Tedavi amacıyla tıbbi bitkilerin yaprak, kök, çiçek, tohum, kabuk, toprak üstü kısımları ya da bitkinin tamamı kullanılmış ya da kullanılmaktadır. Eski dönemlerde bitkilerin tedavide kullanımı dekoksasyon, demleme, macun, krem ve şurup şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımları oldukça geniş hastalık türünü kapsamasına karşın genel olarak kan temizleyici, sakinleştirici (sedatif),

hazmı kolaylaştırıcı, idrar söktürücü ve artırıcı (diüretik), ter söktürücü, iştah açıcı, kanamayı durdurucu (koagülent), gaz giderici, spazm giderici, balgam söktürücü, öksürük giderici, ağrı kesici ve ateş düşürücü (antipiretik), parazit düşürücü (antihelmintik), nefes açıcı, mikrop öldürücü (antiseptik, antimikrobiyal), böcek kovucu ve öldürücü (insektisidal), müsil, antiprotozoal, antiromatizmal olarak kullanılmalarının yanı sıra, astım, sıtma, dizanteri, tifo, şeker ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanıldıklarında bildirilmiştir (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992). Son yüzyılda kromatografik yöntemler alanındaki gelişmelere bağlı olarak bitkilerin sentezledikleri metabolitlerin izole edilmesi ve farmakolojik etkilerinin belirlenmesi modern ilaç teknolojisinin gelişmesine önemli katkılar sağlamıştır (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992). Spektroskopik yöntemlerdeki gelişmelere paralel olarak saflaştırılan metabolitlerin ve etken maddelerin kimyasal yapısı detaylı olarak ortaya konmakta ve etken maddeler değişik formülasyonlarla ilaç olarak insanlığın hizmetine sunulmaktadır. Buna bağlı olarak son iki yüzyıl içinde bitkisel kaynaklı ilaç ve ilaç araştırmaları geçmiş dönemlere nazaran farklı bir yol izlemektedir (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992).

Pistacia cinsi Anacardiaceae familyasına ait tohumlu bitkiler olup Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarında yayılış gösteren türlerdir. Ülkemizde de yaygın olarak yetişen en önemli türleri *P. vera*, *P. terebinthus* ve *P. lentiscus* türleridir. *P. vera* meyvelerinden dolayı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kültürü yapılan önemli bir türdür. Bu ağacın meyveleri “Antepfıstığı” ve “Şamfıstığı” gibi isimlerle bilinir ve tatlıcılıkta yaygın bir kullanıma sahiptir. Eczacılıkta ayrıca öksürük şurubu yapımında kullanılır. *P. vera* sıcak iklime çok iyi adapte olmuş olan Antepfıstığı yetiştiriciliğinin en yaygın yapıldığı ülkeler sırasıyla İran, ABD ve Türkiye’dir. Ülkemizde en çok yetiştirildiği iller ise Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis, Siirt, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Diyarbakır’ dır.

Antep fıstığının meyve, yaprak ve reçinesinin kimyasal bileşimi ve bazı farmakolojik aktiviteleri üzerine literatürde önemli oranda kayıtlara rastlanmıştır. Önceki çalışma sonuçları uçucu yağ bileşimi ve biyolojik aktiviteleri, yaprak, meyve ve kabuk kimyasal bileşimi ve ekstre ve saf metabolitlerin farmakolojik özellikleri olarak üç başlık altında toplanabilir. Antepfıstığının ekstre ve saf metabolitlerinin antioksidan, antiinflamatuvar, yara iyileştirici, antimikrobiyal, hipoglisemik, nöroprotetif (nöron koruyucu), ağrı

azaltıcı (analjezik), ateş düşürücü (antipretik), antilipoksigenaz, antilipaz, sitotoksik, antiprotozoal, nefrokoruyucu, antiviral gibi çok farklı farmakolojik özellikleri daha önceki araştırma sonuçları ile ortaya konmuştur (Ozcelik ve ark., 2005; Orhan ve ark., 2006a; Ballistreri ve ark., 2009; Tomaino ve ark., 2010; Fathalizadeh ve ark., 2015; Mirian ve ark., 2015; Gökdemir, 2016; Kilic ve ark., 2016; Ehsani ve ark., 2017; Paterniti ve ark., 2017; Rauf ve ark., 2017; Koyuncu ve ark., 2018; Seifaddinipour ve ark., 2018).

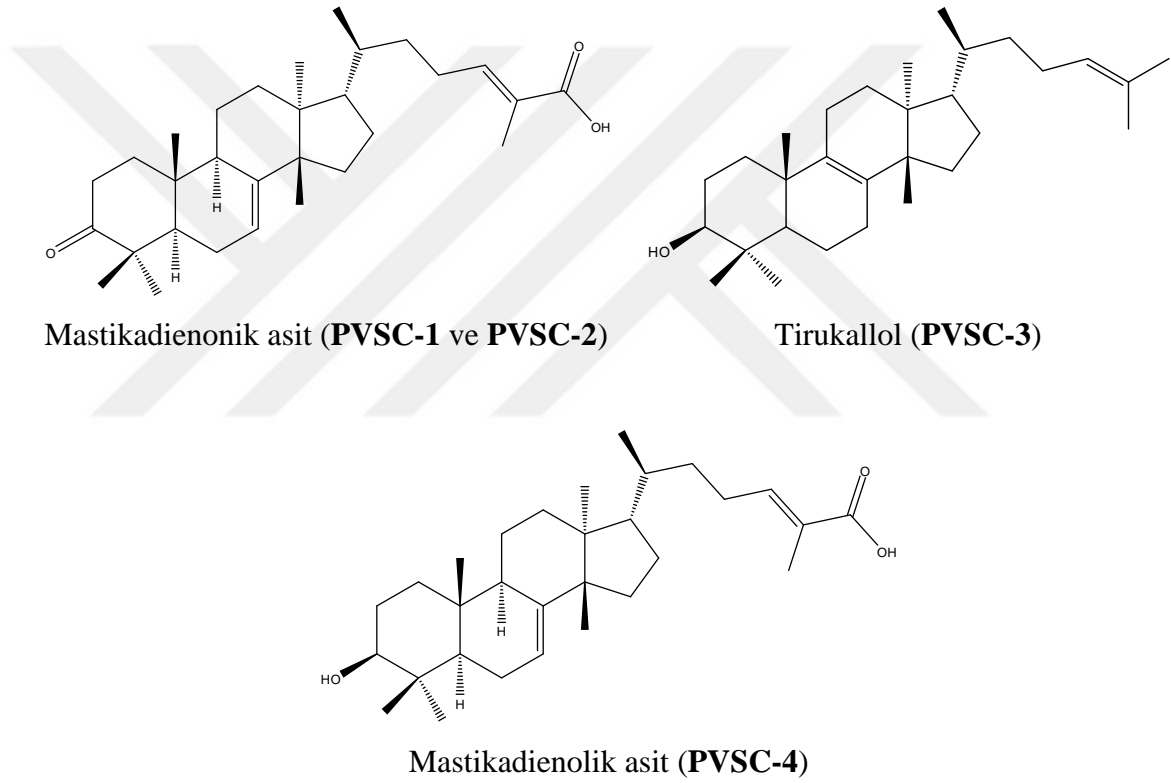
Antepfıstığının ekstre ve saf metabolitlerinin önemli farmakolojik aktiviteler göstermesi bizi bu tür üzerinde yeni farmakolojik özelliklerini araştırmaya ve ortaya koymaya yöneltti. Antepfıstığının hasadı esnasında önemli bir atık madde olan, hoş reçine kokulu sap kısmının kimyasal bileşenleri ve farmakolojik özellikleri üzerinde ciddi bir araştırmaya rastlanılmadı. Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada Antep fıstığının atık sap kısımlarının kimyasal bileşiminin ortaya konması hedeflendi. Hoş kokulu Antep fıstığı sap kısımlarının aroma bileşenleri headspace GC-MS yöntemi ile analiz edildi. Headspace GC-MS analiz yöntemi sap kısmın 19 adet aroma bileşeni içerdiğini ve bu aroma bileşenlerinin ana bileşenlerinin α -pinen (% 39,03), kamfen (% 18,36), β -pinen (% 12,76), trisiklen (% 9,24), borneol asetat (% 4,62) ve kamfor (% 3,04) olduğunu gösterdi. Headspace GC-MS analizine göre sap kısımların aroma maddelerinin monoterpen hidrokarbon bileşenler bakımından zengin olduğu ve monoterpen hidrokarbon bileşenler aroma bileşenlerin % 85,60' ına karşılık geldiği görülmektedir. Sap kısımların hekzan ekstresinin aroma bileşenleri de ayrıca GC-MS yöntemi ile analiz edildi ve analiz sonuçları küçük farklılıklar dışında aynı bileşenleri içerdiğini gösterdi (Çizelge 3.1). Hekzan ekstresi α -pinen (% 29,55), β -pinen (% 12,09), izositral (% 8,50), kamfen (% 7,35), borneol asetat (% 6,41), limonen (% 4,73) ve kamfor (% 4,65) ana aroma bileşenlerini içermektedir. Hekzan ekstresinde tespit edilen oksijenli monoterpen isocitral bileşeni headspace GC-MS yöntemi ile tespit edilen aroma bileşenlerde tespit edilmedi. Diğer taraftan hekzan ekstresinin aroma bileşenleri de monoterpen hidrokarbonlar bakımından zengin olup toplam aroma bileşenlerin % 60,16'lık kısmına tekabül etmektedir.

