

**Kateşol-*O*-Metiltransferaz (KOMT) Enzim Aktivitesinin
Bitkilerden Elde Edilen Bazı Alkaloidler ve Fenollerle
Engellenmesi**

Proje No: 107M307

Doç. Dr. Oğuz BAYRAKTAR

Dilek YALÇIN

ARALIK 2009

İZMİR

TEŞEKKÜR

Bu sayfada adı geçen insanlara birkaç cümle ile teşekkür etmek kesinlikle onların benim için ne kadar değerli olduğunu göstermekte kafi değildir. Dolayısıyla bu cümleleri yeterli görmeyenlerden şimdiden özür dilerim.

Öncelikle Lisans eğitimimde tanıştığım ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca bana her açıdan, hem bilimsel hem de manevi açıdan destek olan değerli hocam Doç. Dr. Oğuz Bayraktar'a çok teşekkür ederim.

Yine lisans eğitimim süresinde tanıştığım, benden bilgisini ve tecrübesini hiç bir zaman eksik etmeyen çok değerli araştırma görevlisi Evren Altıok'a ağabeyliği için sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, araştırma görevlileri Ali Emrah Çetin, Dilek Demirbüker Kavak, Zelal Polat, Gözde Genç, Diren Kaçar ve Güler Narin'e yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Başta Dane Rusçuklu olmak üzere Kimya Mühendisliği Bölümü'nde görevli olan bütün teknisyen arkadaşlarıma teknik destek ve malzeme tedarigi konularındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen ve birlikte birçok şey paylaştığım arkadaşlarıma hayatımda oldukları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemdeki en büyük emeğe sahip olan başta sevgili anneme, babama, abime ve bütün yakınlarıma sonsuz sabırları, anlayışları ve destekleri için minnettarlığımı sunarım.

Lisans yıllarımdan bu yana en iyi dostum olan Dağistan Derya Tuncalı'ya (müstakbel eşim) sabırtaşım, en büyük destekçim ve güç kaynağım olduğu ve hayatım boyunca bana kazandıracığı mutluluk için sonsuz teşekkür ederim.

Herşeyden öte, bu projeyi maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkürlerimi sunarım.

ÖNSÖZ

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından finansal olarak desteklenen 107M307 no'lu projede esas olarak Parkinson Hastalığı'na neden olduğu bilinen yüksek KOMT enzimi aktivitesinin, antioksidan, antimikrobiyal ve antikarsinojenik özelliklere sahip olan zeytin yaprağı polifenoller ve üzerlik tohumu alkaloitleri ile inhibe edilebilme potansiyelleri araştırılmıştır.

Toplam 18 adet polifenolik ve alkaloit standartları, özütleri ve fraksiyonlarının kullanıldığı inhibisyon çalışması sonucunda, üzerlik tohumu alkaloitleri arasında harmin ve harmalin alkaloitleri için en yüksek inhibisyon etkisi görülmüştür. Yapısal olarak da benzerlik gösteren bu iki bileşiğin, KOMT enzim aktivitesini karışık tip inhibisyon mekanizması ile engellediği belirlenmiştir. İnhibisyon performansı en yüksek olan üzerlik tohumu fraksiyonu, harmin fraksiyonunun inhibisyon sabitleri (K_i ve αK_i) sırasıyla 0.15 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.28 ± 0.06 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Zeytin yaprağı özütünün oleuropeince zengin fraksiyonu ise oleuropein standardı, ham özüt ve rutine göre daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Fraksiyonlama sonucunda polifenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca, laden, menengiç ve sakız yapraklarından elde edilen özütlerin yüksek inhibisyon kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiş bundan dolayı fraksiyonlama yapılması gereken bitki türleri olarak belirlenmiştir.

Doğal inhibitörler ile elde edilen sonuçlar, bilinen en iyi sentetik KOMT inhibitörünün performansı ile kıyaslanmış olup inhibitörlerin *in vivo* çalışmalarda kullanılabilir potansiyelleri oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışma sonucunda alkaloit ve polifenolik türevi bileşiklerin ve özütlerin inhibisyon sabiti verileri literatüre kazandırılmış ve doğal KOMT inhibitörü geliştirebilmek amacıyla yapılan çalışmalara kaynak oluşturma imkanı bulunmuştur.

ÖZET

KATEŞOL-O-METİLTRANSFERAZ (KOMT) ENZİM AKTİVİTESİNİN BİTKİLERDEN ELDE EDİLEN BAZI ALKALOİTLER VE FENOLLERLE ENGELLENMESİ

Bu çalışmada, üzerlik tohumu alkaloitleri ve zeytin yaprağı polifenollerinin KOMT tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunu engelleyebilme potansiyelleri araştırılmıştır. Özellikle, ekstraksiyon ve fraksiyonlama işlemleri ile saflıkları arttırılmaya çalışılmış harmin ve harmalin alkaloitlerinin ve oleuropein ve rutin polifenollerinin KOMT enzim inhibisyonu performansları, bu bileşiklerin standartları ve bilinen en iyi KOMT inhibitörü olan 3,5-dinitrokateşol ile kıyaslanmıştır.

Bitki özütlerinin elde edilmesi ve fraksiyonlama işlemleri sırasında verimliliğe etki eden bir çok parametre YPSK analizlerine göre optimize edilmiştir. KOMT inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere elde edilmiş özüt ve fraksiyonların karakterizasyonu da yine YPSK analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

KOMT enzim aktivitesi spektrofotometrik ve florometrik metotlar ile tayin edilmiş ve hassasiyeti daha yüksek ve ekonomik bulunan florometrik metot ile inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu metotta metil verici ve metil alıcı substrat olarak kullanılan SAM ve Eskuletin için inhibitörsüz ortamdaki K_m değerleri sırasıyla $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ve $6.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Toplam 18 adet standart, özüt ve fraksiyonun kullanıldığı inhibisyon çalışması sonucunda, üzerlik tohumu alkaloitleri arasından harmin ve harmalin alkaloitleri için en yüksek inhibisyon etkisi görülmüştür. Yapısal olarak da benzerlik gösteren bu iki bileşiğin, KOMT enzim aktivitesini karışık tip inhibisyon mekanizması ile engellediği belirlenmiştir. Üzerlik tohumundan fraksiyonlanan ve inhibisyon performansı en yüksek olan harmin fraksiyonunun kompetitiflik ve nonkompetitiflik derecelerine ait inhibisyon sabitleri (K_i ve αK_i) sırasıyla $0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ ve $1.28 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

Zeytin yaprağı polifenollerinin standartları ile yapılan çalışmada rutin KOMT enzimini inhibe etme özelliği görülürken oleuropeinin daha az etkili olduğu görülmüştür. Zeytin yaprağı özütünün oleuropeince zengin fraksiyonu ise oleuropein standardı, ham özüt ve rutine göre daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Fraksiyonlama sonucunda polifenolik bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin arttığı görülmüştür.

Hayıt, laden, menengiç ve sakız bitkilerinin yapraklarından elde edilen polifenolik özütlerinin de yine KOMT enzimini inhibe etme potansiyelleri olduğu görülmüştür. Bunlar arasında, laden, menengiç ve sakız özütleri yüksek inhibisyon kapasitesine sahip olduklarından dolayı fraksiyonlama yapılması gereken bitki türleri olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, üzerlik tohumu alkaloitleri ve saflığı arttırılmış zeytin yaprağı fraksiyonları umut vaad eden doğal KOMT inhibitörleri oldukları tespit edilmiş ve inhibisyon kinetiği sabitleri literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca, bu alkaloit ve polifenolik bazlı doğal bileşiklerin bilinen antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin de olması nedeniyle çok fonksiyonlu bileşikler olarak bir çok sektörde kullanılabilecekleri anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: KOMT, İnhibisyon, Alkaloitler, Fenoller, Parkinson Hastalığı

ABSTRACT

INHIBITION OF CATECHOL-*O*-METHYLTRANSFERASE (COMT) ENZYME ACTIVITY BY SOME PLANT-DERIVED ALKALOIDS AND PHENOLS

In this study, inhibition potentials of harmal seed alkaloids and olive leaf polyphenols were investigated on COMT catalyzed methylation reaction. Especially, inhibition performances of harmine and harmaline alkaloids and oleuropein and rutin polyphenols whose purities were attempted to be increased by extraction and fractionation were compared with standards of these compounds and the best known COMT inhibitor, 3,5-dinitrocatechol.

During the obtaining of plant extracts and their fractions, many parameters affecting the efficiency were optimized according to HPLC analyses. Characterization of the extracts and fractions obtained in order to use in COMT inhibition experiments were performed also with HPLC analyses.

COMT enzyme activity was determined by spectrophotometric and fluorometric methods and inhibition experiments were performed with fluorometric method of which the sensitivity was found higher. In this method, K_m values for SAM and aesculetin used as methyl donor and acceptor substrates were found as $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ and $6.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$, respectively. As a result of the inhibition study in which a totally 18 standards, extracts and fractions were used, the highest inhibitory effect is observed for harmine and harmaline rich fractions among harmal seed alkaloids. It has been determined that the COMT inhibition mechanisms of these two compounds which are also structurally similar, were the same and were in mixed type manner. Inhibition constants indicating degree of competitiveness and noncompetitiveness (K_i and αK_i) of the harmine fraction which has the highest inhibition performance were calculated as $0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ and $1.28 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$, respectively.

In the studies performed with standards of olive leaf polyphenols, while it was observed that rutin has ability of inhibiting COMT enzyme, oleuropein was found less effective. However, oleuropein rich fraction of olive leaf extract showed higher inhibitory effect than crude extract and rutin. As a result of the fractioning, it was revealed that biological activities of polyphenolic compounds increased.

Moreover, it was also observed that polyphenolic extracts obtained from vitex, cistus, terebinth and mastic leaves have potentials of inhibiting the activity of COMT enzyme. Since, vitex, terebinth and mastic extracts among these showed high inhibition capacity, it was thought that fractionation should be performed for these plant species.

As a more general conclusion, it was revealed that harmal seed alkaloids and olive leaf fractions with high purity are promising natural COMT inhibitors. By performing this study, the kinetic inhibition constants of extracts, their fractions and standards could be determined and they could be reported into literature. Besides, it was understood that these alkaloid and polyphenolic based natural compounds can be used as multifunctional compounds in many industrial and academic fields due to having antioxidant and antimicrobial features as well as COMT inhibitory activities.