Literatürde Antep fıstığının değişik kısımlarından değişik yöntemlerle elde edilen uçucu yağların kimyasal bileşimlerinin GC ve GC-MS yöntemleri ile analizi üzerine

araştırmalar mevcut olup bu araştırmalarda dünyanın değişik bölgelerinde yetişen *P. vera*'nın uçucu yağlarının genellikle monoterpen hidrokarbon bileşenler olan α -pinen, β -pinen, limonen, 3-karen, 4-karen, α -terpinolen ve mirsen bakımından zengin olduğunu göstermiştir (Duru ve ark., 2003; Alma ve ark., 2004; Ramezani ve ark., 2004; Tsokou ve ark., 2007; Chahed ve ark., 2008, 2012; Kalalinia ve ark., 2008; Kendirci ve Onogur, 2011; Hashemi- Moghaddam ve ark., 2014; Mahmoudvand ve ark., 2016; Smeriglio ve ark., 2017; D'Arrigo ve ark., 2019; Napoli ve ark., 2019). Çizelge 3.1 de görüldüğü üzere mevcut çalışma sonuçları daha önceki çalışma sonuçları ile uyumlu olup Antep fıstığının sözü geçen monoterpen hidrokarbon bileşenlerinin çoğu kez ana oranda olup değişik oranlarda içerdiği görülmektedir. Örneğin lkemizde yetişen *P. vera* reçinesini ve yapraklarından elde edilen hidrodestilasyon uçucu yağlarının benzer ana bileşenlere sahip oldukları iki ayrı araştırma grubu Duru ve ark. (2003) ve Alma ve ark. (2004) tarafından ortaya konmuş ve her iki uçucu yağın da ana bileşenler olarak α -pinen (sırasıyla % 75,6 ve % 29,2), β -pinen (sırasıyla % 9,5 ve % 2,2), kamfen (sırasıyla % 1,4 ve % 8,3) ve limonen (sırasıyla % 1,0 ve % 12,4) içerdiğini belirlemişlerdir. Yine benzer şekilde Türkiye' de yapılan bir araştırmada Kendirci ve Onogur (2011) sırasıyla Uzun, Kırmızı, Halebi, Siirt ve Ohadi olarak sınıflandırılan beş farklı taze Antepfıstığı varyetesinin uçucu bileşenlerini SPME/GC-MS yöntemiyle incelemiş ve tüm varyetelerin ana bileşenler olarak α -pinen (% 15,53-48,57), α -terpinolen (% 1,66-3,06), limonen (% 3,15-30,04) ve mirsen (% 3,50-8,95) içerdiğini tespit etmişlerdir. Kalalinia ve ark. (2008) tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise İnan bölgesinde yetişen *P. vera* reçinesini hidrodestilasyon uçucu yağı GC-MS ile analiz edilmiş ve uçucu yağın α -pinen, β -pinen ve α -tujen ana bileşenlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. nceki araştırma bulguları mevcut sonuçlar ile tam bir uyum içerisinde olup Antep fıstığı sap kısımlarının hoş aroma kokusunun α -pinen, β -pinen, limonen, 3-karen, 4-karen, α -terpinolen ve mirsen gibi monoterpen hidrokarbonlardan ileri geldiğine işaret etmektedir.

Antep fıstığının sap kloroform ekstresi üzerinde Kolon Kromatografisi, İnce Tabaka Kromatografisi ve kristallendirme yöntemlerini kullanarak yapılan izolasyon çalışmaları ile **PVSC-1**, **PVSC-2**, **PVSC-3** ve **PVSC-4** olarak kodlanan toplam dört triterpen sınıfı metabolit saflaştırıldı. Saflaştırılan bu moleküllerin kimyasal yapıları FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR ve 2D-NMR yöntemleri ile karakterize edildi. **PVSC-1** ve **PVSC-**

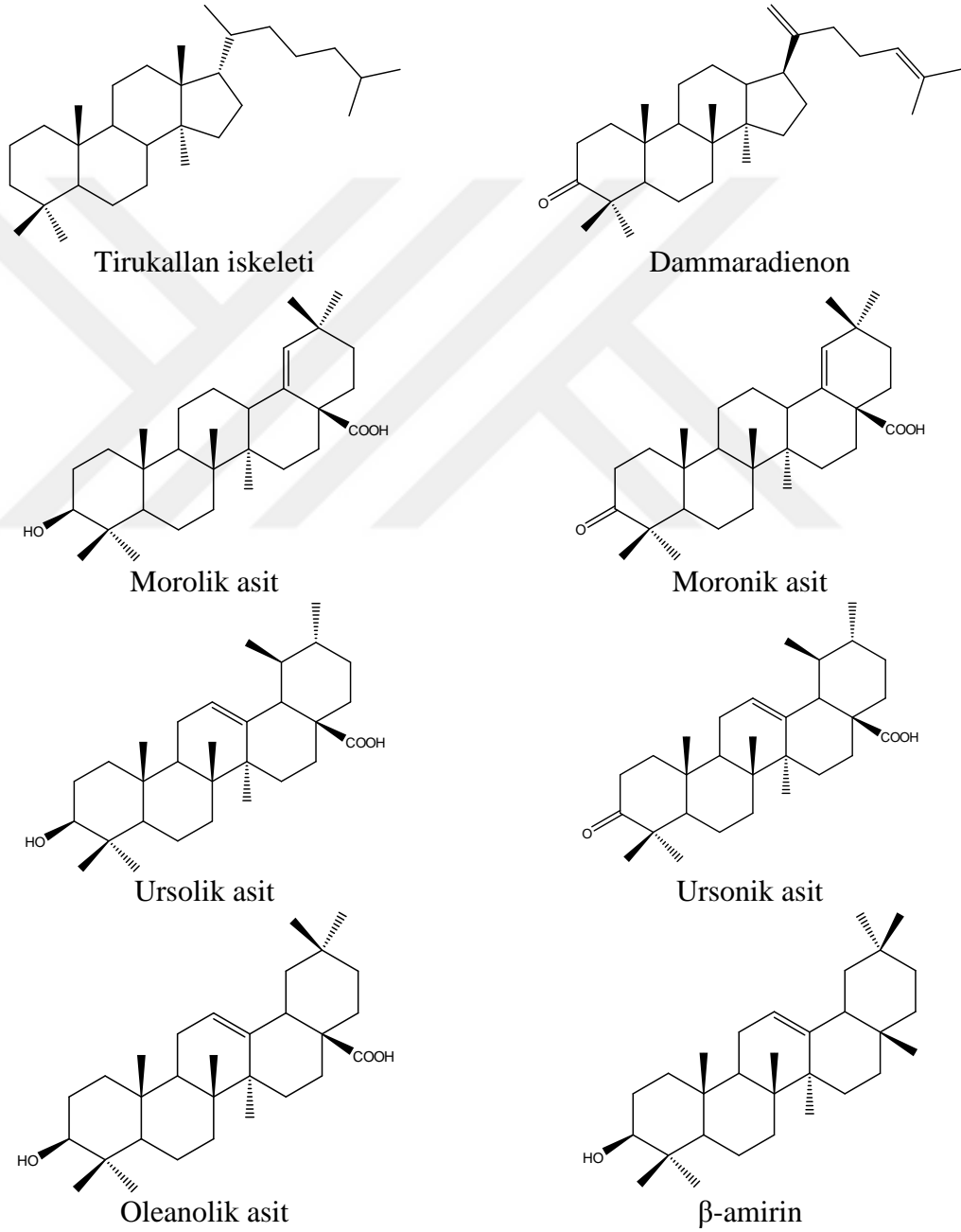
2 kodlu metabolitlerin spektroskopik verilerinin yorumlanması sonucu bu moleküllerin aynı madde olduğu belirlendi. Bu nedenle Antep fıstığının kloroform ekstresinden toplam üç adet triterpen sınıfı molekül saflaştırıldı ve kimyasal yapıları **mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2)**, **tirukallol (PVSC-3)** ve **mastikadienolik asit (PVSC-4)** olarak karakterize edildi (Şekil 4.1). Bu moleküller bilinen moleküller olup *P. lentiscus*, *P. vera*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*, *P. khinjuk* gibi *Pistacia* türleri için (özellikle reçineleri için) karakteristik triterpen sınıfı moleküllerdir (Caputo ve ark., 1978; Nicholson ve ark., 2011; Bozorgi ve ark., 2013; Vuorinen ve ark., 2015; Rauf ve ark., 2017).



Şekil 4.1. Sap kloroform ekstresinden saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapısı

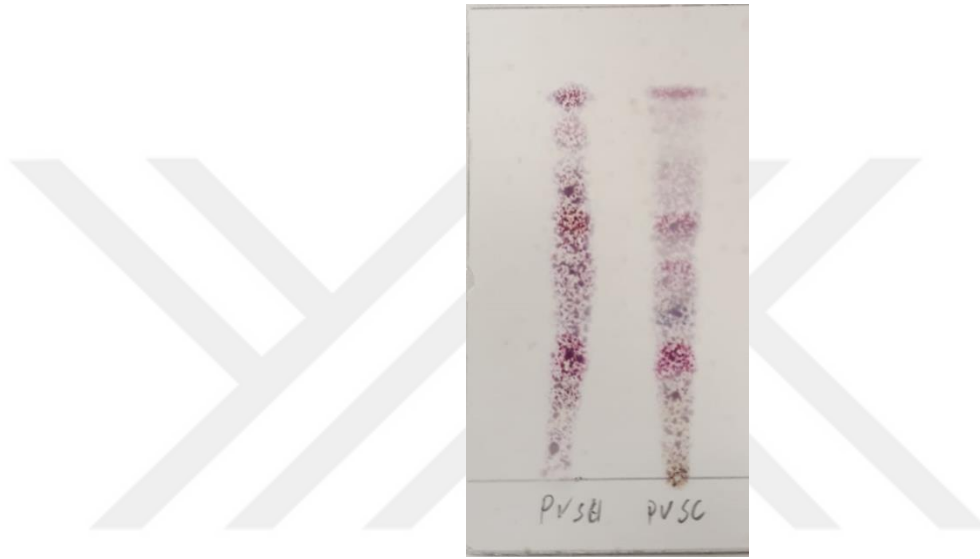
Pistacia türlerinin özellikle reçineleri dört- veya beş halkalı triterpenler bakımından zengin türlerdir (Bozorgi ve ark., 2013; Rauf ve ark., 2017). Mastikadienonik asit (PVSC-1 ve PVSC-2), mastikadienolik asit (PVSC-4), moronik asit, oleanolik asit, ursonik asit ve bu asitlerin türevleri, dammaradienon, tirukallol (PVSC-3), β -amirin ve lupeol gibi dört ve beş halkalı triterpen sınıfı maddeler (Şekil 4.2.) *P. lentiscus*, *P. terebinthus* ve *P. atlantica* reçinesinde tespit edilmiştir (Assimopoulou ve ark., 2005; Assimopoulou ve Papageorgiou, 2005; Sharifi ve Hazell, 2012; Bozorgi ve ark., 2013;

Rauf ve ark., 2017). Mevcut çalışmada ise reçine içeren meyve sap kısımlarından dört halkalı triterpenlerden mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**), tirukallol (**PVSC-3**) gibi tirukallan iskeleti içeren moleküller saflaştırıldı (Şekil 4.1). Moronik asit, ursonik asit, oleanolik asit gibi triterpenler (Şekil 4.2) ise saflaştırılmadı veya örnekte bulunamadı. Çünkü kromatografik yöntemlerle izolasyon çalışmalarımız sırasında bazı triterpen tipi maddelerin yakın polaritelerinden dolayı kromatografik yöntemlerle birbirinden ayrılamadı.



Şekil 4.2. *Pistacia* türlerinden izole edilen diğer triterpenlerin kimyasal yapısı

Bununla beraber, Antep fıstığının sap hekzan ekstresinin keskin aroma kokusunu veren uçucu bileşenler ekstrede düşük oranda bulunup ekstrenin daha ziyade yukarıda sözü geçen triterpen bileşenler bakımından zengin olduğu mevcut çalışmada belirlendi. Hem hekzan ekstresi, hem de kloroform ekstresi İTK'da hekzan-EtOAc (8:2) kontrol edildi ve Rf değerlerine göre aynı maddeleri içerdiği tespit edildi (Şekil 4.3). Hekzan ekstresinde ayrıca bir çöken madde saflaştırıldı ve saflaştırılan maddenin mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) olduğu tespit edildi.

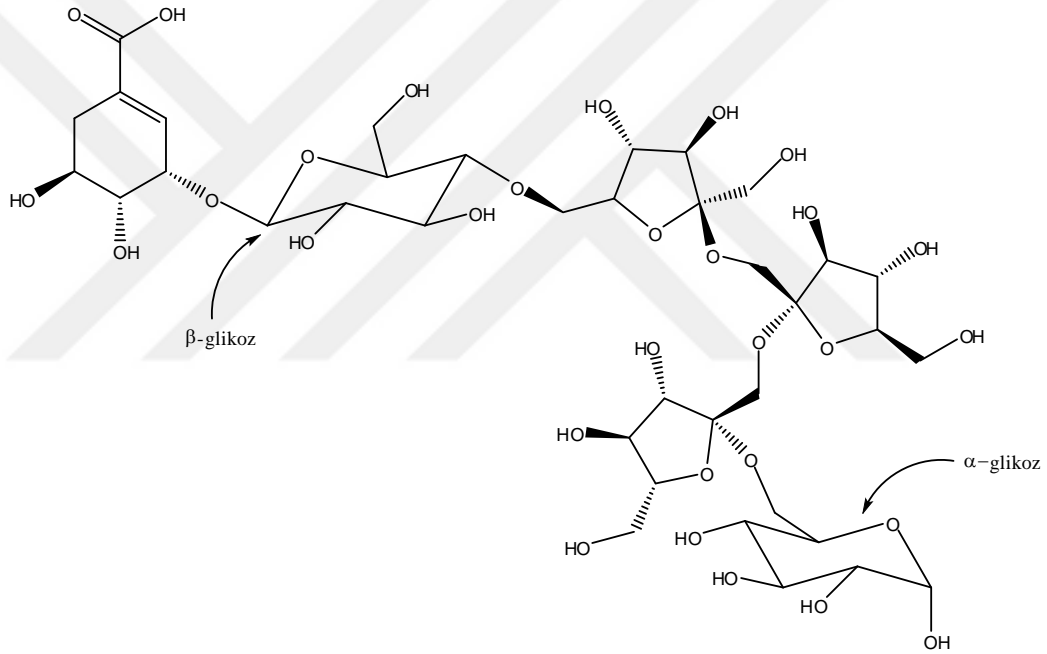


Şekil 4.3. Hekzan ve kloroform ekstrelerinin İTK sonuçları

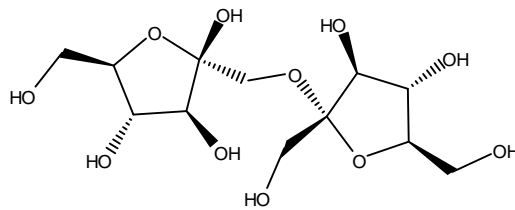
Antep fıstığının sap kısmının etanol ekstresi üzerinde Kolon Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri ile **PVSE-1** ve **PVSE-2** olarak kodlanan toplam iki metabolit saflaştırıldı. Saflaştırılan bu moleküllerin kimyasal yapıları FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR ve 2D-NMR yöntemleri ile **pistasionik asit (PVSE-1)** ve **inulobioz (PVSE-2)** olarak karakterize edildi (Şekil 4.4). Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülü literatür için yeni bir molekül iken, inulobioz (**PVSE-2**) difruktan disakkariti ilk kez bu çalışmada *P. vera* türünden izole edildi. İnulobioz (**PVSE-2**) disakkarit molekülü bazı baharat bitkilerinin yanı sıra bir çok bitki türünde daha yaygın olarak bulunan bir moleküldür (Ishiguro ve ark., 2011; Jan Mei ve ark., 2010; Fujishima ve ark., 2009). İnulobioz (**PVSE-2**) *Artemisia absinthium* (acı pelin otu, pelin otu) bitkisinin yapraklarının ve *Artemisia dracunculus* (tarragon, tarhun) bitkisinin köklerinin de önemli bir bileşenidir (Ishiguro ve ark., 2011).

Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün FTIR spektrumunda (Şekil 3.25) $3334,96\text{ cm}^{-1}$ deki fazla sayıda $-\text{OH}$ grubundan ileri gelen çok kuvvetli absorbands bandı da molekülün polar bir oligosakkarit molekülü olabileceğini göstermektedir. Moleküldeki fazla sayıdaki C-O titreşim bandı $1050,98\text{ cm}^{-1}$ de kuvvetli bir bant olarak gözlemlenirken, C=O titreşim bandı ise $1697,93\text{ cm}^{-1}$ 'de biraz daha zayıf bant olarak gözlemlendi (Erdik, 1998; Fessenden ve Fessenden, 2001). Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.26) $\delta=3-5$ ppm aralığındaki kalabalık sinyaller de molekülün bir oligosakkarit olduğunu doğrulamaktadır. Diğer taraftan $\delta=6,56$ ppm deki s sinyal ile $\delta=1,99$ ppm ve $\delta=2,40$ ppm civarındaki iki ayrı d ($J=17,69$ Hz ve $J=11,86$ Hz) sinyal oligosakkarit molekülünün shikimic asit türevi olduğunu göstermektedir. **PVSE-1** molekülünün sudaki çözeltisinin pH değerinin 2,56 olarak ölçülmesi de molekülün asidik karakterli olduğuna delil oluşturmaktadır. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün shikimic asit türevi olduğu molekülün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.27) $\delta=168,6$ ppm (C-7), $\delta=138,9$ ppm (C-2), $\delta=129,0$ ppm (C-1) ve $\delta=30,4$ ppm'de (C-6) gözlenen C sinyalleri ile de uyumludur. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.26) $\delta=4,27$ ppm ve $\delta=4,91$ ppm'de iki adet anomerik H atomlarına ait sinyal gözlemlenmiştir. Anomerik H atomlarına ait $\delta=4,27$ ppm ve $\delta=4,91$ ppm'de gözlenen iki d sinyal için etkileşme sabitleri sırasıyla $J=7,80$ Hz ve $J=2,96$ Hz olarak hesaplandı. Etkileşme sabitlerinden monosakkaritin kuvvetli ihtimal glikoz olduğu ve birinin α - bağı değerinin ise β - bağı ile bağlandığı sonucu çıkarıldı. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.27) $\delta=104,5$ ppm, $\delta=102,2$ ppm ve $\delta=98,4$ ppm'de gözlenen üç adet kuarternar C sinyali bizde molekülün üç adet fruktoz birimi içerdiği düşüncesini oluşturdu. Glikoz birimlerine ait anomerik C sinyalleri ise $\delta=97,1$ ppm ve $\delta=92,5$ ppm'de gözlemlendi. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün DEPT-135 ve DEPT-90 $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.28) molekülde sekiz adet metilen ($-\text{CH}_2-$) ve değişik şiddetlerde yirmi adet metin ($-\text{CH}-$) sinyali gözlemlenmesi verisine dayanarak molekülün iki glikoz birimi üç adet de fruktoz birimi içerdiği sonucuna varıldı. Molekülünün ^1H , $^1\text{H-COSY}$ spektrumunda (Şekil 3.29) $\delta=6,55$ ppm'deki sinyalin (H-2), $\delta=1,99$ ppm ve $\delta=2,40$ ppm deki shikimic asitin H-6 atomlarına ait sinyallerin yanı sıra $\delta=4,27$ ppm'deki anomerik H atomuna ait sinyal ile zayıf korelasyonu (uzak bağ etkileşimleri) glikoz biriminin shikimic asitin üç nolu C atomundan β - bağı ile bağlandığını göstermektedir. Literatürde oligosakkarit

sınıfı bileşiklerin yapısında bulunan D-fruktoz monosakkarit birimlerinin birbirine genellikle 1→2 pozisyonunda, D-glikoz ve D-galaktoz gibi monomer birimlerinin ise 1→4 pozisyonunda bağlandığı bildirilmiştir (Calub ve ark., 1990; Yun ve ark., 1997; Fujishma ve ark., 2009; Jan Mei ve ark., 2010). Bu bilgiler ışığında moleküldeki D-fruktoz monosakkarit birimleri birbirine 1→2 pozisyonunda bağlanmış olacağı düşünüldü. Pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülünün DNS testinde konsantrasyon artışına bağlı olarak renk şiddetindeki artış molekülün indirgen bir şeker olduğuna delil oluşturmaktadır. Ancak mevcut spektroskopik veriler monosakkarit birimlerinin birbirine tam bağlanma pozisyonlarını belirlemede yetersiz kaldığından tahmini bir yapı önerilmiştir (Şekil 4.4).