Key words: COMT, Inhibition, Alkaloids, Phenols, Parkinson Disease

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1.0. GİRİŞ.....	1
2.0. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR.....	4
2.1.1. Parkinson Hastalığı.....	5
2.1.2. Parkinson Hastalığı'nın Tedavi Yöntemleri.....	6
2.1.2.1. Farmakoterapi (İlaç Tedavisi).....	7
2.1.2.2. Cerrahi Müdahale.....	9
2.1.3. Parkinson Hastalığı Tedavisi için İlaç Geliştirmede Rol Oynayan Kriterler.....	10
2.1.3.1. Kan-Beyin Bariyeri.....	10
2.1.3.2. Beyin-Omurilik (Serebrospinal) Sıvısı Bariyeri.....	11
2.1.4. KOMT Enzimi ve Parkinson Hastalığı'ndaki Rolü.....	12
2.2. KOMT İNHİBİTÖRLERİ.....	16
2.2.1. Sentetik İnhibitörler.....	17
2.2.1.1. Birinci Nesil KOMT inhibitörleri.....	17
2.2.1.2. İkinci Nesil KOMT inhibitörleri.....	17
2.2.1.3. Son Nesil – Tipik Olmayan KOMT inhibitörleri.....	20
2.2.2. Doğal İnhibitörler.....	21
2.2.2.1. Üzerlik (<i>Peganum harmala</i>) Tohumu.....	26
2.2.2.2. Zeytin (<i>Olea europaea</i>) Yaprağı.....	28

2.3. ENZİM AKTİVASYONU ve İNHİBİSYONU BELİRLEME METOTLARI.....	30
2.3.1. Spektrofotometrik Metot.....	31
2.3.2. Florometrik Metot.....	31
2.3.3. Radyokimyasal Metot.....	32
2.3.4. KOMT Enzim Aktivitesi/İnhibisyonu Testleri.....	33
2.4. ENZİM İNHİBİSYONU MEKANİZMALARI.....	37
2.4.1. Rekabet Eden İnhibitörler (Kompetitif).....	37
2.4.2. Rekabet Etmeyen İnhibitörler (Nonkompetitif).....	39
2.4.3. Rekabete Girmeyen İnhibitörler (Unkompetitif).....	41
2.4.4. Karışık Tip İnhibitörler (Nonkompetitif ve Kompetitif).....	43
2.4.5. İnhibitör Substratlar.....	45
3.0. AMAÇ.....	47
4.0. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	48
4.1. MATERYALLER.....	48
4.2. YÖNTEMLER.....	49
4.2.1. İnhibitörlerin Elde Edilmesi.....	49
4.2.1.1. Üzerlik (<i>P. harmala</i>) Tohumundan Özüt Eldesi.....	49
4.2.1.2. Zeytin (<i>O. europaea</i>) Yaprığından Özüt Eldesi.....	52
4.2.2. Özütlerin Fraksiyonlanması.....	53
4.2.2.1. Üzerlik (<i>P. harmala</i>) Tohumu Özütünün Fraksiyonlanması.....	53
4.2.2.2. Zeytin (<i>O. europaea</i>) Yaprığı Özütünün Fraksiyonlanması.....	54
4.2.3. İnhibitörlerin Karakterizasyonu.....	55
4.2.3.1. Üzerlik (<i>P. harmala</i>) Tohumu Özütünün Karakterizasyonu.....	55
4.2.3.2. Zeytin (<i>O. europaea</i>) Yaprığı Özütünün Karakterizasyonu.....	56
4.2.4. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	58

4.2.5. KOMT Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Kinetiği Belirlenmesi.....	58
4.2.5.1. Spektrofotometrik Metot ile Aktivite Tayini.....	58
4.2.5.2. Florometrik Metot ile Aktivite ve İnhibisyon Kinetiği Tayini.....	59
4.2.6. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Kinetiği Veri Analizi.....	61
5.0. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	62
5.1. İNHİBİTÖRLERİN ELDE EDİLMESİ ve KARAKTERİZASYONU.....	62
5.1.1. Üzerlik (<i>P. harmala</i>) Tohumundan Özüt Eldesi ve Karakterizasyonu.....	62
5.1.2. Zeytin (<i>O. europaea</i>) Yaprığından Özüt Eldesi ve Karakterizasyonu.....	66
5.2. ÖZÜTLERİN FRAKSİYONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU.....	67
5.2.1. Üzerlik Tohumu Özütünün Fraksiyonlanması ve Karakterizasyonu.....	67
5.2.2. Zeytin Yaprığı Özütünün Fraksiyonlanması ve Karakterizasyonu.....	70
5.3. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	74
5.4. KOMT ENZİM AKTİVİTESİ VE İNHİBİSYON KİNETİĞİ BELİRLENMESİ.....	76
5.4.1. Spektrofotometrik Metot ile Aktivite Tayini.....	76
5.4.2. Florometrik Metot ile Aktivite ve İnhibisyon Kinetiği Tayini.....	78
5.4.2.1. Florometrik Metot ile Aktivite Tayini.....	78
5.4.2.2. Florometrik Metot ile İnhibisyon Çalışması.....	83
6.0. SONUÇLAR.....	101
REFERANSLAR.....	105
EKLER	
EK-A Alkaloidlere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Örnek Hesaplama.....	116
EK-B Oleuropein ve Rutine Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Örnek Hesaplama.....	119
EK-C Skopoletine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Örnek Hesaplama.....	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2-1. Nöron ölümüne sebebiyet veren faktörler ve genel etki mekanizmaları.....	4
Şekil 2-2. Beyni oluşturan önemli kısımlar.....	5
Şekil 2-3. Parkinson hastalığı'nın evrelerine bağlı uygulanan tedavi yöntemlerinin algoritması.....	8
Şekil 2-4. KBB'de gerçekleşen muhtemel geçirgenlik çeşitleri. 1. Lipofilik transport, 2. İyon transferi, 3. Hidrofilik transport, 4. Taşıyıcı molekül ile transport, 5. Adsorpsiyon ile transport, 6. Reseptör ile transport.....	11
Şekil 2-5. Sıçandan izole edilmiş S-KOMT'un üç boyutlu şematik gösterimi.....	13
Şekil 2-6. S-KOMT'un katalitik bölgesi.....	14
Şekil 2-7. KOMT tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunun genel mekanizması.....	15
Şekil 2-8. Parkinson Hastalığı'nda etkili olan metabolik rotalar.....	16
Şekil 2-9. Bazı İkinci Nesil KOMT inhibitörleri.....	18
Şekil 2-10. Bazı Son Nesil KOMT inhibitörleri.....	20
Şekil 2-11. KOMT inhibitörü olarak kullanılan bazı polifenolikler.....	24
Şekil 2-12. Üzerlik tohumunda bulunan bazı alkaloidler.....	27
Şekil 2-13. Zeytin yaprağı içindeki major polifenollerin kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2-14. Genel reaksiyon kinetiği eğrisi.....	30
Şekil 2-15. Basit kompetitif inhibisyon.....	37
Şekil 2-16. Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 2-17. Basit nonkompetitif inhibisyon.....	40
Şekil 2-18. Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 2-19. Basit unkompetitif inhibisyon.....	42
Şekil 2-20. Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	43
Şekil 2-21. Karışık tip inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.....	44

Şekil 2-22. Substrat inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği.....	46
Şekil 4-1. Deneysel Çalışmaların Şematik Gösterimi.....	50
Şekil 5-1. Üzerlik tohumundan elde edilen özütün örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon).....	64
Şekil 5-2. Alkaloit standartlarının karışımının örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon).....	64
Şekil 5-3. Zeytin yaprağı özütünün örnek kromatogramı (1) rutin, (2) oleuropein (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon).....	66
Şekil 5-4. Üzerlik tohumu özütünün fraksiyonlama öncesine ait örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, semipreparatif kolon).....	67
Şekil 5-5. Harmin fraksiyonunun (FP 2) örnek kromatogramı (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon).....	68
Şekil 5-6. Harmalin fraksiyonunun (FP 3) örnek kromatogramı (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon).....	69
Şekil 5-7. FO 1 kodlu fraksiyonun kromatogramı.....	71
Şekil 5-8. FO 2 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) verbaskozit, (3) oleuropein...71	71
Şekil 5-9. FO 3 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) luteolin-7-glikozit, (3) verbaskozit, (4) oleuropein.....	72
Şekil 5-10. FO 4 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) luteolin-7-glikozit, (3) verbaskozit, (4) oleuropein.....	72
Şekil 5-11. FO 5 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) verbaskozit.....	73
Şekil 5-12. FO 6 kodlu fraksiyonun kromatogramı (polariteleri düşük diğer glikozit formları).....	73
Şekil 5-13. Farklı BSA konsantrasyonu için spektral tarama.....	75
Şekil 5-14. Proteinler için elde edilen kalibrasyon eğrileri.....	75
Şekil 5-15. Spektrofotometrik metot ile inhibitörsüz ortamda A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	77
Şekil 5-16. E1-ES3-SAM1 konsantrasyonlarındaki ürün oluşma kinetiği (10 saat).....	79

Şekil 5-17. E1-ES3-SAM1 konsantrasyonlarındaki ürün oluşma kinetiği (2 saat).....	80
Şekil 5-18. Reaksiyon hızının SAM'a göre değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	81
Şekil 5-19. Reaksiyon hızının 100 µM SAM konsantrasyonuna kadar değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	81
Şekil 5-20. Reaksiyon hızının ES'e göre değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	82
Şekil 5-21. Alkaloit standartları ve alkaloit içeren özüt ve fraksiyonların inhibisyon performansları.....	85
Şekil 5-22. Polifenol standartları ve polifenol içeren özüt ve fraksiyonların inhibisyon performansları.....	85
Şekil 5-23. I1 (3,5-DNK) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	86
Şekil 5-24. I2 (harmol standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	87
Şekil 5-25. I3 (harmalol standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	87
Şekil 5-26. I4 (harmin standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	88
Şekil 5-27. I5 (harmalin standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	89
Şekil 5-28. I6 (üzerlik tohumu ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	90
Şekil 5-29. I7 (üzerlik tohumu FP1 nolu fraksiyon) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	91
Şekil 5-30. I8 (üzerlik tohumu FP2 nolu fraksiyon) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	91
Şekil 5-31. I9 (üzerlik tohumu FP3 nolu fraksiyon) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	92
Şekil 5-32. I10 (oleuropein standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	93
Şekil 5-33. I11 (rutin standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	94

Şekil 5-34. I12 (zeytin yaprağı ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	95
Şekil 5-35. I13 (zeytin yaprağı FO1 nolu fraksiyon) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	95
Şekil 5-36. I14 (zeytin yaprağı FO5 nolu fraksiyon) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	96
Şekil 5-37. I15 (hayıt yaprağı ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	97
Şekil 5-38. I16 (laden yaprağı ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	98
Şekil 5-39. I17 (menengiç yaprağı ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	99
Şekil 5-40. I18 (sakız yaprağı ham özüt) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri.....	99
Şekil A1. Harmol kalibrasyon eğrisi.....	116
Şekil A2. Harmalol kalibrasyon eğrisi.....	116
Şekil A3. Harmin kalibrasyon eğrisi.....	117
Şekil A4. Harmalin kalibrasyon eğrisi.....	117
Şekil B1. Oleuropein kalibrasyon eğrisi.....	119
Şekil B2. Rutin kalibrasyon eğrisi.....	119
Şekil C1: Skopoletin kalibrasyon eğrisi.....	121

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 2-1. Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına karşı terapatik etki yaratabilme potansiyelleri araştırılmış bitki türleri.....	22
Tablo 2-2. KOMT aktivitesi/inhibisyonu testleri.....	34
Tablo 4-1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler (Alkaloit Fraksiyonlama).....	53
Tablo 4-2. YPSK elusyon programı (Alkaloit Fraksiyonlama).....	54
Tablo 4-3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler (Alkaloit Karakterizasyon).....	55
Tablo 4-4. YPSK elusyon programı (Alkaloit Karakterizasyon).....	56
Tablo 4-5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler (Polifenolik Karakterizasyon).....	57
Tablo 4-6. YPSK elusyon programı (Polifenolik Karakterizasyon).....	57
Tablo 4-7. Spektrofotometrik Metot için Reaksiyon Ortamı.....	59
Tablo 4-8. Florometrik Metot için Reaksiyon Ortamı.....	60
Tablo 5-1. Alkaloit ekstraksiyonu yöntemleri için çalışma koşulları.....	62
Tablo 5-2. Üzerlik tohumundan elde edilen alkaloit özütlerinin verimlilik analizi.....	63
Tablo 5-3. Alkaloitlerin kalibrasyon için kullanılan konsantrasyon aralıkları.....	65
Tablo 5-4. Üzerlik otu tohumundan elde edilen majör alkaloitlerin fraksiyonları için karakterizasyon sonuçları.....	69
Tablo 5-5. Zeytin yaprağı özütünün fraksiyonlarının içerikleri.....	70
Table 5-6. Zeytin yaprağı fraksiyonlarının oleuropein içerikleri.....	74
Tablo 5-7. Spektrofotometrik Metot için Reaksiyon Ortamı.....	76
Tablo 5-8. Enzim Aktivite değerleri (spektrofotometrik).....	77
Tablo 5-9. Enzim ve Substratların konsantrasyon değişimleri.....	79
Tablo 5-10. KOMT inhibitörü olarak kullanılan bazı bitki özütleri, fraksiyonlar ve bunların standartları.....	84

KISALTMALAR DİZİNİ

KOMT	Kateşol <i>O</i> -metiltransferaz
SAM	S-(5'-Adenozil)-L-metionin
L-DOPA	3-(3,4-dihidroksifenil)-L-alanin (levodopa)
AChE	Asetilkolin esteraz
MAO	Monoaminoksidaz
AADK	Aromatik aminoasit dekarboksilaz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
KBB	Kan-Beyin Bariyeri
BOS	Beyin omurilik sıvısı
S-KOMT	Eriyebilir (soluble) kateşol <i>O</i> -metiltransferaz
MB-KOMT	Beyin zarına bağlı (membrane bound) kateşol <i>O</i> -metiltransferaz
3,5-DNK	3,5-dinitrokateşol
V_{max}	Enzimatik reaksiyonların maksimum hızı
$V_{max,app}$	İnhibitör varlığında enzimatik reaksiyonların maksimum hızı
K_m	Substratın enzime olan afinitesi
$K_{m,app}$	İnhibitör varlığında substratın enzime olan afinitesi
α	Alfa (inhibisyon mekanizmasını belirleyen sabit)
K_i	İnhibisyon sabiti (kompetitif inhibisyona etki eden)
αK_i	İnhibisyon sabiti (nonkompetitif inhibisyona etki eden)
IC ₅₀	Yüzde elli inhibisyonun gerçekleştiği konsantrasyon
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
BSA	Bovin Serum Albumin
DHAP	3,4-dihidroksiasetofenon (metil alıcı substrat; spektrofotometrik metot)

ES	Eskuletin (metil alıcı substrat; florometrik metot)
SAH	S-(Adenozil)-homosistein
3H4MAP	<i>O</i> -metillenmiş DHAP
4H3MAP	<i>O</i> -metillenmiş DHAP'ın izoformu
FP1	Üzerlik tohumunun harmol ve harmalolce zengin fraksiyonu
FP2	Üzerlik tohumunun harmince zengin fraksiyonu
FP3	Üzerlik tohumunun harmalince zengin fraksiyonu
FO1	Zeytin yaprağının oleuropeince zengin fraksiyonu (su fraksiyonu)
FO5	Zeytin yaprağının rutin ve diğer glikozitlerce zengin fraksiyonu (etanol fraksiyonu)

1.0. GİRİŞ

Kateşol *O*-metiltransferaz (KOMT) enzimi kateşol yapısındaki bileşiklerin *O*-hidroksil grubunun metillenmesini, S-(5'-Adenozil)-L-metionin'i (SAM) metil kaynağı olarak kullanmak suretiyle katalizler (MANNİSTÖ, 1999). Memelilerde, KOMT beyin ve periferel dokularda bulunmaktadır. Sıçan ve insanlarda en yüksek KOMT aktivitesi karaciğer, böbrek ve mide-bağırsak yolunda bulunmaktadır (GULDBERG, 1975). KOMT enzimi bir çok dokuda çözünmüş formda fakat insan beyinde baskın olarak beyin zarına (membrana) bağlanmış formda bulunur. KOMT enziminin birincil fonksiyonu biyolojik aktiviteye sahip olan hücre içi ve dışı kateşolleri deaktive etmektir.

Kateşolestrojenler, kateşolamin nörotransmitterler (dopamin, norepinefrin, ve epinefrin) ve 3-(3,4-dihidroksifenil)-L-alanin) L-DOPA (levodopa), KOMT enziminin önemli substratlarıdır. Bunlar arasından dopamin ve levodopa, birbirleri ile ilişkisi olan ve en önemli substratlar olarak bilinmektedir. Sempatik sinir terminallerinde ve adrenal bezlerinde tirosinin hidroksilasyonu ile sentezlenen L-DOPA, bir piridoksal fosfat enzimi olan dopa dekarboksilaz tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu 2-(3,4-dihidroksifenil)-etilamin (dopamin)'e dönüşmektedir.

Beyindeki dopaminerjik nöronların hasar görmesi dopamin eksikliğine yol açarak, Parkinson hastalığının belirtilerinin başlamasına neden olmaktadır. İlaç kullanımı sırasında levodopa'nın dopa dekarboksilaz inhibitörleri ile birlikte alınması suretiyle, levodopa'nın periferel metabolizması azaltılarak beyindeki dopamin seviyesinin artması sağlanabilmektedir (BONİFATİ, 1999; DİNGEMANSE, 1997). Ayrıca, hastalığın tedavisinde levodopa ve dopa dekarboksilaz inhibitörleri ile birlikte KOMT inhibitörlerinin de kullanımı oldukça önemli rol oynamaktadır (SİNGH, 2007; LERNER, 2003).

1960'lardan beri geliştirilmeye çalışılan KOMT inhibitörleri arasından günümüzde de klinik olarak kullanılmakta olan entakapon ve tolkapon gibi inhibitörler başlıca sentetik nitrokateşol bileşikleri olarak bilinmektedir. İnsan karaciğeri bu tip kateşol içeren bileşiklerin metabolize edildiği en önemli bölgelerden biri olduğu gibi, en yüksek KOMT aktivitesinin de görüldüğü organlardan biridir (VIERIA-COELHO, 1996; GULDBERG, 1975). Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmakta olan nitrokateşolik inhibitörlerin sitotoksik etkileri olduğu

bilindiğinden dolayı toksik olmayan doğal inhibitörlerin bulunup geliştirilmesi son derece önemlidir.

Ayrıca, Parkinson hastalarında beynin *substantia nigra* (siyah madde) olarak bilinen bölgesinde lipit peroksidasyonu artması sonucu serbest radikal oluşumunun da arttığı bilinmektedir (SUDHA, 2003). Oluşan serbest radikallerin nöron dejenerasyonunu arttırması ile hastalığın ilerleme gösterdiği yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu nedenle, antioksidan özelliğe sahip doğal bileşiklerin KOMT inhibitörü olarak kullanılmasına verilen önem giderek artmaktadır (CHEN, 2006; ESPOSITO, 2002; CHIUUEH, 2000).

Geleneksel tıbbın vazgeçilmezleri olan fitokimyasalların vücutta kolay metabolize olabildikleri ve toksik etkilerinin az olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra, antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör özelliklere de sahip oldukları bilinen fitokimyasalların, modern tıpta da kullanımı artış göstermektedir. Ayrıca, günümüzde doğal bileşiklerin nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (CHEN, 2005; PERRY, 1999). Literatürde, Parkinson hastalığının tedavisi için, özellikle KOMT inhibitörü olarak kullanılmak üzere alkaloidler ve fenollerce zengin bir çok bitki türü ile çalışılmış ve elde edilen sonuçlar ortaya konmuştur.

Alkaloidler biyolojik olarak sentezlenen ve birçok farmakolojik aktiviteye sahip oldukları bilinen bileşiklerdir. Çok eski zamanlardan beri ilaç olarak kullanıldıkları gibi kök boyası eldesinde de kullanılmışlardır. Yapısal olarak nitrojen içeren bu bileşiklerin doğada pek çok çeşidi bulunmaktadır. Tropan, ergot ve indol alkaloidleri en çok bilinen ve daha çok narkotik uygulamalarda kullanılan alkaloid sınıflarındandır. İndol alkaloidlerinin alt sınıflarından β -karbolin türevi alkaloidlerce zengin olan Üzerlik (*Peganum harmala*) yabancı kimyongiller (*zygophyllaceae*) familyasına dahil bir bitkidir. Üzerliğin, eski Yunan ve Hindistan'da tıbbi amaçla kullanıldığı bilindiği gibi bugün modern tıpta da solucan düşürücü, narkotik amaçla ve merkezi sinir sistemi uyarıcısı olarak kullanılmaktadır. Üzerliğin tohumlarında harmalin, harmin, harmalol ve harmol adlı alkaloidler ve eterik yağ bulunmaktadır. Üzerlik ile yapılan çalışmalar sonucu içeriğindeki alkaloidlerin, Parkinson hastalığına neden olan metabolik yollarda önemli rolleri olan asetilkolin esterase (AChE) ve monoaminoksidaz (MAO) enzimlerini inhibe ederek asetilkolin ve dopaminin parçalanmasını önlediği belirtilmiştir (THEODORE, 1999). Ayrıca tohumlarından kırmızı renkli bir boya maddesi elde edilebilmektedir (WEB_1, 2003).

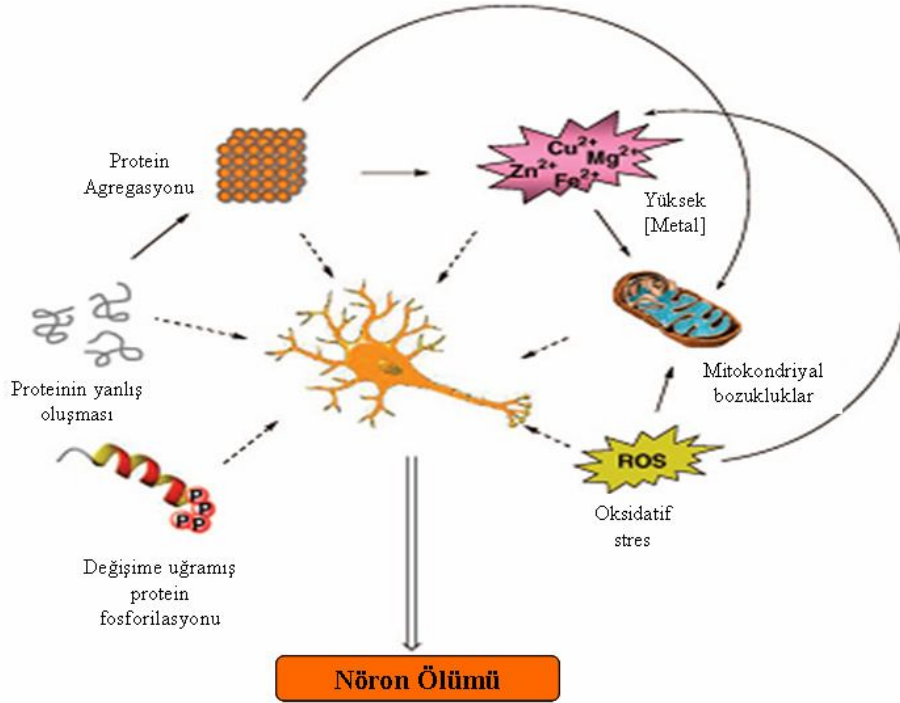
Fitokimyasalların bir diğer önemli sınıfını ise polifenoller oluşturmaktadır. Alkaloidler gibi polifenollerin de ilaç, kimya ve gıda uygulamaları eski çağlara dayanmakta ve büyük çoğunluğu bitkilerden elde edilmektedir. Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı'nda baskın olarak bulunan oleuropein ve rutin gibi maddeler ve apigenin glikozitler, flavanoitler olarak bilinen en geniş polifenol sınıfına ait bileşiklerdir. Araştırmalar sonucu antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip oldukları ortaya konan bu maddeler, kalp hastalıkları, kanser, şeker hastalığı, yaşlanma ve katarakt gibi birçok hastalığa neden olan serbest radikalleri etkisizleştirmekte yada serbest radikallerin etkilerini geciktirebilmektedirler (GARCÍA, 2000). Bu özelliklerinden dolayı, Parkinson hastalığının nedenlerinden olan nöron dejenerasyonu sonucu ortaya çıkan serbest radikalleri engelleyebilecekleri ve özellikle oleuropein ve rutinin KOMT enzimini inhibe edebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada amaçlanan antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinojenik ve antivirütik özelliklere sahip olan oleuropein ve rutin gibi zeytin yaprağı polifenollerinin ve üzerlik tohumlarında bulunan harmalin, harmin, harmalol ve harmol adlı alkaloidlerin KOMT inhibitörü olarak etkilerinin incelenmesidir. Bu amaca uygun olarak, çalışmada kullanılacak bu bitkilerden elde edilen özütler fraksiyonlarına ayrılmaya çalışılacak olup her bir fraksiyonun da KOMT inhibitörü olarak performansları test edilecektir. Doğal inhibitörler ile elde edilen sonuçlar, günümüzde ticari olarak kullanılan ve bazı olumsuz sağlık etkileri olduğu bilinen sentetik KOMT inhibitörlerinin performansları ile kıyaslanacaktır.