Pistasionik asit (**PVSE-1**)



İnulobioz (**PVSE-2**)

Şekil 4.4. Sap etanol ekstresinden saflaştırılan moleküllerin kimyasal yapısı

Enzim aktivitesinin ölçülmesi hastalık tanımında oldukça önemli bir süreçtir ve bu yolla pek çok kalıtsal bozukluğun tanısı konulabilmekte ve hastalığın geleceği ile ilgili bilgiler elde edilebilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Onat ve Emerk, 1996). Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin değişik etkenlerle azaltılması veya tamamen durdurulması olayına inhibisyon adı verilir. Enzim inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan birçok ilaç veya toksinler etkilerini bu yol üzerinden gösterirler. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında oldukça önemli araçlardır (Keha and Küfrevioğlu, 2010; Sunguroğlu, 2014). Diyabetes mellitus veya diyabet hem insülin üretimi yetersizliği hem de insüline dirençten kaynaklanan ve de yüksek kan glikoz düzeyi ile karakterize edilen yaygın kronik bir hastalık olarak bilinir (Ceylan, 2015). Diyabet ekonomik gelişme ile beraber beslenme düzenindeki değişime bağlı olarak dünyada her geçen gün artan bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Diyabet hastalarının büyük bir çoğunluğu (% 80-90) insüline bağlı olmayan tip 2 diyabet hastaları olup etiyolojisinde insülin direnci esastır. Ancak insülin direnci olmayan hem tip 1 hem de tip 2 diyabet hastalığında nefropati, ateroskleroz ve iskemik kalp hastalıklarının riskinin daha fazla olduğu iyi bilinmektedir (Bayraktar, 2001; Mazzone ve ark., 2008; Ceylan, 2015.). Günümüzde Tip 2 diyabet tedavisinde en yaygın yaklaşım sindirim sistemindeki iki önemli enzim olan α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibisyonu sonucu beslenme sonrası hiperglisemiyi azaltmaktır (Laube, 2002; Singh ve ark., 2010; Çalışkan, 2011; Ceylan, 2015; Laube, 2002; Ceylan, 2015).

Antep fıstığı sap kısımlarının antidiyabetik potansiyelini ortaya koymak üzere mevcut çalışmada meyve sap kısımlarından elde edilen hekzan, kloroform ve etanol ekstreleri ile bu ekstrelerden saflaştırılan mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**), tirukallol (**PVSC-3**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**), pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) moleküllerinin α -glikozidaz ve α -amilaz enzim aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* şartlarda test edildi. Tüm test edilen reaktiflerin antidiyabetik özelliği diyabet tedavisinde kullanılan akarboz ilaç etken maddesinin antidiyabetik özelliği (Bayraktar, 2001) ile mukayese edildi. Uygulanan tüm ekstreler ve saf metabolitler konsantrasyon artışına bağlı olarak değişik konsantrasyonlarda α -glikozidaz enziminin aktivitesi üzerine değişik oranlarda anlamlı inhibisyon etkileri sergiledi. Test edilen diğer tüm ekstreler ve saf metabolitler akarboza nazaran daha düşük konsantrasyonlarda

inhibisyon etkisine sahiplerdi. Akarboz ilaç etken maddesi 5-80 mg/mL konsantrasyon aralığında α -glikozidaz enziminin aktivitesini % 37,37-89,65 aralığında inhibe etti. Saf maddelerin ve ekstrelerin α -glikozidaz enzimine karşı inhibisyon etkinliğini kendi aralarında mukayese etmek için IC_{50} ve IC_{90} değerleri hesaplandı (Çizelge 3.12). Düşük IC_{50} veya IC_{90} değerleri yüksek inhibisyon etkiyi göstermektedir. Bu değerlere göre en etkin örnekler olarak ekstreler arasında 0,09 mg/mL IC_{50} değeri ile hekzan ekstresi, saf metabolitler arasında ise 0,03 mg/mL IC_{50} değeri ile mastikadienolik asit (**PVSC-4**) belirlendi. Bununla beraber kloroform ekstresinin ($IC_{50}=0,98$ mg/mL), mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **PVSC-2**) ($IC_{50}=0,13$ mg/mL) ve tirukallol molekülün (**PVSC-3**) ($IC_{50}=1,07$ mg/mL) akarboza ($IC_{50}=10,30$ mg/mL) göre çok daha etkin reaktifler olduğu gözlemlendi. Mevcut araştırmada, ayrıca kloroform ekstresi ile bu ekstreten saflaştırılan saf metabolitlerin birbirine yakın inhibisyon etkilerine sahip oldukları tespit edildi. Diğer taraftan, çok etkin olan hekzan ekstresinin de kloroform ekstresi ile İTK analizine göre sadece miktarları farklı olmak üzere aynı maddeleri içerdiği tespit edildi (Şekil 4.3). Etanol ekstresi ($IC_{50}=0,52$ mg/mL) ile bu ekstreten saflaştırılan pistasionik asit (**PVSE-1**) ($IC_{50}=4,44$ mg/mL) ve inulobiozun (**PVSE-2**) ($IC_{50}=1,87$ mg/mL) IC_{50} inhibisyon değerleri dikkate alındığında etanol ekstresinin saf metabolitlerden daha aktif olduğu görülmektedir. Bu durum ekstrede bulunan diğer minör metabolitlerin bu enzime karşı aktif olduğunu ya da metabolitler arasında sinerjik bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. Bu verilere dayanarak mevcut çalışmadaki test edilen tüm ekstre ve metabolitlerin antidiyabetik özelliğinin α -glikozidaz inhibisyonu açısından akarbozdan daha yüksek olduğu tespit edildi. Bizim çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Uddin ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada mastikadienonik asitten (**PVSC-1** ve **2**) kimyasal yapı bakımından sadece bir ikili bağın pozisyonunun değiştiği izomeri pistagremik asidin (isomastikadienonik asit) α -glikozidaz enzimine karşı güçlü bir inhibitör olduğunu belirlediler. Vuarinen ve ark. (2015) antidiyabetik olarak kullanılan *P. lentiscus* reçinesinden (mastic) (Triantafyllou ve ark., 2007) saflaştırılan mastikadienonik (**PVSE-1** ve **2**) ve izomastikadienonik asitin diyabet tedavisinde önemli olan 11β -hidroksisteroid dehidrogenaz 1 enziminin seçici inhibitörleri olduğunu rapor ettiler.

α -Glikozidaz enzim aktiviteleri çalışmalarında olduğu gibi hekzan ekstresi hariç diğer ekstre ve tüm metabolitler α -amilaz enzimin aktivitesini değişik oranlarda konsantrasyona bağımlı olarak inhibe ettikleri gözlemlendi. Bununla beraber, aktif olan

ekstre ve saf moleküller α -glikozidaz enziminin aksine α -amilaz enzimini daha yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettikleri belirlendi. *P. vera* sap hekzan ekstresi ise inhibisyon etkisinin aksine aktivasyon etkisi sergileyerek α -amilaz enziminin aktivitesini artırdı. İTK analizine göre kloroform ekstresi ile benzer kimyasal bileşime sahip olan hekzan ekstresinin α -amilaz enzimini aktive etmesi ilginç bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum ekstredeki diğer minör ve de farklı maddelerin majör maddelerle sinerjik veya antagonistik etkileşimlerine atfedilebilir. Mevcut çalışma sonuçları ayrıca antidiyabetik ilaç etken maddesi akarbozun α -amilaz enzimine karşı α -glikozidaz enzimine göre çok daha güçlü bir inhibitör olduğunu gösterdi. Saf moleküllerin ve ekstrelerin α -amilaz enzimine karşı inhibisyon etkinliğini kendi arasında mukayese etmek üzere IC_{50} ve IC_{90} değerleri hesaplandı (Çizelge 3.22). Çizelge 3.22'den görüldüğü üzere α -amilaz enzimine karşı en düşük IC_{50} değeri antidiyabetik ilaç etken maddesi akarboz için ($IC_{50}=0,07$ mg/mL) belirlenirken, ekstre ve saf metabolitler arasında ise $IC_{50}=5,17$ mg/mL ile etanol ekstresi için sonra da $IC_{50}=7,58$ mg/mL ile tirukallol (**PVSC-3**) molekülü için tespit edildi. Etanol ekstresinden saflaştırılan pistasionik asit (**PVSE-1**) molekülü $IC_{50}=7,35$ mg/mL ile α -amilaza karşı etanol ekstresine göre ($IC_{50}=5,17$ mg/mL) daha zayıf bir inhibitör olarak davrandı. Mevcut çalışma sonuçları ayrıca sap kloroform ekstresine ($IC_{50}=55,89$ mg/mL) nazaran bu ekstrede saflaştırılan mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**) ($IC_{50}=39,45$ mg/mL), tirukallol (**PVSC-3**) ($IC_{50}=7,58$ mg/mL) ve mastikadienolik asit (**PVSC-4**) ($IC_{50}=8,22$ mg/mL) gibi saf metabolitlerin daha düşük IC_{50} değerleri ile daha aktif olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar ekstre ile ekstrelerdeki metabolitlerin farklı biyolojik aktivite sergileyebileceklerini göstermekte olup bilimsel çalışmalarda ekstrelerdeki metabolitlerin saflaştırılarak aktivite çalışmalarının yapılması gerektiğinin önemine işaret etmektedir. Yapılan literatür taramalarına göre *Pistacia* türleri ekstre ve saf metabolitlerinin α -amilaz enzimine karşı inhibisyon etkileri üzerine sınırlı sayıda bir kayda rastlanmış olup söz konusu çalışmalarda genellikle ekstreler test edilmiş ve etken maddeler saflaştırılarak test edilmemiştir (Hamdan ve Afifi, 2004; Kasabri ve ark., 2011; Foddai ve ark., 2015; Kilic ve ark., 2016; Mehenni ve ark., 2016; Ben Ahmed ve ark., 2018; Noguera-Artiaga ve ark., 2018). Bu yönü ile mevcut sonuçlar literatür için yeni bilgiler içermektedir.