2.0. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Tıp bilimi kullanılarak henüz tam olarak aydınlatılmamış konu başlıklarından olan nörodejeneratif hastalıklar özellikle Merkezi Sinir Sistemi (MSS) nöronlarının hasar görmesi ve kronik aksaklıklar göstermesi sonucu ortaya çıkan bir çok olumsuz durumu kapsamaktadır. Mitokondriyal bozukluklar, protein agregasyonu, yüksek metal konsantrasyonu ve oksidatif stres nöronların ölümünün ve hasar görmelerinin en önemli sebepleri olarak bilinmektedirler (CAVALLİ, 2008).



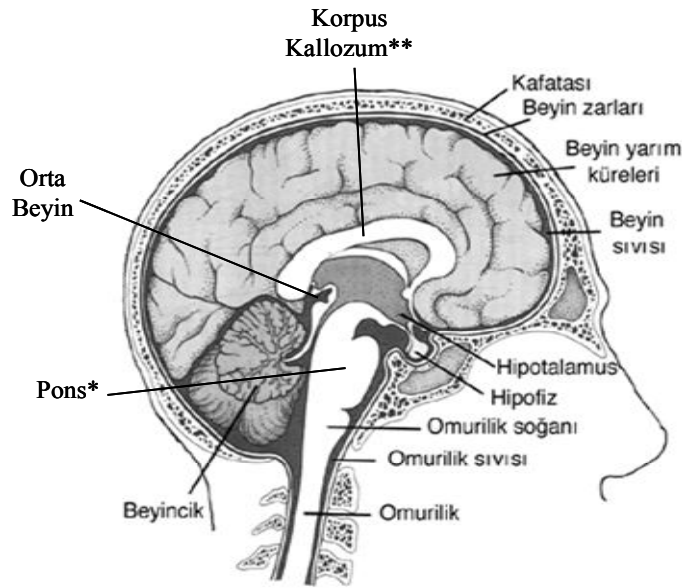
Şekil 2-1. Nöron ölümüne sebebiyet veren faktörler ve genel etki mekanizmaları (CAVALLİ, 2008).

İnsanlarda, halen etiyolojik olarak araştırılmakta olan multipl skleroz (MS), Alexander hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), delidana hastalığı (BSE), Creutzfeldt-Jakob hastalığı, şizofreni, epilepsi ve uyuklama gibi bir çok nörolojik bozukluk görülmektedir. Araştırmalar sonucu, daha çok geç yaşlarda yakalanma riskinin arttığı ortaya konmuş olan nörodejeneratif hastalıklar arasında Alzheimer ve Parkinson hastalıkları en önemli nörolojik hastalıklar olarak bilinmektedir (WEB_2). Alzheimer hastalığı esas itibari ile idrak kaybı ve

bunama olarak karakterize edilen bir nörolojik bozukluktur. Genellikle 65 yaş ve üstünde bunama ile başlayan ve ilerleme gösteren Alzheimer hastalığının erken dönemlerinde idrak ve hafıza kaybı gibi semptomlar görülürken ileri evrelerinde konuşma bozukluğu, depresyon ve ruhsal dengesizlik semptomları da baskın olarak görülmektedir (HOUGHTON, 2005).

2.1.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı ilk kez 1817'de İngiliz cerrah Sir James Parkinson tarafından kasların kontrolsüz titremesi sendromu olarak açıklanmıştır (ZHU, 2004). Patolojik açıdan MSS nöronlarının kronik ve artan bir bozukluğu olarak karakterize edilen Parkinson hastalığının etiyolojisi tam olarak belirlenememekle beraber orta beyin çekirdek bölgesinde bulunan siyah maddedeki (*substantia nigra pars compacta* (SNpc)) dopaminerjik nöronların dejenerasyonu sonucu görüldüğü bilinmektedir.



Şekil 2-2. Beyni oluşturan önemli kısımlar.

*Pons: Beyincik önünde MSS sinir hücreleri ve liflerinden oluşan kitle.

**Korpus Kallozum: Genellikle parezi ve psişik bozuklukları kontrol eden merkez

Ayrıca, Lewy cisimcikleri olarak bilinen sitoplazmada birikmiş nöronların varlığı ve orta beyinde reaktif oksijen cisimciklerinin artışı sonucu artan oksidatif stres, dopamin üreten nöronların ölümüne neden olduğundan dolayı hastalığın nedenleri arasında gösterilmektedirler (HOUGHTON, 2005). Bu nedenlere bağlı görülen;

- Beyindeki dopamin seviyesindeki azalma,
- Nörotransmitterler arasındaki denge bozukluğu (Asetilkolin, Norepinefrin, Serotonin, Gamma-aminobütrik asit (GABA))
- Serbest radikal oluşumu gibi durumlar hastalığın diğer önemli semptomları olarak bilinmektedir.

Dünyada pek çok insanda, daha çok yaşlılarda yaygın olarak görülen Parkinson hastalığı, az sayıda da olsa 40 yaş ve altındaki insanlarda da görülmektedir (HOUGHTON, 2005). Kol ve bacaklarda görülen titremelerde artış, kas hareketsizliği (diskinezi), hareketlerde yavaşlama (bradikinezi) ve denge kaybı ile beraber Alzheimer hastalığında da görülen idrak ve hafıza kaybı durumları Parkinson hastalığının klinik semptomları olarak bilinmektedir (ZHU, 2004; DİNGEMANSE, 1997). Hastalığın ileri safhalarında depresyon, konuşma bozukluğu, zihin karışıklığı, uyku düzensizliği, unutkanlık ve kabızlık gibi durumlar ikincil semptomlar olarak görülmektedir (POLYMEROPOULOS, 1996).

2.1.2. Parkinson Hastalığı'nın Tedavi Yöntemleri

1950'lerden sonrasına kadar, hafıza kaybı ve titremeler daha öncede bahsedildiği gibi çoğu nörodejeneratif hastalıkların en çok görülen semptomları olarak bilinmekte ve insanoğlu bu hastalıklara karşı çoğu zaman aynı ortak yöntemleri ve ilaçları kullanmaktaydı. Bugün halen tam olarak tedavileri mümkün olmayan nörodejeneratif hastalıklar kendi aralarında kısmen belirgin olarak ayrıştırılabilmiş ve eski bilgilerden de yararlanılarak her birisi için ayrı ayrı ilaç geliştirilmiştir (HOUGHTON, 2005). Parkinson hastalığına karşı geliştirilen bir çok ilaç ise kendi içinde sınıflara ayrılmış ve bunlar hastalığın basamaklarına göre gerek tek başına gerekse diğerleri ile birarada klinik olarak kullanım olanağı bulmuştur. Ayrıca, hastalığın ileri safhalarında cerrahi müdahale ile çözüm bulunabildiği bilinmektedir.

2.1.2.1. Farmakoterapi (İlaç Tedavisi)

Parkinson hastalığına neden olan bir çok semptomun kontrol altına alınmasını sağlayan ve ticari olarak kullanım olanağı bulunmuş ilaçlar sınıfını;

- Dopamin agonistler (dopamin etkisi gösteren benzer maddeler),
- Levodopa/dopa dekarboksilaz inhibitörleri (benserazid, karbidopa),
- Antikolinergik ajanlar^a,
- Amantadin^b,
- Monoamin oksidaz-B (MAO-B)^c inhibitörleri (selegilin),
- Kateşol *O*-metiltransferaz (KOMT) inhibitörleri

oluşturmaktadır (NADEAU, 1997). Bu ilaçların, Parkinson hastalığının ana nedeni olarak gösterilen dopamin eksikliğini muadil olarak karşılayamamalarına rağmen beyindeki dopamin ve asetilkolin seviyesindeki azalmayı engelleyebildikleri ve dengeleyebildikleri bilinmektedir. Bu özellikleri ile Parkinson hastalığına karşı klinik olarak kullanılan ilaçların, hastalığı tam olarak tedavi etmediği ancak hastalarda görülen semptomları azaltarak iyileşme sağladığı bilinmektedir (NADEAU, 1997).

Farmakoterapi olarak uygulanacak ilaçların seçiminde hastalığın hangi safhasında olduğunu belirlemek en önemli kriterdir. Herhangi bir ilaç seçimi yapmadan önce hastanın Parkinsonizm derecesi belirlenmelidir. Hastalığın evrelerine göre uygulanabilecek tedavi yöntemlerinin algoritması Şekil 2-3'te verilmektedir.

^a Antikolinergik ajanlar: Asetilkolinin etkilerine karşı koyan ve kolinerjik lifler tarafından donatılmış salgı bezi ve kas elementlerini paralize eden madde ya da etken (atropin, skopolamin)

^b Amantadin: Dopaminerjik, adrenerjik ve az miktarda antikolinergik etkisi olduğu ve sinirlilik, uykusuzluk ve anksiyete gibi durumların yanında Parkinsonizm semptomlarını da azalttığı bilinen bir bileşik (ilaç).

^c Monoamin oksidaz-B: Monoamin oksidaz enzimi mono aminlerin oksidasyon reaksiyonunu katalizler. Dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi amin nörotransmitterlerini parçalar. Mitokondri dış zarında bulunan bu enzim monoamin oksidaz A geni tarafından sentezlenir. MAO-A ve MAO-B olmak üzere ikiye ayrılır. Her ikisi de nöronlarda ve astroglialarda bulunur. Merkezi sinir sistemi dışında, MAO-A ayrıca karaciğer, sindirim takımı ve plazentada bulunur. MAO-B ise en çok kan pulcuklarında (plateletlerde) bulunur.



Şekil 2-3. Parkinson hastalığı'nın evrelerine bağlı uygulanan tedavi yöntemlerinin algoritması

2.1.2.2. Cerrahi Müdahale

Parkinson hastalığı tedavisinin başlıca ilaçlarından olan L-dopa geliştirilmeden önce, hastalara ilk aşamada bir çok cerrahi operasyon uygulanmakta idi. Şekil 2-3'te verilen algoritmadan da anlaşılacağı gibi günümüzde, Parkinson hastalarına uygulanan ilaç tedavisi hastalığın semptomlarını yatıştırmadığı dereceye gelindiğinde cerrahi müdahaleye ihtiyaç duyulmaktadır. Cerrahi müdahale yöntemlerinin ana amacı, beynin talamus^a ve globus pallidus^b olarak bilinen bölgelerindeki sinir bağlantılarını koparmaktır (LOZANO, 1998).