Alzheimer ileri yaştaki insanlarda karşılaşılan bir beyin hastalığı olup dünyada 20 milyona yakın insanın Alzheimer hastalığından muzdarip kişi olduğu tahmin edilmektedir. Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığının görülme sıklığı, yaş ile orantılı olarak artmaktadır. Alzheimer hastalığında beynin bazı bölgelerindeki hücrelerin yavaş yavaş kaybolması sonucu hafıza, konuşma, insanları tanıma gibi fonksiyonlar zayıflar ve kişilerde davranış bozuklukları görülmeye başlar (Aynacı, ve ark., 2014). Alzheimer hastalığının diğer bir sebebinin de, beyindeki kolinerjik kayıp olduğu gösterilmiştir. Kolinerjik kavşak ve sinapslardan salınan asetilkolin miktarının Alzheimer hastalarında azaldığının saptanması ile, 1970'lerde asetilkolini hidroliz yoluyla parçalayan bir enzim olan AChE inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir tedavi yolu ortaya konmuştur (Francis ve ark. 1999; Quinn, 1987). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, BChE miktarının da AChE gibi Alzheimer hastalarının beyinlerinde normal beyinlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Massouile ve ark., 1993). AChE enzimi, vücutta merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda; BChE enzimi ise karaciğer ve plazma dahil bir çok doku ile merkezi ve periferik sinir sisteminde daha yaygın olarak bulunmaktadır (Quinn, 1987). Dolayısıyla, BChE enziminin inhibisyonunun da asetilkolinesteraz inhibe eden ilaçlarla doğrudan ilgili olabileceği düşünülmüş ve takrin, huperzin A, donepeil, rivastigmin, neostigmin, galantamin gibi kolinesteraz inhibitörleri 1990'lerden itibaren Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanıma sunulmuştur (Aynacı ve ark., 2014; Türkoğlu ve Güloğlu, 2004).

Diğer taraftan bilim dünyasında yeni kolinesteraz enzim inhibitörlerinin bulunmasına yönelik bilimsel çalışmalar hala artarak devam etmektedir. Bu bağlamda mevcut çalışmada *P. vera* sap kısmından elde edilen hekzan, kloroform ve etanol ekstraları ile kloroform ve etanol ekstralarından elde edilen mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**), tirukallol (**PVSC-3**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**), yeni molekül pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz disakkarit molekülü (**PVSE-2**) hem AChE hem de BChE enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemek üzere test edildi. Ekstreler ve saf moleküllerin inhibisyon etkileri ticari kolinesteraz enzimleri inhibitörleri olan neostigmin ve galantamin molekülleri ile ayrıca mukayese edildi (Karuncula, 2013; Obara ve ark., 2017; Saeed ve ark., 2017; Ilie ve ark., 2018). Kolinesteraz enzim inhibitörleri neostigmin ve galantamin düşük konsantrasyonlarda (0,25-5 mg/mL)

AChE enzimini % 42,92-91,25 oranında inhibe ettikleri belirlendi. Diğer taraftan, *P. vera* sap hekzan ve kloroform ekstreleri düşük konsantrasyonlarda (0,1-10 mg/mL) etkisiz iken daha yüksek konsantrasyon aralığında (20-160 mg/mL) % 25,14-91,16 oranında inhibisyon etkileri sergiledikleri tespit edildi. Sap etanol ekstresi ve bu ekstrelerden saflaştırılan pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) 10-80 mg/mL konsantrasyon aralığında dahi AChE enzimine karşı aktif olmadığı gözlemlendi. Etkin saf moleküllerin ve ekstrelerin AChE enzimine karşı inhibisyon etkinliğini kendi aralarında mukayese etmek üzere IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.33). Bu çizelgeden görüleceği üzere neostigmin ve galantamin için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,41 mg/mL ve 1,08 mg/mL olarak belirlendi. Diğer taraftan hekzan ve kloroform ekstreleri ile saf metabolitler için IC₅₀ değerleri yüksek olup 42,55-96,92 mg/mL aralığında tespit edildi. Saf metabolitler arasında en aktif molekülün IC₅₀=42,55 mg/mL ile tirukallol (**PVSC-3**) olduğu gözlemlendi. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**) ve mastikadienolik asit (**PVSC-4**) için IC₅₀ değerleri sırasıyla 71,49 mg/mL ve 63,27 mg/mL olarak hesaplandı. Benzer ancak farklı oranlarda aynı bileşikler içeren hekzan ve kloroform ekstreleri kendi arasında mukayese edildiğinde kloroform ekstresinin daha düşük IC₅₀ değeri ile (IC₅₀=65,86 mg/mL) hekzan ekstresine göre (IC₅₀=96,92 mg/mL) daha aktif olduğu belirlendi (Çizelge 3.33).

AChE enziminin aksine BChE enzimi hem pozitif kontrol olarak kullanılan neostigmin ve galantamin moleküllerine hem de *P. vera* sap ekstreleri ile kloroform ve etanol ekstrelerinden saflaştırılan metabolitlere daha hassas bir enzim olarak davrandı. Beklenildiği gibi neostigmin ve galantamin molekülleri çok düşük konsantrasyon aralığında (0,05-1 mg/mL) dahi BChE enziminin aktivitesini % 29,0-93,84 oranında azalttığı gözlemlendi. Diğer taraftan *P. vera* sap ekstreleri ve ekstrelerden saflaştırılan saf metabolitler daha yüksek konsantrasyon aralığında (5-160 mg/mL) BChE enzimine karşı değişik oranlarda inhibisyon etkisi sergilediler. Etkin saf moleküllerin ve ekstrelerin BChE enzimine karşı inhibisyon etkinliğini kendi aralarında mukayese etmek üzere IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.44). Bu çizelgeden görüleceği üzere ekstreler ve saf metabolitler BChE enzimine karşı AChE enzimine nazaran daha düşük IC₅₀ değerleri ile daha aktif oldukları açıkça görünmektedir. Ekstre ve saf metabolitler için IC₅₀ değerleri 3,72-131,67 mg/mL aralığında belirlendi. Ekstre ve saf metabolitlerin IC₅₀ değerlerine göre BChE enzimin aktivitesinin azaltılmasına yönelik

en etkin uygulamanın $IC_{50}=3,72$ mg/mL ile mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**) molekülünün olduğu görünmektedir. Mastikadienonik asit (**PVSC-1** ve **2**) hariç kloroform ekstresi düşük IC_{50} değeri ile ($IC_{50}=15,20$ mg/mL) bu ekstreden saflaştırılan metabolitlere göre daha iyi bir inhibitör olduğu dikkat çekmektedir. Diğer bir dikkat çeken sonuç ise kloroform ekstresinden saflaştırılan diğer metabolitlere göre AChE enzimine karşı en etkin olan tirukallol (**PVSC-3**) molekülünün BChE enzimine karşı daha az etkin bir inhibitör olmasıdır. Bununla beraber BChE enziminin aktivitesine karşı etanol ekstresi ile bu ekstreden saflaştırılan pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) moleküllerinin inhibitör özellikleri mukayese edildiğinde ekstrenin 42,47 mg/mL IC_{50} değeri ile daha iyi bir inhibitör olduğu görünmektedir (Çizelge 3.44). Bu durum ekstredeki saflaştırılmayan diğer metabolitlerden ya da ekstredeki bileşenler arasındaki sinerjik ve antagonistik etkileşimler ile açıklanabilir. Mevcut sonuçlar ayrıca bize biyolojik aktivite çalışmalarında ekstre ve ekstredeki saf metabolitlerin farklı özellik sergileyebileceğini açıkça göstermektedir.

Bazı *Pistacia* türlerinin ve bu türlerden izole edilen bazı metabolitlerin kolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemeye yönelik literatürde bazı bilimsel makalelere rastlanmıştır (Jazayeri ve ark., 2014; Kilic ve ark., 2016; Ammari ve ark., 2018; Zahoor ve ark., 2018). Jazayeri ark. (2014) yaptıkları çalışmada İran'da geleneksel tıpta kullanılan bir çok bitkinin yanı sıra *P. vera* bitkisinin metanol-su (1:1) ekstresinin de antikolinesteraz özelliği bakımından araştırmış ve ekstrenin zayıf bir inhibitör olduğunu bildirmişlerdir. Ammari ve ark. (2018) *P. lentiscus* yağının lipopolisakkaritlerce uyarılmış beyin hasarına karşı neroprotektif özelliğini araştırmış ve yağın karaciğerde kolinesteraz enzimlerinin düzeyini azalttığını rapor etmişlerdir. Zahoor ve ark. (2018) *P. integerrima* türünün etil asetat ekstresinin AChE ve BChE enzimlerini sırasıyla % 80,80 ve % 82,56 oranında inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu çalışmaların yanı sıra *P. vera*'nın kabuk metanol ekstresinin AChE enziminin aktivitesine karşı dikkate değer bir inhibitör etki sergilediği literatürde kayıt altında alınmıştır (Kilic ve ark., 2016). Sözü geçen tüm çalışmalarda *P. vera*'nın sap kısımları çalışılmamış olup sap kısımdan elde edilen ekstrelerin ve bu ekstrelerden saflaştırılan masticadenonic asit (**PVSC-1** ve **2**), tirukallol (**PVSC-3**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**), yeni molekül pistasionik asit (**PVSE-1**) ve inulobioz (**PVSE-2**) saf metabolitlerinin

AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibitör etkileri ilk defa bu çalışmada ortaya konmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma ile literatüre aşağıda bahsi geçen önemli katkılar sağlanmıştır:

- *P. vera* sap kısımlarının kimyasal bileşimi kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle ilk defa bu çalışma ile araştırılmış ve bu kısımların ana bileşenler olarak tirukallan iskeleti içeren mastikadienonik asit (**PVSC-1 ve 2**), tirukallol (**PVSC-3**), mastikadienolik asit (**PVSC-4**) içerdiği tespit edilmiştir.
- *P. vera* sap kısımlarından polar yapılı pistasionik asit (**PVSE-1**) olarak adlandırılan yeni bir molekül izole edilmiş ve kimyasal yapısı kısmen karakterize edilmiştir.
- İnulinin hidrolizi ile sentezlenen inulobioz böbreğin normal çalışıp çalışmadığını belirlemek üzere medikal uygulamalarda glomerüler süzme hızı testi (GFR) için kullanılan bir molekül olup *P. vera* bitkisinde ilk defa bu çalışmada izole edilmiş ve kimyasal yapısı karakterize edilmiştir.
- *P. vera* sap kısımlarından elde edilen ekstre ve saf metabolitler ilk defa bu çalışmada dört farklı enzime (α -glikozidaz, α -amilaz, AChE ve BChE) karşı test edilerek antidiyabetik ve antikolinesteraz özellikleri ortaya konmuştur. Çalışma sonuçları ekstre ve metabolitlerin α -glikozidaz enziminin aktivitesi üzerine çok güçlü, α -amilaz enzimi aktivitesi üzerine ise orta derecede inhibitör olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar *P. vera* sap kısımlarının hem ekstreler hem de saf metabolitlerinin antidiyabetik ajanlar olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak hem ekstreler hem de saf metabolitlerin antidiyabetik özelliği, güvenilirliği ve toksisitesi yeni bilimsel çalışmalarla ortaya konmalıdır. Bu yönü ile mevcut çalışma sonuçları yeni projelere ve araştırma konularına basamak oluşturmaktadır.
- Mevcut çalışma sonuçları ekstreler ve ekstrelerden saflaştırılan saf metabolitlerin farklı özellikler sergileyebildiğini ekstredeki bileşenler arasında

sinerjik ve antagonistik etkileşimlerin olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle bilimsel çalışmalarda ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin yanı sıra ekstradaki bileşenlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması, kimyasal yapılarının spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmesi ve saf moleküllerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması önem arz etmektedir.

- Mevcut çalışma sonuçları ekstrelerin ve metabolitlerin düşük konsantrasyonlarda inhibitör olarak davranmazken, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör olarak davrandığını göstermiştir. Bu durum mevcut çalışmada kolinesteraz enzimleri için belirgin olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar yüksek konsantrasyon veya dozlarda kimyasal maddelerin toksik özellikler gösterebileceğine işaret etmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography (Mass Spectrometry. 4th edition. Allured publishing corp., Carol Stream, IL, USA.
- Aisen, P.S., Davis, K.L., 1997. The search for disease-modifying treatment for Alzheimer's disease. *Neurology* 48, 35-41.
- Aiyer, P.V. 2005. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology* 4 (13), 1535-1529.
- Alma, M.H., Nitz, S., Kolmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F.T., Yilmaz, N., 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (12), 3911-3914.
- Alpaslan, P, "Xanthium strumarium L. Bitkisinden Biyolojik Aktif Bileşiklerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Butirilkolin Esteraz İnhibisyon Aktivitelerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- Ammari, M., Othman, H., Hajri, A., Sakly, M., Abdelmelek, H., 2018. *Pistacia lentiscus* oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Research Bulletin* 140, 140-147.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005a. GC-MS analysis of penta- and etra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomedical Chromatography* 19(4), 285-311.
- Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005b. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. *chia*. *Biomedical Chromatography* 19(8), 586-605.
- Aynacı, E, Arslan, F, Nurşen Sarı, N, Yaşar, A, "Yeni Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve İnhibisyon Özelliklerinin İncelenmesi", 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 21-23 Mart 2014.
- Ballistreri, G., Catalano, A.E., Arena, E., Spagna, G., Fallico, B., 2011. Lipase and lipoxygenase activity of *Pistacia vera* L. *Acta Horticulturae* 912, 179-185.

- Barreca, D., Lagana, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., Bellocco, E., 2016. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls. Food Chemistry 196, 493-502.
- Bayraktar, M., 2001. Oral Hipoglisemikler. Türkiye Tıp Dergisi 8(Ek 1), 35-44.
- Baysal, A., 2012. Beslenme. 14. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.
- Baytop T., 1999. Türkiye’ de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri Baskısı, 2. baskı, İstanbul.
- Beard, C.M., Kökmen, E., Kurland, L.T., 1995. Prevalence of dementia is changing over time in rochester minnesota. Neurology 45, 75-79.
- Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., 2018. Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 149, 547-556.
- Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Surmaghi, M.H.S., Shams-Ardekani, M.R., Rahimi, R., 2013. Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. The Scientific World Journal 2013, Article ID 219815, 33 pages.
- Calub, T.M., Waterhouse, A.L., French, A.D., 1990. Conformational analysis of inulobiose by molecular mechanics. Carbonhydrate Research 207(2), 221-235.
- Caputo, R., Mangoni, L., Monaco, P., Palumbo, G., Aynenchi, Y., Bagheri, M., 1978. Tritrpenes from the bled resin of *Pistacia vera*. Phytchemistry 17,815-817.
- Ceylan, R., “Türkiye Endemiği *Lathyrus czechottianus* (Fabaceae)’un Antioksidan Kapasitesi ve Bazı Farmasötik Enzimler Üzerine İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi”, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015.
- Chahed, T., Dhifi, W., Mnif, W., Mhamdi, B., Marzouk, B., 2012. Changes in essential oil composition during *Pistacia vera* leaves development in Sfax region (Tunisia). Journal of Essential Oil Bearing Plants 15 (4), 602-608.
- Chahed, T., Dhifi, W., Hosni, K., Msaada, K., Kchouk, M.E., Marzouk, B., 2008. Composition of Tunisian pistachio hull essential oil during fruit formation and ripening. Journal of Essential Oil Research 20 (2), 122-125.

- Çalışkan, S., “*Geobacillus* sp. tarafından termostabil α -amilaz üretimi. Ankara Üniversitesi”, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- Çingiloğlu, E., “*Cyprinus carpio*’da Beyin Dokusunda Fenthion’un Antioksidan Savunma sistemi, Lipid peroksidasyonu ve Asetilkolinesteraz enzim aktivitesine N-asetilsistein Modülatörlüğünde Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- Çöleri, A., “Bazı Termofilik *Bacillus* Türlerinin Termostabil α -Glukozidaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- D'Arrigo, M., Bisignano, C., Irrera, P., Smeriglio, A., Zagami, R., Trombetta, D., Romeo, O., Mandalari, G., 2019. In vitro evaluation of the activity of an essential oil from *Pistacia vera* L. variety Bronte hull against *Candida* sp. BMC Complementary and Alternative Medicine, 19, Article Number: 6, DOI: 10.1186/s12906-018-2425-0.
- Dewi, R.T., Tachibana, S., Fajriah, S., Hanafi, M., 2015. Alpha-Glycosidase inhibitor compounds from *Aspergillus terreus* RCC1 and their antioxidant activity. Medicinal Chemistry Research 24(2), 737-743.
- Devarajan, S., Venugopal, S., 2012. Antioxidant and α -amylase inhibition activities of phenolic compounds in the extracts of Indian honey. Chinese Journal of Natural Medicines 10, 225-259.
- Dewick, P.M., 2002. “Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach”, II. Baskı, John Wiley & Sons Ltd. Yayınları, UK.
- Durak, M.Z., Ucak, G., 2015. Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus* L. extracts. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 39(1), 10-19.
- Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T., 2003. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. Fitoterapia 74 (1-2), 170-176.
- Ehsani, V., Amirteimoury, M., Taghipour, Z., Shamsizadeh, A., Bazmandegan, G., Rahnama, A., Khajehasani, F., Fatemi, I., 2017 Protective effect of hydroalcoholic

- extract of *Pistacia vera* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Renal Failure* 39 (1), 519-525.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R., 1961. A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Ersan, S., Ustundag, O.G., Carle, R., Schweiggert, R, M., 2016. Identification of phenolic compounds in red and green Pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(26), 5334-5344.
- Elya, B., Basalı, K., Munim, A., Yuliastuti, W., Bangun, A., Septiana, E.K., 2012. Screening of alpha-glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 281078, doi:10.1155/2012/281078, 6 pages.
- Fathalizadeh, J., Bagheri, V., Khorramdelazad, H., Arababadi, M.K., Jafarzadeh, A., Mirzaei, M.R., Shamsizadeh, A., Hajizadeh, M.R., 2015. Induction of apoptosis by pistachio (*Pistacia vera* L.) hull extract and its molecular mechanisms of action in human hepatoma cell line HepG2. *Cellular and Molecular Biology* 61 (7), 128-134.
- Fernandez-Arche, A., Saenz, M.T., Arroyo, M., de la Puerta, R., Garcia, M.D., 2010. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. *Phytomedicine* 17 (2), 146-148.
- Foddai, M., Kasabri, V., Afifi, F.U., Azara, E., Petretto, G.L., Pintore, G., 2015. In vitro inhibitory effects of Sardinian *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia terebinthus* L. on metabolic enzymes: Pancreatic lipase, alpha-amylase, and alpha-glucosidase. *Starch-Stärke* 67(1-2), 204-212.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The Cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66, 137-47.
- Fujishima, M., Furuyama, K., Ishihiro, Y., Onodera, S., Fukushi, E., Benkeblia, N., Shiomi, N., 2009. Isolation and structural analysis in vivo of newly synthesized fructooligosaccharides in onion bulbs tissues (*Allium cepa* L.) during storage.