- Stereotaksik teknik: İlk kez 1950'de, L-dopa henüz geliştirilmeden önce uygulanmıştır. Bu teknik nöroşirurji ve nöroradyolojide, kafatasında açılan bir delikten sokulan bir elektrot ile, üç boyutlu olarak beynin derin bölgelerinin radyografik ve topografik incelenmesine yönelik kullanılmaktadır (SİNGH, 2007).
- Palidotomi: İlk kez 1940'larda uygulanan bu teknik halen Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan bir cerrahi yöntem olarak bilinmektedir (LOZANO, 1998). Palidotomi uygulamasında yine kafatasından bir delik açılıp içine ısıtılmış bir tel sokularak globus pallidus bölgesi yakılmaktadır. Bir çok risk barındıran bu işlem sayesinde dopamin devresinin talamus ile olan ilişkisi kesilerek hastalığın semptomları hafifletilmektedir. Palidotomi işleminden sonra hastalar ilaçlarını aynı dozda almaya devam etmektedirler. (WEB_3; WEB_4; SİNGH, 2007).
- Talamotomi: Palidotomi kadar risk taşıyan bir yöntem olan talamotomi işlemi ilk kez 1950'lerde uygulanmıştır. Uygulama esnasında, aşırı soğuk bir metal çubuk ile talamus çekirdeğinde oluşan lezyonlar temizlenmekte ve bu sayede hastaların titremeleri azaltılmaktadır (LOZANO, 1998).
- Beyin Uyarma: 1997'de uygulanmaya başlanan bu yöntemde beynin talamus çekirdeğindeki belli bölgelere elektrotlar yerleştirilerek uyarılmaktadır (SİNGH, 2007).

^aTalamus: Beynin iç merkezinde bulunan, koku duyusu hariç her duyuyu kontrol eden ve bilgilerin diğer kontrol merkezlerine iletilmesinden sorumlu olan merkez.

^b Globus Pallidus: Talamusun dışında ve üstünde yer alan, hareket, duygu ve duyuların iletiminden sorumluları sınırları içeren önemli ganglion (sinir düğümleri)'lerden biri.

- Transplantasyon (Organ nakli): Organ nakli işleminde, hastalıklı hücreler yerine hastanın kendi böbrek üstü bezlerinin medulasından alınan hücreler eklenmektedir (WEB_5; SINGH, 2007).

Parkinson hastalığına karşı günümüzde de uygulanan ilaç tedavisi ve cerrahi müdahaleleri içeren yöntemlerin ağırlığı ve şiddeti araştırmacılar için hala sıcak bir gündem yaratmaktadır. Bu açıdan, hastalığın patolojisi, etiyolojisi, sentetik ve doğal tedavi yöntemleri geniş kapsamlı olarak araştırılmaya devam edilmektedir.

2.1.3. Parkinson Hastalığı Tedavisi için İlaç Geliştirmede Rol Oynayan Kriterler

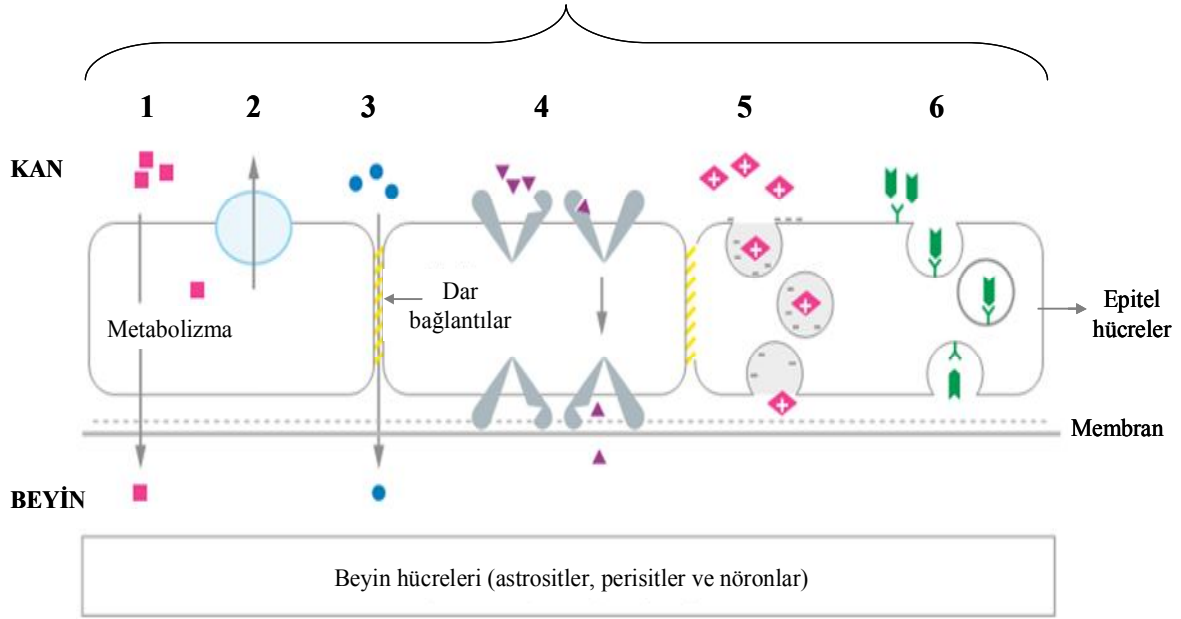
Nörodejeneratif hastalıkların çoğunda olduğu gibi Parkinson hastalığının tedavisinde de ilaç olarak kullanılan maddelerin beynin gerekli bölgelere iletiminin zor olması karşılaşılan en önemli problemlerdendir. Dolayısıyla, ilaç bulma ve geliştirme esnasında beynin doğal yapısında bulunan ve kimyasal maddelerin geçişlerini sağlayan bazı bölgelerin yapısal özellikleri ve fonksiyonları araştırılmaktadır.

2.1.3.1. Kan-Beyin Bariyeri

Kan-Beyin Bariyeri (KBB) epitel hücrelerden oluşan çok özel bir bariyer sistemidir. Bunlar dışında, yapısında perisit, astrosit ve nöronal hücreler de barındırmaktadır (DE BOER, 2007). Birbirine yapışık segmentler halindeki epitel hücreleri, molekül geçişine kısmen imkan verdiğinden dolayı bariyere en fazla seçicilik kazandıran bölümdür. Moleküllerin, DNA'nın ve enzimlerin beyne geçişlerinden sorumlu olan KBB'nin en önemli hayati fonksiyonu beynin stabilitesini korumak ve beyin hücrelerini kandan ayırmaktır (DE BOER, 2007; SUMIO, 2004). Ayrıca, KBB'nin nörolojik hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılabilecek ajanları geçirebilme ve dolayısıyla beyne iletebilme fonksiyonu bulunmaktadır.

Beyindeki seviyesinin azalması Parkinson hastalığının ana nedenlerinden olan dopaminin KBB'den geçemeyen bir nörotransmitter olmasına rağmen dopaminin öncü maddesi olarak bilinen L-dopa KBB'den geçebilmektedir (DİNGEMANSE, 1997). Ancak, dopamin gibi çoğu terapatik molekül ve genlerin istenilen miktarlarda KBB'den geçişi sağlanamadığı için bu bariyer, ilaç geliştirme aşamasında göz önünde bulundurulması gereken bir kriterdir. Şekil 2-4'te KBB'de gerçekleşen muhtemel transport çeşitleri bilinen difüzyon mekanizmaları ile açıklanmaktadır (DE BOER, 2007).

Kan-Beyin Bariyeri'ndeki Transport Çeşitleri



Şekil 2-4. KBB'de gerçekleşen muhtemel geçirgenlik çeşitleri.

1. Lipofilik transport, 2. İyon transferi, 3. Hidrofilik transport, 4. Taşıyıcı molekül ile transport, 5. Adsorpsiyon ile transport, 6. Reseptör ile transport

2.1.3.2. Beyin-Omurilik (Serebrospinal) Sıvısı Bariyeri

Beyin zarlarından biri olan subaraknoid aralık ve omurilik kanalı içindeki sıvıya beyin omurilik sıvısı (BOS) denmektedir. BOS çoğunlukla, beyinde bulunan küçük boşlukların (ventriküllerin) duvarlarındaki belirli bölgelerde genişlemiş kılcacık damar yumakları (koroid plexus) içinde oluşur. Dinamik bir sıvı olan BOS, beyindeki toplardamarlar tarafından emilerek kan akımına karışır. Koroid plexus'ta oluşan bu sıvı, ilaç metabolizmasında ve transferinde olduğu kadar hücre yenilenmesinde ve nöronların iletişimde büyük rol oynamaktadır (DE BOER, 2007; ZHENG, 2004). Ayrıca, BOS Koroid plexus'ta bulunan faz I-II ve III enzimlerinin de aktivasyonlarını korumalarına yardımcı olmaktadır (DE BOER, 2007).

Bölüm 2.1.4'te detaylı olarak irdelenen ve önemli faz I-III enzimleri arasından olan KOMT'un aktivasyonu ve bu enzime bağlı metabolik olayların düzenlenmesi de BOS tarafından kontrol edilmektedir (ZHENG, 2004).

2.1.4. KOMT Enzimi ve Parkinson Hastalığı'ndaki Rolü

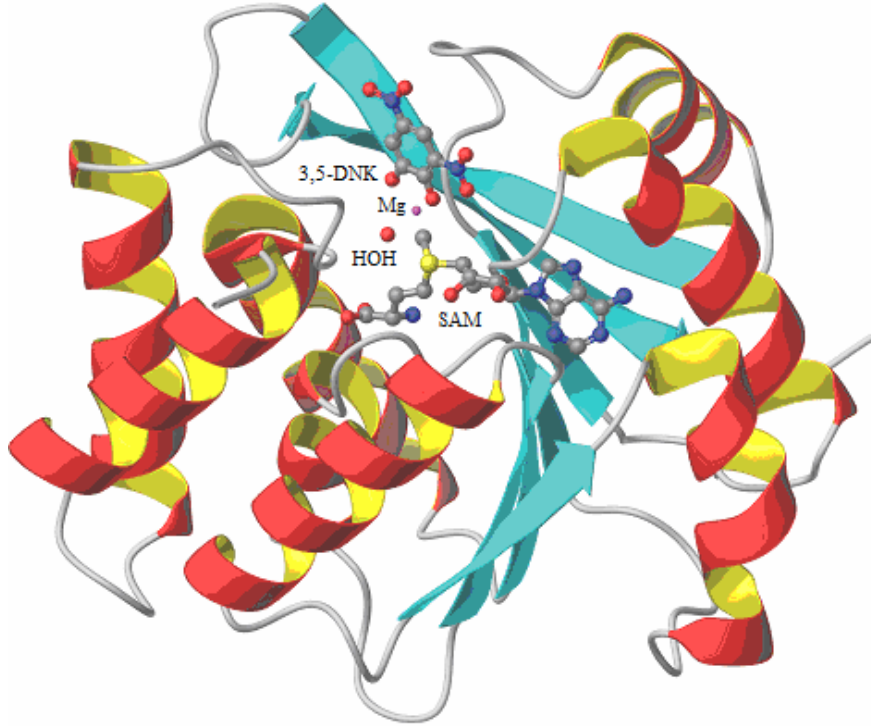
Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların, ilk olarak adsorpsiyonu ve vücut içindeki ilgili bölümlere iletimi sağlanmaktadır. Hedef bölgeye ulaşım metabolize olan ilaçlar, boşaltım sistemi kanalları ile vücut dışına atılmaktadır (LAUTALA, 2000). İlaçların, metabolik transformasyonu bir çok enzimatik reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Metabolik reaksiyonlarda rol oynayan enzimler faz I-II ve III enzimleri olarak bilinmektedir. Sitokrom P-450 ve MAO gibi faz I enzimleri yardımıyla yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz reaksiyonları gerçekleşerek ilaçların gerekli fonksiyonel gruplara bağlanabilecek formları elde edilmektedir (DE BOER, 2007; LAUTALA, 2000). Başlıca glükuronozil, glutatyon, sülfö, asetil ve metiltransferazlardan oluşan faz II enzimleri, formları konjugasyona hazır hale getirilmiş ilaçların metabolize olması için gerekli reaksiyonları katalizlemektedirler (LAUTALA, 2000). Bu reaksiyonlar sonucu farmakolojik olarak aktif bileşikler oluşmaktadır. Oluşan aktif bileşiklerin ve buldukları mikroortamların stabilitesi ise sodyum-dikarboksilat, askorbik asit, organik anyon ve kation taşıyıcıları olarak bilinen faz III enzimleri ile korunmaktadır (DE BOER, 2007).