- International Journal of Carbohydrate Chemistry 2009, Article ID 493737, doi:10.1155/2009/493737, 9 pages.
- Garavand, F., Madadlou, A., Moini, S., 2017. Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using high-performance liquid chromatography-diode array detector-electro-spray ionization-mass spectrometry as affected by ultrasound and microwave. International Journal of Food Properties 20 (1), 19-29.
- Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M., Monastero, M., Allegra, M., Livrea, M.A., 2007. Antioxidant activity of sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) nut extract and its bioactive components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (3), 643-648.
- Gezgin, D., 2007. Bitki Mitosları. 5. Baskı, Sel Yayıncılık, İstanbul.
- Gökdemir, G., “Antep Fıstığı (*P. vera* L.) Kuru Kırmızı Kabuğun (Perikarp) Fitokimyasal Bileşimi ve Saflaştırılan Sekonder Metabolitlerin Antitümör Özelliklerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2016.
- Güven, A., 2000. Asetil kolin esterazın önemi ve inhibitörleri. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 6 (1-2), 145-15.
- Hacıbekiroğlu, I., Yılmaz Koseoğlu, P., Hasimi, N., Kilinc, E., Tolan, V., Kolak, U., 2015. In vitro biological activities and fatty acid profiles of *Pistacia terebinthus* fruits and *Pistacia khinjuk* seeds. Natural Products Research 29(5), 444-446.
- Hamdan, I., Afifi, F.U., 2004. Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology 93(1), 117-121.
- Hashemi-Moghaddam, H., Mohammhosseini, M., Salar, M., 2014. Chemical composition of the essential oils from the hulls of *Pistacia vera* L. by using magnetic nanoparticle-assisted microwave (MW) distillation: comparison with routine MW and conventional hydrodistillation. Analytical Methods 6 (8), 2572-2579.

- Hosseinzadeh, H., Tabassi, S.A.S., Moghadam, N.M., Rashedinia, M., Mehri, S., 2012. Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits, leaves and gum extracts. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 11 (3), 879-887.
- <http://www.diabetcemiyeti.org/c/diyabet-istatistikleri>, erişim tarihi: 04 Mart 2019.
- <http://www.tdhd.org/pdf/VER%C4%B0LERLE%20D%C3%9CNYADA%20VE%20T%C3%9CRK%C4%B0YEDE%20D%C4%B0YABET.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2019.
- Ilie, A.C., Stefaniu, R., Handaric, M., Dascalescu, S., Ivascu, I., Alexa, I.D., 2018. Adverse effects of cholinesterase inhibitors in the elderly patient with myasthenia gravis. Case reports. Medical-Surgical Journal-Revista Medico-Chirurgicala 122(2), 314-317
- Ishiguro, Y., Ueno, K., Onodera, S., Benkeblia, N., Shiomi, N., 2011. Effects of temperature on inulobiose and inulooligosaccharides in burdock roots during storage. Journal of Food Composition and Analyses 24, 398-401.
- İlisulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1256, Ankara.
- Jan Mei, S., Mohd Nordin, M.S., Norrakiah, A.S., 2010. Fructooligosaccharides in honey and effects of honey on growth of Bifidobacterium longum BB 536. International Food Research Journal 17, 557-561.
- Jazayeri, S. B., Amanlou, A., Ghanadian, N., Pasalar, P., Amanlou, M., 2014. A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences 22 Article Number: 17.
- Kalalinia, F., Behravan, J., Ramezani, M., Hassanzadeh, M.K., Asadipour, A., 2008. Chemical composition, moderate in vitro antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Pistacia vera* L. and it's major constituents. Journal of Essential Oil Bearing Plants 11 (4), 376-383.
- Karuncula, C., “*Leuojum aestivum* L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.

- Kasabri, V., Afifi, F.U., Hamdan, I., 2011. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2), 888-896.
- Kavak, D.D., Altiok, E., Bayraktar, O., Ulku, S., 2010. *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible beta-glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 64(3-4), 167-171.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. *Biyokimya. Aktif Yayınevi, İstanbul.*
- Kendirci, P., Onogur, T., 2011 Investigation of volatile compounds and characterization of flavor profiles of fresh pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *International Journal of Food Properties* 14 (2), 319-330.
- Kilic, I. H., Sarikurkcu, C., Karagoz, I.D., Uren, M.C., Kocak, M.S., Cilkiz, M., Tepe, B., 2016. A significant by-product of the industrial processing of pistachios: shell skin - RP-HPLC analysis, and antioxidant and enzyme inhibitory activities of the methanol extracts of *Pistacia vera* L. shell skins cultivated in Gaziantep, Turkey. *RSC Advances* 6 (2), 1203-1209.
- Kisa, A., Akyuz, M., Cogun, H.Y., Kordali, S., Usanmaz Bozhoyuk, A., Tezel, B., Siltelioglu, U., Anil, B., Cakir, A., 2018. Effects of olive (*Olea europaea* L.) leaf metabolites on the tilapia (*Oreochromis niloticus*) and three stored pests, *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* and *Acanthoscelides obtectus*. *Records of Natural Products* 12(3), 201-215.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.H., Elmadfa, I., 2006. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry* 98: 381–387.
- Koçyiğit, M., “Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005.
- Koyuncu, I., Kocyigit, A., Dikme, R., Selek, S., 2018. Phytotherapeutic properties of Urfa pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *Bezmialem Science* 6 (3), 200-205.
- Küçüköner, E., Yurt, B., 2003. Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology* 217, 308–310.
- Laube, H., 2002, Acarbose: An update of its therapeutic use in diabetes treatment. *Clinical Drug Investigation*, 22, 141–156.

- Loizou, S., Paraschos, S., Mitakou, S., Chrousos, G.P., Lekakis, I., Moutsatsou, P., 2009. Chios mastic gum extract and isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Experimental Biology and Medicine* 234 (5), 553-561.
- Mahmoudvand, H., Dezaki, E.S., Ezatpour, B., Sharifi, I., Kheirandish, F., Rashidipour, M., 2016. In vitro and in vivo antileishmanial activities of *Pistacia vera* essential oil. *Planta Medica* 82 (4), 279-284.
- Martorana, M., Arcoraci, T., Rizza, L., Cristani, M., Bonina, F. P., Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., 2013. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* 85, 41-48.
- Maskan, M., Karatas, S., 1998. Fatty acid oxidation of Pistachio nuts stored under various atmospheric conditions and different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 334-340.
- Marinou, K.A, Georgopoulou, K., Agrogiannis, G., Karatzas, T., Iliopoulos, D., Papalois, A., Chatziioannou, A., Magiatis, P., Halabalaki, M., Tsantila, N., Skaltsounis, L.A., Patsouris, E., Dontas, I.A., 2010. Differential effect of *Pistacia vera* extracts on experimental atherosclerosis in the rabbit animal model: an experimental study. *Lipids in Health and Disease* 9, article number:73.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Valette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology* 41, 31-91.
- Mazzone, T., Chait, A., Plutzky, J., 2008. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *The Lancet* 371 (9626), 1800-1809.
- Mehenni, C., Atmani-Kilani, D., Dumarcay, S., Perrin, D., Gerardin, P., Atmani, D., 2016. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis* 24 (3), 653-669.
- Middleton, E., 1977. The molecular configuration of inulin: Implications for ultrafiltration theory and glomerular permeability. *Journal of Membrane Biology* 34 (1), 93-101.
- Mirian, M., Behrooeian, M., Ghanadian, M., Dana, N., Sadeghi-Aliabadi, H., 2015. Cytotoxicity and antiangiogenic effects of *Rhus*

- coriaria*, *Pistacia vera* and *Pistacia khinjuk* oleoresin methanol extracts. Research in Pharmaceutical Sciences 10 (3), 233-240.
- Noguera-Artiaga, L., Perez-Lopez, D., Burgos-Hernandez, A., Wojdylo, A., Carbonell-Barrachina, A.A., 2018. Phenolic and triterpenoid composition and inhibition of alpha-amylase of pistachio kernels (*Pistacia vera* L.) as affected by rootstock and irrigation treatment. Food Chemistry 261, 240-245.
- Napoli, E., Gentile, D., Ruberto, G. 2019. GC-MS analysis of terpenes from Sicilian *Pistacia vera* L. oleoresin. A source of biologically active compounds. Biomedical Chromatography 33 (2), Article Number: e4381.
- Nicholson, T.M., Gradl, M., Welte, B., Metzger, M., Pusch, C.M., Albert, K., 2011. Enlightening the past: Analytical proof for the use of *Pistacia* exudates in ancient Egyptian embalming resins. Journal of Separation Science 34, 3364-3371.
- Obara, K., Chino, D., Tanaka, Y., 2017. Long-Lasting inhibitory effects of distigmine on recombinant human acetylcholinesterase activity. Biological & Pharmaceutical Bulletin 40(10), 1739-1746.
- Onat, T., Emerk, K., 1996. Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık San. ve Tic. Ltd. Şti. baskısı, Bornova, İzmir.
- Orhan, I., Aslan, M., Sener, B., Kaiser, M., Tasdemir, D., 2006a. In vitro antiprotozoal activity of the lipophilic extracts of different parts of Turkish *Pistacia vera* L. Phytomedicine 13 (9-10), 735-739.
- Orhan, I., Kupeli, E., Aslan, M., Kartal, M., Yesilada, E., 2006b. Bioassay-guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera* L. Journal of Ethnopharmacology 105 (1-2), 235-240.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M., Sener, B., 2012. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. Food Chemistry 130(4), 882-888.
- Ozcelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T., 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research 160 (2), 159-164.

- Ozturk, I., Ekici, L., Yetim, H., Sagdic, O., 2010. Antioxidative, antiradical, and antimicrobial activities of extracts from Antep Pistachio hulls. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 5 (2), 163-167.
- Özdemir, A., Sıdal, U., 2013. Streptomyces sp. Mc10 Suşunun Alfa Amilaz Üretim Kabiliyetinin Belirlenmesi. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 9(1), 39-46.
- Pala, M., Yıldız, M., Açkurt, F., Löker, M., 1994. Türkiye’de üretilen antepfıstığı çeşitlerinin bileşimi. *Gıda* 19(6), 405-409.
- Paterniti, I., Impellizzeri, D., Cordaro, M., Siracusa, R., Bisignano, C., Gugliandolo, E., Carughi, A., Esposito, E., Mandalari, G., Cuzzocrea, S., 2017. The anti-inflammatory and antioxidant potential of pistachios (*Pistacia vera* L.) in vitro and in vivo. *Nutrients* 9 (8), Article Number: 915.
- Prince, M., “The Number of People with Dementia is Rising Quickly”, *World Alzheimer’s Day Bulletin*, 21 September 1997.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chemical Reviews* 87, 955-79.
- Rajendiran, A., Natarajan, E., Subramanian, P., 2008. Control of *Aeromonas hydrophila* infection in spotted snakehead, *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a medicinal plant. *Journal of the World Aquaculture Society* 39(3), 375-383.
- Rauf, A., Patel, S., Uddin, G., Siddiqui, B.S., Ahmad, B., Muhammad, N., Mabkhot, Y.N., Ben H, T., 2017. Phytochemical, ethnomedicinal uses and pharmacological profile of genus *Pistacia*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 86, 393-404.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M., 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis* 13, 79-86.
- Saeed, A., Shah, M.S., Larik, F.A., Khan, S.U., Channar, P.A., Floerke, U., Iqbal, J., 2017. Synthesis, computational studies and biological evaluation of new 1-acetyl-3-aryl thiourea derivatives as potent cholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* 26(8), 1635-1646.
- Saitta, M., Giuffrida, D., La Torre, G.L., Potorti, A.G., Dugo, G., 2009. Characterisation of alkylphenols in pistachio (*Pistacia vera* L.) kernels. *Food Chemistry* 117 (3), 451-455.

- Seifaddinipour, M., Farghadani, R., Namvar, F., Mohamad, J., Kadir, H.A., 2018. Cytotoxic effects and anti-angiogenesis potential of pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls against MCF-7 human breast cancer cells. *Molecules* 23 (1), Article Number: 110.
- Sehitoglu, M.H., Han, H., Kalin, P., Gulcin, I., Ozkan, A., Aboul-Enein, H.Y., 2015. Pistachio (*Pistacia vera* L.) gum: a potent inhibitor of reactive oxygen species. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 30 (2), 264-269.
- Sharifi, M.S., Hazell, S.L., 2012. Isolation, analysis and antimicrobial activity of the acidic fractions of mastic, Kurdica, Mutica and Cabolica gums from genus *Pistacia*. *Global Journal of Health Science* 4(1), 217-228.
- Shokraii, E.H., Esen, A., 1988. Composition, solubility and electrophoretic patterns of protein isolated from Kerman pistachio nuts (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 425-429.
- Shoog, I., Nilsson, L., Palmertz, B., 2014. A population based study of dementia in 85 years-old. *The New England Journal of Medicine* 328, 153-158.
- Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Faizi, S., 1985. Studies in the chemical-constituents of *Azadirachta indica* Part II: Isolation and structure of the new triterpenoid azadirachtol. *Planta Medica* 51 (6), 478-480.
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L., 2010. Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (4), 168-180.
- Smeriglio, A., Denaro, M., Barreca, D., Calderaro, A., Bisignano, C., Ginestra, G., Bellocco, E., Trombetta, D., 2017. In vitro Evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. variety Bronte hull. *International Journal of Molecular Sciences* 18(6), Article Number: 1212, DOI: 10.3390/ijms18061212.
- Sonmezdag, A.S., Kelebek, H., Selli, S., 2018. Pistachio oil (*Pistacia vera* L. cv. Uzun): Characterization of key odorants in a representative aromatic extract by GC-MS-oflactometry and phenolic profile by LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry* 240, 24-31.

- Sonmezdag, A.S., Kelebek, H., Selli, S., 2019. Effect of hulling methods and roasting treatment on phenolic compounds and physicochemical properties of cultivars 'Ohadi' and 'Uzun' pistachios (*Pistacia vera* L.). *Food Chemistry* 272, 418-426.
- Sunguroğlu, K., 2014. *Biyokimya*. Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara.
- Taghizadeh, S. F., Rezaee, R., Davarynejad, G., Karimi, G., Nemati, S.H., Asili, J., 2018. Phenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia vera* var. Sarakhs hull and kernel extracts: the influence of different solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12 (3), 2138-2144.
- Tanker, M., Tanker, N., 1990. *Farmakognozi. II. Cilt.* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:65, Ankara.
- Tanker, M., Sakar, M.K., 1991. *Fitokimyasal Analizler: Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları No.67, Ankara.
- Tayar, M., Haşıl Korkmaz, N., Özkeleş, H.E., 2011. *Beslenme İlkeleri*. Dora Yayınları, 3. Baskı. S: 368.
- Tekin, H., Arpacı, S., Atlı, H.S., Açar, I., Karadağ, S., Yükçeken, Y., Yaman, A., 2001. Antepfıstığı yetiştiriciliği. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 13, 3-11.
- Tokusoglu, O., 2011. The oxidative stability, lipid profiles and total phenolics of almonds (*Prunus amygdalus* L.) and pistachios (*Pistacia vera* L.). *Acta Horticulturae* 912, 781-789.
- Tokuşoğlu, Ö., 2007. *Yeşil Altın: Antepfıstığı: Teknolojisi, Kimyası ve Kalite Kontrolü*, Sönmez Ofset Matbaacılık, Nisan, 1. Baskı, S: 86.
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., Saija, A., 2010. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie* 92 (9), 1115-1122.
- Topcu, G., Ay, M., Bilici, A., sarıkurkcu, C., Ozturk, M., Ulubelen, A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 103(3), 816-822.
- Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergentanis, T.N., Protopapa, E., Tsaknis, J., 2007. Chios mastic gum modulate serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 43-49.

- Tsokou, A., Georgopoulou, K., Melliou, E., Magiatis, P., Tsitsa, E., 2007. Composition and enantiomeric analysis of the essential oil of the fruits and the leaves of *Pistacia vera* from Greece. *Molecules* 12 (6), 1233-1239.
- Turkoglu, S., Celik, S., Keser, S., Turkoglu, I., Yilmaz, O., 2017. The effect of *Pistacia terebinthus* extract on lipid peroxidation, glutathione, protein, and some enzyme activities in tissues of rats undergoing oxidative stress. *Turkish Journal of Zoology* 41(1), 82-88.
- Türkoğlu, V., Güloğlu, Ö.F., “Koyun Karaciğerinden Asetil Kolin Esterazın Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetiği”., XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, Kars, 2004. .
- Tyman, J.H.P., 1979. Non-isoprenoid long chain phenols. *Chemical Society Reviews* 8, 499-499.
- Uddin, G., Rauf, A., AL-Othman, A.M., Collina, C., Arfan, M., Ali, G., Khan, I., 2012. Pistagremic acid, a glucosidase inhibitor from *Pistacia integerrima*. *Fitoterapia* 83, 1648-1652.
- Vuorinen, A., Seibert, J., Papageorgiou, V.P., Rollinger, J.M., Odermatt, A., Schuster, D., Assimopoulou, A.N., 2015. *Pistacia lentiscus* oleoresin: Virtual screening and identification of masticadienonic and isomasticadienonic acids as inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Planta Medica* 81(6), 525-532.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. *Plant Drug Analyses. A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd edition., Springer Verlag Brooklyn New York. 384 p.
- Xu, Z.H., Qin, G.W., Xu, R.S., 2000. An isopimarane diterpene from *Euphorbia ebracteolata* Hayata). *Journal of Asian Natural Products Research* 2(4), 257-261.
- Yalpani, M., Tyman, J.H.P., 1983. The phenolic acids of *Pistacia vera*. *Phytochemistry* 22(10), 2263-2266.
- Yildiz, M., Gurcan, S.T., Ozdemir, M., 1998. Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *FETT-Lipid* 100 (3), 84-86.
- Yu, S., Wang, X., Zhang, T., Stressler, T., Fischer, L., Jiang, B., Mu, W., 2015. Identification of a novel di-D-fructofuranose 1,2':2,3' dianhydride (DFA III) hydrolysis enzyme from *Arthrobacter aurescens* SK8.001. *Plos One* 10(11), Article Number: e0142640.

- Yun, J. W., Kim, D. H., Kim , B. W., Song, S., K., 1997. Comparison of sugar compositions between inulo- and fructo-oligosaccharides produced by different enzyme forms. *Biotechnology Letters* 19(6), 553-556.
- Zahoor, M., Zafar, R., Rahman, N.U., 2018. Isolation and identification of phenolic antioxidants from *Pistacia integerrima* gall and their anticholine esterase activities. *Heliyon* 4 (12), Article Number: e01007.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Lawali YABO DAMBAGI

Doğum Yeri: Niamey (NİJER)

Doğum Tarihi: 08.03.1991

Madeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, Fransızca , Türkçe

E posta: dambagi91@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Niamey CES AEROPORT Lisesi 2011

Lisans: Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2017,
Gaziantep

Yüksek Lisans: Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim
Dalı, Kilis, 2019.