Faz II enzimlerinden olan Kateşol O-metiltransferaz (KOMT; EC 2.1.1.6), memelilerde böbrek, karaciğer ve beyinde bulunmaktadır. Aynı zamanda, gastrointestinal kanalda, kaslarda, eritrositlerde, bazı organlarda ve dokularda KOMT aktivitesi gözlenmiştir (REENİLÄ, 1999; GULDBERG, 1975). Farklı ilerleticiler (promoter) kullanılarak tek bir gen tarafından kodlanan KOMT enziminin aminoasit sayıları farklı iki değişik formu bulunmaktadır (LOTTA, 1995). Eriyebilir (soluble, S-KOMT) ve membrana bağlı (MB-KOMT) formlardaki enzimlerin aktiviteleri buldukları yerlere, cinsiyete ve yaşa göre farklılık göstermektedir (BONİFACİO, 2007; LAUTALA, 2000; GOGOS, 1998; DE SANTI, 1998).

İnsanda bulunan S-KOMT ile sıçandan izole edilen rekombinant S-KOMT'un yapısal olarak %81 oranında benzerlik gösterdiği moleküler biyologlar tarafından ortaya konmuştur (LAUTALA, 2000). Bu açıdan, *in vitro* KOMT aktivitesi belirleme çalışmalarında genellikle sıçandan izole edilmiş rekombinant S-KOMT kullanılmaktadır. 1994'te Vidgren ve arkadaşları, sıçandan izole edilmiş rekombinant S-KOMT'un aktivitesini ve metillenme reaksiyonunun moleküler mekanizmasını çözmek amacıyla enzimin substratları ve inhibitörü ile kompleks halindeki üç boyutlu yapısını ilk kez açıklamışlardır (BONİFACİO, 2007;

LAUTALA, 2000). S-KOMT'un kristal yapısı üzerinde yapılan bu incelemeye göre, enzimin merkezinde karmaşık β -plakaları ve bunları çevreleyen sekiz α -sarmalı bulunmaktadır. Karakteristik olarak DNA ve RNA metiltransferaz gibi S-adenozil-L-metionin (SAM) kullanan diğer metiltransferazlarda da bu topoloji görülmektedir. KOMT enziminin katalitik bölgesinin ise büyük protein yapısının tam ortasında ve yüzeyde yer aldığı ortaya konmuştur (BONIFACIO, 2007).

Şekil 2-5'te şematik olarak verilen enzimin katalitik bölgesinde, biri SAM'ın diğeri kateşolik substratın bağlandığı iki farklı bölüm bulunmaktadır (BONIFACIO, 2007). Metil kaynağı olan SAM, katalitik bölgede yapı içine gömülü vaziyette bulunurken kateşolik substratın bağlandığı bölüm yüzeydeki boşlukta yer almaktadır (LAUTALA, 2000).

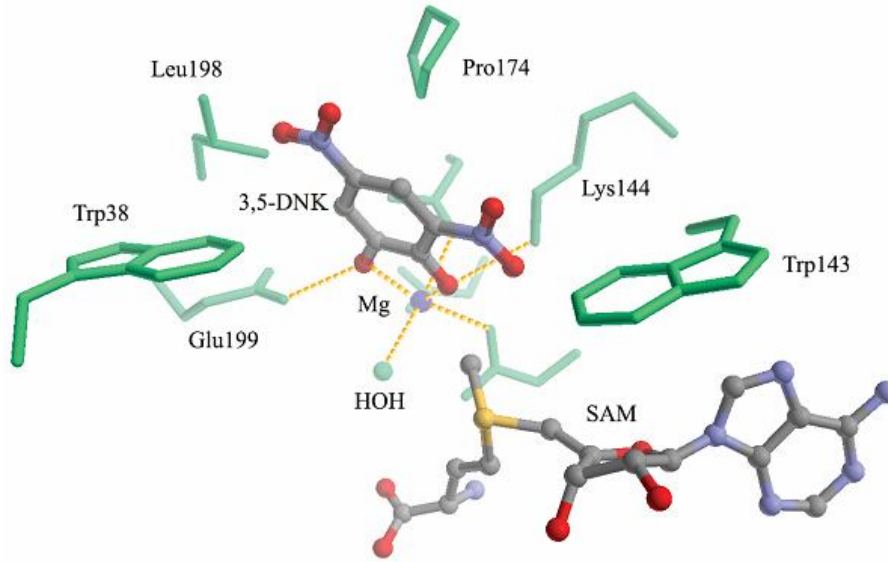


Şekil 2-5. Sığıandan izole edilmiş S-KOMT'un üç boyutlu şematik gösterimi.

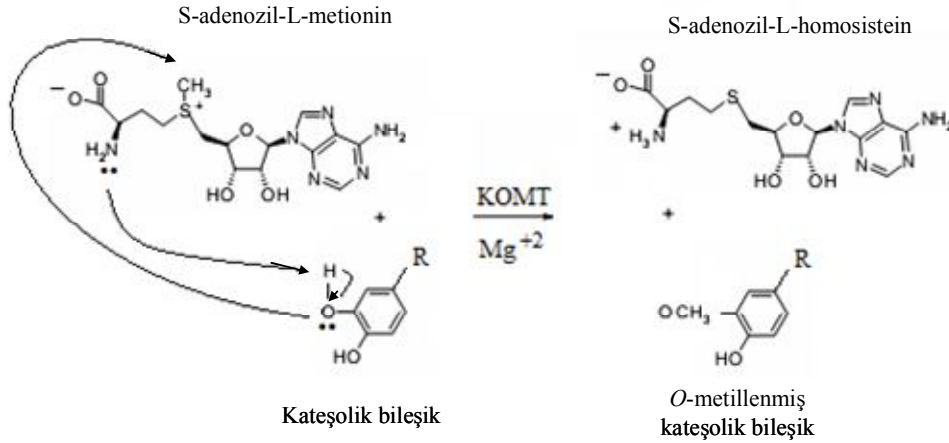
3,5-DNK: 3,5-dinitrokateşol (KOMT inhibitörü)

KOMT tarafından kofaktör olarak kullanılan Magnezyum (Mg^{+2}) iyonunun yeri, bir su molekülü, iki aspartik asit artığı (Asp141, Asp169), bir asparajin artığı (Asn170) ve kateşol molekülünde bulunan hidroksil grupları tarafından hidrofobik kuvvetler aracılığı ile koordine edilmektedir (BONIFACIO, 2007; LAUTALA, 2000). Bu sayede, enzimin büyük protein

yapısının da bozulması önlenmektedir. Yapısal olarak büyük önemi bulunan Mg^{+2} iyonu, kateşolik substratın hidroksil gruplarının pK_a değerini düşürerek daha çabuk iyonlaşmalarını sağlamaktadır (LAUTALA, 2000). İyonlaşmış hidroksillerden biri glutamik asit artığı (Glu199)'nın eksi yüklü karboksil grubu ile Şekil 2-6'da da gösterildiği gibi hidrojen bağı kurarak stabilize olur. Diğer hidroksil ise lizin artığı (Lys144)'na bir proton verip elektronu eksik olan SAM'ın metil grubunu koparmaktadır (BONİFACİO, 2007; LAUTALA, 2000). Şekil 2-7'de gösterilen ve nükleofilik değişim mekanizması (S_N2 tip) ile açıklanan bu reaksiyon, SAM'dan kopan metil grubunun kateşolik halkanın protonunu kaybetmiş hidroksil grubuna bağlanması ile tamamlanmaktadır (LAUTALA, 2000).



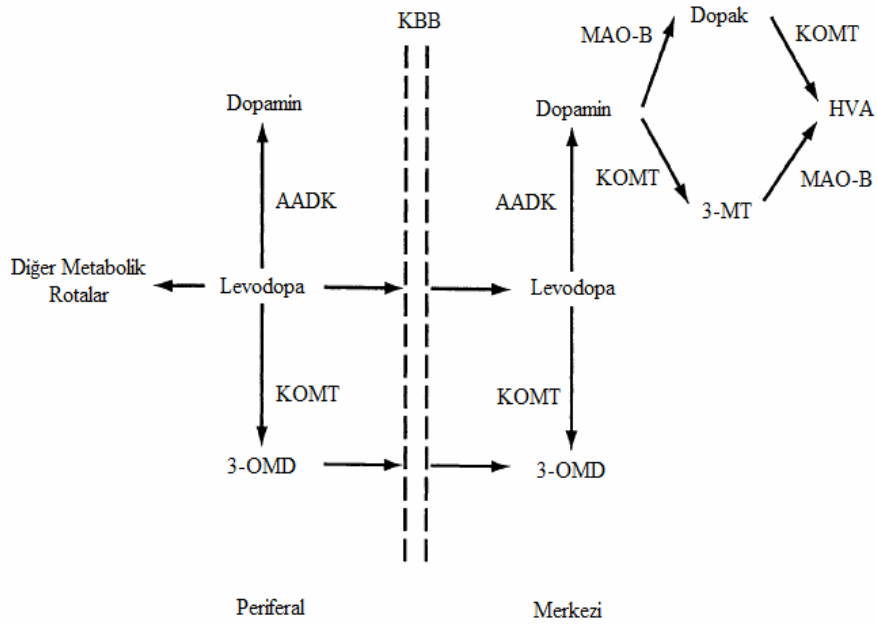
Şekil 2-6. S-KOMT'un katalitik bölgesi



Şekil 2-7. KOMET tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunun genel mekanizması

KOMET enziminin moleküler düzeydeki çalışmalarında, yukarıdaki şekillerde de gösterildiği gibi enzimin bilinen en iyi inhibitörü olan 3,5-dinitrokateşol, kateşolik bileşik olarak kullanılmaktadır. Ancak, biyolojik olarak aktif ya da ksenobiyotik endojen ve egzojen kateşolik bileşikler, fizyolojik KOMET'un substratları olup enzim tarafından *O*-metillenerek metabolize olmaktadır (BAİ, 2007; KURKELA, 2004; ERDAL, 2002; RUOTTINEN, 1998; LOTTA, 1995). KOMET enzimi tarafından metillenebilen kateşolaminler (dopamin, epinefrin, norepinefrin), kateşolestrojenler (2 ve 4-hidroksiestradiol), L-dopa (levodopa) ve askorbik asit en iyi bilinen endojen kateşolik substratlardır (CHEN, 2005; MANNİSTÖ, 1999; LOTTA, 1995). Egzojen kateşolik substratlar ise diyetlerimizde ve bazı ilaçlarda bulunan trifenoller, flavonoidler, benserazid, karbidopa ve dihidroksifenil serin gibi bileşikler olarak bilinmektedir (BAİ, 2007; CHEN, 2005; LAUTALA, 2000; MANNİSTÖ, 1999).

KOMET tarafından da kullanılan bu kateşolik bileşiklerin Parkinson hastalığı'nın tedavisinde tek başına veya diğer ilaç sınıfları ile birlikte kullanıldığı Bölüm 2.1.2.1'de verilmiştir. Buna göre, KOMET inhibitörlerinin, kateşolik bileşiklerin; özellikle kan beyin bariyerinden (KBB) geçebilen bir bileşik olan levodopanın, aromatik L-aminoasit dekarboksilaz (AADK) ve MAO-B inhibitörlerinin tedavideki rolleri Şekil 2-8'de metabolik olarak özetlenmektedir.



Şekil 2-8. Parkinson Hastalığı'nda etkili olan metabolik rotalar. 3-OMD: 3-O-metildopa, Dopak: 3,4-dihidroksifenilasetik asit, 3-MT: 3-metoksitiramin, HVA: homovanilik asit (DİNGEMANSE, 1997).

Beyindeki (merkezi) dopamin eksikliğinin Parkinson Hastalığı'nın en önemli nedenlerinden biri olduğu Bölüm 2.1.1'de detaylı olarak anlatılmıştır. Hastalığın tedavisinde AADK inhibitörü olarak kullanılan karbidopa gibi bileşikler ile birlikte KOMT inhibitörlerinin de kullanımının periferik dopamin seviyesini azalttığı ortaya konmuştur (DİNGEMANSE, 1997). Ancak, aynı tedavi yöntemi ile KBB'den geçebilen ve dopamin öncü maddesi olan levodopa seviyesinde artış sağlanmakta ve bu sayede merkezi dopamin miktarı da istenilen seviyelere çekilebilmektedir. Şekil 2-8'de, MAO-B ve KOMT enzimlerinin merkezi dopaminin transformasyonuna neden olan reaksiyonları katalizledikleri gösterilmektedir. Bu açıdan, tedavi esnasında hastalığın evrelerine göre, KOMT inhibitörlerinin yanı sıra selegilin gibi MAO-B inhibitörleri de kullanılmakta ve merkezi dopamin miktarı istenilen seviyede tutulabilmektedir (MANNİSTÖ, 1992).

2.2. KOMT İNHİBİTÖRLERİ

1950'lerin sonuna doğru saflaştırma teknikleri gelişmiş ve yapısal olarak karakterize edilebilmiş olan KOMT enzimi için inhibitör bulma ve geliştirme çalışmaları başlamıştır. KOMT inhibitörü olarak kullanılan standart maddeler ya da bunların kimyasal olarak

sentezlenmesi yolu ile elde edilen maddeler tarihsel gelişim süreçlerine göre sınıflara ayrılmaktadır.

2.2.1. Sentetik İnhibitörler

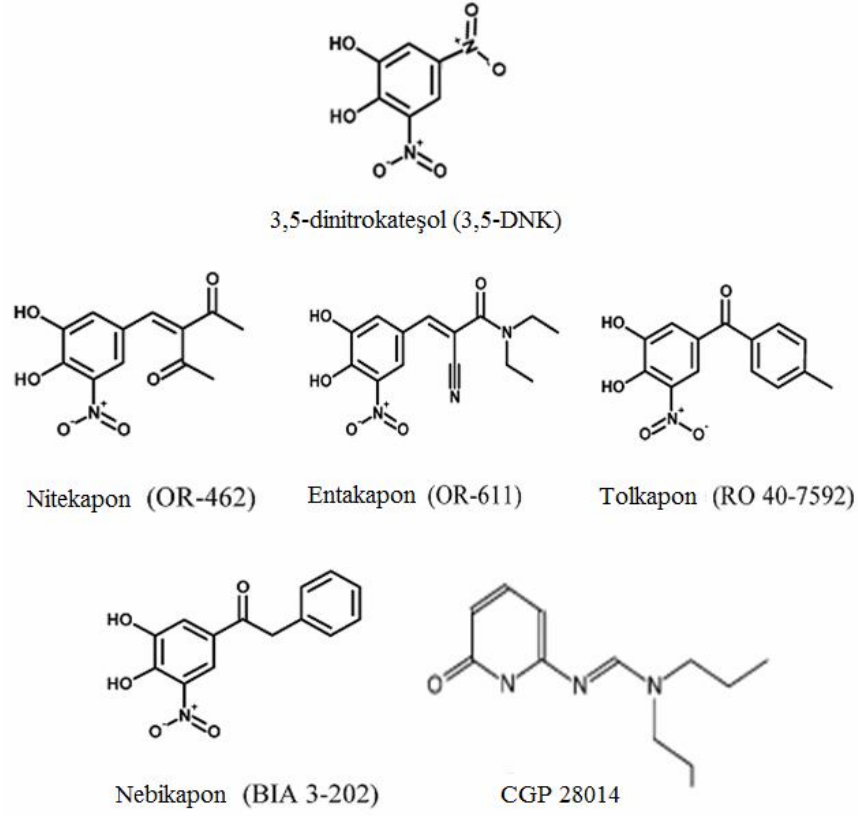
2.2.1.1. Birinci Nesil KOMT inhibitörleri

1959'da Axelrod ve LaRoche tarafından keşfedilen pirogallol, ilk potansiyel KOMT inhibitörü olarak tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda, inhibitör geliştirme çalışmalarında model inhibitör olarak kullanılmıştır (GULDBERG, 1975). Birinci nesil KOMT inhibitörleri olarak geliştirilen gallik asit, kaffeik asit, 3',4'-dihidroksi-2-metil-propiofenon (U-0521), 2-hidroksiestrojen gibi maddeler pirogallol ve kateşol türevleridir (BONİFACİO, 2007; BAİLEY, 2005). Kateşolik olmayan maddeler arasından askorbik asit, tropolon, 8-hidroksiquinolin türevleri, 3-hidroksillenmiş pironlar ve piridonlar da birinci nesil KOMT inhibitörleri olarak kullanılmışlardır (BONİFACİO, 2007; MANNİSTÖ, 1999). Ayrıca, quersetin ve rutin gibi bazı flavonoidler de yine bu sınıfa ait inhibitörler olarak bilinmektedir (BONİFACİO, 2007).

Birinci nesil KOMT inhibitörlerinin *in vitro* inhibisyon performansları yüksek olmasına rağmen hayvan testleri sonuçları başarılı sayılmamıştır. *In vivo* inhibisyon özellikleri ve seçicilikleri düşük, etki süreleri kısa ve toksik olan bu inhibitörler için klinik olarak kullanım olanağı bulunamamıştır (MANNİSTÖ, 1999; DİNGEMANSE, 1997; GULDBERG, 1975).

2.2.1.2. İkinci Nesil KOMT inhibitörleri

1980'lerin sonlarında çoğu nitrokateşolik yapıda yeni KOMT inhibitörleri sentezlendi. Şekil 2-9'da yapısal olarak gösterilen, entakapon [OR-611; (*E*)-2-siyano-*N,N*-dietil-3-(3,4-dihidroksi-5-nitrosinnamit)], nitekapon [OR-462; 3-(3,4-dihidroksi-5-nitro-benzilidin)-2,4-pentandion], tolkapon [Ro 40-7592; 4'-metil-3,4-dihidroksi-5-nitro-benzofenon], nebikapon [BIA 3-202; 1-(3,4-dihidroksi-5-nitrofenil)-2-fenil-etanon], bazı nitrobenzalhitler ve nitronoradrenalinler ikinci nesil KOMT inhibitörleri olarak geliştirilmiş nitrokateşolik maddelerdir (BONİFACİO, 2007; LOUREİRO, 2006; MANNİSTÖ, 1999). Nitrokateşolik inhibitörler dışında, bir piridin türevi olan CGP 28014 kodlu inhibitör de yine ikinci nesil KOMT inhibitörü olarak bilinmektedir (MANNİSTÖ, 1999; DİNGEMANSE, 1997).



Şekil 2-9. Bazı İkinci Nesil KOMT inhibitörleri
(BONİFACİO, 2007; PALMA, 2006; MANNİSTÖ, 1999).

Nitrokateşolik KOMT inhibitörleri, bilinen en iyi sentetik KOMT inhibitörü olan 3,5-dinitrokateşol (3,5-DNK) bileşiğinden sentezlenmektedir. Şekil 2-9’da da verildiği üzere, 3,5-DNK yapısındaki kateşol halkasının aynı hidroksil grubuna göre *orto* ve *para* pozisyonunda bulunan nitro gruplarından birinin yerine (genellikle *para* pozisyonundaki), başka bir fonksiyonel grup bağlanması ile sentezleme işlemi yapılmaktadır (BONİFACİO, 2007; LEARMONTH, 2002; BÄCKSTROM, 1989). CGP 28014 kodlu piridin türevi inhibitör ise piridona dönüştürüldükten sonra spesifik fonksiyonel grupların eklenmesi ile elde edilmektedir (WAİDMEİER, 1990).

İlk nesle göre daha potansiyel ve yüksek seçicilikteki inhibitörler arasından, nitekapon, entakapon ve tolkapon klinik kullanım olanağı bulunan ikinci nesil KOMT inhibitörleri olarak bilinmektedir (RUOTTİNEN, 1998; DİNGEMANSE, 1997). Nitrokateşolik yapıdaki bu inhibitörlerin, tersinir ve sıkı bağlanan inhibisyon mekanizmasına sahip oldukları çalışmalarda raporlanmıştır (BONİFACİO, 2007; PALMA, 2006; MANNİSTÖ, 1999). Nitekapon, entakapon ve tolkaponun, periferel KOMT aktivitesini yüzde elli oranında

azaltabildikleri konsantrasyon değerleri (IC₅₀) sırasıyla 300 nM, 150 nM ve 36 nM olarak rapor edilmiştir. Beyindeki KOMT aktivitesi için bulunan IC₅₀ değerleri ise 10 nM, 20 nM ve 0,3 nM'dir (BONİFACİO, 2007; MANNİSTÖ, 1999). Bulunan bu değerler, nitrokateşolik inhibitörlerin, ilk jenerasyon inhibitörlerinden 1000 kat daha fazla etkili olduğunu göstermiştir (BONİFACİO, 2007).

Nitekaponun ana etki mekanizması duodenum (on iki parmak bağırsağı) üzerinde olduğu tespit edilmiş ve dolayısıyla Parkinson hastalığı tedavisinde kullanımı azaltılmıştır (NİSSİNEN, 1988). Diğer iki potansiyel KOMT inhibitörleri (entakapon ve tolkapon) günümüzde MAO-B ve AADK inhibitörleri ve levodopa ile birlikte kullanılmaktadır (SİNGH, 2007; RUOTTİNEN, 1998; DİNGEMANSE, 1997).

Parkinson hastaları üzerine uygulanan tedavi yöntemlerinden elde edilen sonuçlara göre, entakaponun periferal KOMT'u inhibe etme başarısı yüksek iken, kan beyin bariyerinden geçebilen bir bileşik olan tolkaponun hem periferal hem de merkezi KOMT aktivitesini düşürdüğü raporlanmıştır. Ayrıca, tolkaponun etki süresi entakapona göre yaklaşık 2 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (BONİFACİO, 2007; MANNİSTÖ, 1999; RUOTTİNEN, 1998).

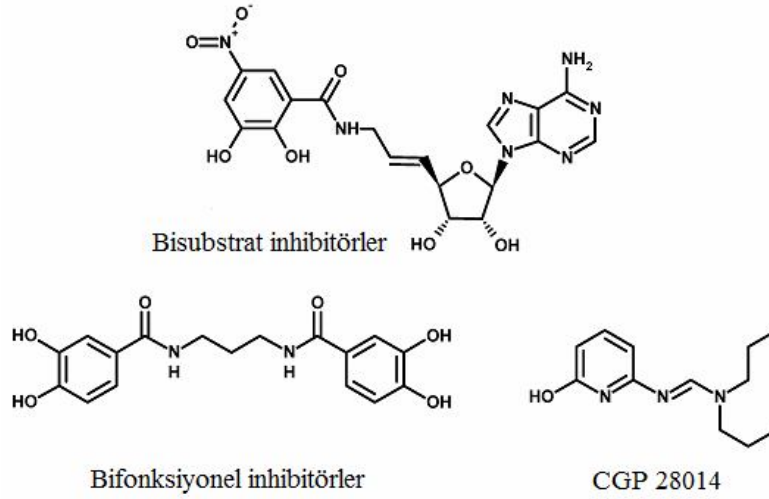
Bugüne kadar bu iki bileşik kadar etkili ve klinik olarak kullanılabilir KOMT inhibitörleri geliştirilememiş olmasına karşın, ikisi içinde yüksek dozda kullanımlarının karaciğer üzerinde bazı toksik yada karsinojenik etki yarattıkları bilinmektedir (SİNGH, 2007; BONİFACİO, 2007; MANNİSTÖ, 1999; RUOTTİNEN, 1998). Hepatoksitesisi entakapona göre daha yüksek olan tolkapon bu nedenden dolayı bazı ülkelerde (Avrupa ve Kanada) yasaklanmıştır (SİNGH, 2007; MANNİSTÖ, 1999; NİSSİNEN, 1992).

Araştırmacılar, inhibisyon başarıları yüksek ancak önemli yan etkileri gözlenen nitrokateşolik yapıdaki inhibitörler yerine kateşolik tabanlı, seçicilikleri yüksek inhibitörler geliştirme üzerine çalışmalarını sürdürmektedirler.

2.2.1.3. Son Nesil – Tipik Olmayan KOMT inhibitörleri

KOMT inhibitörleri keşfi tarihsel süreci içerisinde, ikinci nesil KOMT inhibitörü olarak tanımlanan CGP 28014 kodlu bileşik, daha sonraları tipik olmayan KOMT inhibitörleri sınıfına dahil edilmiştir. *In vitro* KOMT inhibisyonunda başarılı olamayan bu bileşik, *in vivo* çalışmalarda özellikle merkezi KOMT üzerinde büyük bir inhibisyon etkisi yarattığı bulunmuştur (MANNİSTÖ, 1999, 1992; DİNGEMANSE, 1997). Ancak bu bileşiğin etki mekanizması ve toksisite çalışmaları henüz tamamlanmamıştır.

Bu sınıfa dahil olan pek çok KOMT inhibitörü, Şekil 2-10'da gösterildiği gibi yapısal olarak nitrokateşoliklerden modifiye edilmiş ve özel bir takım özellikler kazandırılmış bileşiklerdir (BONİFACİO, 2007; PAULİNİ, 2006).



Şekil 2-10. Bazı Son Nesil KOMT inhibitörleri

Bisubstrat inhibitörler, KOMT enziminin aktif bölgesindeki SAM ve kateşol bağlanma kısımlarına uygun yapılar olarak sentezlenmekte ve böylece enzimin hastalığa neden olacak substratları ile ilişkisi kesilebileceği düşünülmektedir (PAULİNİ, 2006; LEARMONTH, 2005; LERNER, 2003). Yapısal olarak karakterize edilmiş pek çok türevi bulunan bisubstrat inhibitörleri arasından [N-{(E)-3-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-pürin-9-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidro-furan-2-il]prop-2-enil}-2,3-dihidroksi-5-nitrobenzen-1-karboksa-mit] bileşiğinin *in vitro* IC₅₀ değeri 9 nM olarak bulunmuştur (BONİFACİO, 2007; LERNER, 2003).

Bifonksiyonel inhibitörler ise yapısal olarak her birisine bir adet nitro grubu eklenmiş iki kateşol halkasının sentezlenmesi ile elde edilmektedir. Bu tip bileşiklerin *in vitro* inhibisyon potansiyellerinin, tek kateşol halkasına sahip analoglarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (BAİLEY, 2005).

Ancak, gerek bisubstrat gerekse bifonksiyonel inhibitörler için *in vivo* verileri henüz kesinleşmemiş, mekanizmaları açıklanamamış ve toksisite çalışmaları yapılmamıştır (BONİFACİO, 2007).

2.2.2. Doğal İnhibitörler

Son yıllarda, genellikle bitkilerden elde edilen bazı doğal bileşiklerin (fitokimyasalların) nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilirlikleri ile ilgili yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Bitkisel kaynaklı bileşiklerin vücutta kolay metabolize olabilmeleri ve toksik etkilerinin az olması nedeniyle nörodejeneratif hastalıklara neden olan bazı önemli metabolik reaksiyonları katalizleyen enzimleri inhibe etmek amacıyla kullanılmasının son derece önemli olduğu görülmektedir (PERRY, 1999).

Literatürde, çok geniş bir sınıf olan fitokimyasallar arasından özellikle flavonoidler, flavonoid glikozitler, kateşinler ve alkaloidler ile Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında önemli rolleri olan AChE (asetilkolin esteraz), KOMT (kateşol-O-metiltransferaz) ve MAO (monoaminoksidaz) enzimlerinin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır (CHEN, 2006; KADOWAKİ, 2005; KONG, 2004; PERRY, 1999). Ancak, araştırmalara göre, bu enzimlerden en az birini inhibe etme özelliği gösteren maddenin yeni bir ilaç olabilmesi için diğer enzimler, metabolitler ve reseptörler ile ilişkilerinin ortaya konması gerektiği bilinmektedir. Bundan dolayı, AChE, KOMT ve MAO enzimlerini inhibe etmek amacıyla kullanılmış bitkiler Tablo 2-1’de toplu halde özetlenmektedir.

Tablo 2-1. Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına karşı terapötik etki yaratabilme potansiyelleri araştırılmış bitki türleri

Familiya	Latince adı	Bilinen Adı	Etken maddeler	Metabolik Fonksiyonlar	Referans (lar)
Theaceae	<i>Camellia sinensis</i>	Çay (yeşil)	kateşin ve kateşin gallatlar	KOMT inhibisyonu	CHEN, 2005 NAGAI, 2004 ZHU, 2004
Arecaceae	<i>Areca catechu</i>	Arek cevizi, felfelek	alkaloitler (pilocarpin), tannin ve gallik asit	AChE inhibisyonu	HOUGHTON, 2005
Piperaceae	<i>Piper betel</i>	Betel biberi, kara biber	kateşin ve alkaloitler	AChE inhibisyonu	HOUGHTON, 2005
Labiataeae	<i>Salvia officinalis</i>	Adaçayı	flavonoitler ve uçucu yağlar	AChE inhibisyonu	HOUGHTON, 2005
Labiataeae	<i>Melissa officinalis</i>	Oğul otu	monoterpenler (uçucu yağlar)	AChE inhibisyonu, antidepresant	HOUGHTON, 2005 WAKE, 2000
Labiataeae	<i>Salvis Lavandulaefolia</i>	Acı elma yağı	monoterpenler (uçucu yağlar)	AChE inhibisyonu	PERRY, 2002
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	Mabet ağacı, japon eriği	flavonoitler glikozitler, terpenler	AChE ve MAO inhibisyonu	PERRY, 1999 SLOLEY, 2000
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis caapi</i>	Yage, ruh üzümü	alkaloitler (beta karbolinler)	KOMT ve MAO inhibisyonu	SCHWARZ, 2003
Cannabaceae	<i>Cannabis sativa</i>	Kenevir, kendir	kannabinoitler	Kolinerjik ve dopaminerjik aktivite artışı	JOY, 1999
Cupressaceae	<i>Biota orientalis</i>	Doğu mazısı	aktif maddeler bilinmiyor	Antikolinerjik ajan, MAO inhibisyonu	HOWES, 2003 LİN, 2003
Liliaceae	<i>Lilium brownii</i>	Zambak türü	steroit saponinler ve alkaloitler	MAO inhibisyonu	LİN, 2003
Rubiaceae	<i>Gardenia jasminoides</i>	Gardenya	glikozitler ve fenolik asitler	MAO inhibisyonu	LİN, 2003
Rubiaceae	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	Kedi tırnağı	alkaloitler (indol)	AChE ve MAO inhibisyonu	HOU, 2005 MAMEDOV, 2005
Huperziaceae	<i>Huperzia serrata</i>	Kurt pençesi	alkaloitler (huperizin A)	AChE inhibisyonu	ZHANG, 1991 CHENG, 1996, 1998

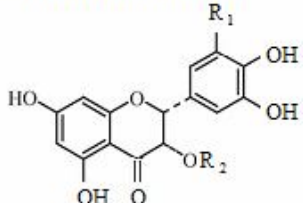
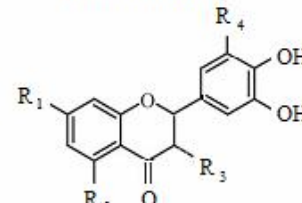
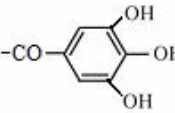
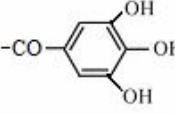
Tablo 2-1 (devamı). Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına karşı terapötik etki yaratabilme potansiyelleri araştırılmış bitki türleri

Familya	Latince adı	Bilinen Adı	Etken maddeler	Metabolik Fonksiyonlar	Referans (lar)
Labiatae	<i>Origanum majorana</i>	Mercanköşk	flavonoidler ve uçucu yağlar	AChE inhibisyonu	CHUNG, 2001
Apiaceae	<i>Bacopa monniera</i>	Gotu kola	alkaloitler ve saponinler (bakozit)	öğrenme ve idrak güçlendirici	PERRY, 1999 HOWES, 2003
Solanaceae	<i>Withania somnifera</i>	Kış kirazı	Steroidler (witanolidler)	Antikolinergik ajan	PERRY, 1999 SCHLIEBS, 1997
Guttiferae	<i>Hypericum perforatum</i>	Sarı kantaron	flavonoidler, tanninler, naftodiantronlar (hiperforin, hiperisin)	hafıza güçlendirici, antidepresant	PERRY, 1999 CHATTERJEE, 1998 MAMEDOV, 2005
Zygophyllaceae	<i>Peganum harmala</i>	üzerlik	alkaloitler (beta karbolinler)	KOMT ve MAO inhibisyonu	SCHLIEBS, 1997 WEB_1, 2003
Rosaceae	<i>Rosa Damascena</i>	Gül	uçucu yağlar	öğrenme ve hafıza güçlendirici	KÖSE, 2007
Fabaceae	<i>Mucuna pruriens</i>	Bir tür akvaryum bitkisi	aktif maddeler bilinmiyor	dopamin agonist	MANYAM, 2004
Papaveraceae	<i>Papaver somniferum</i>	Haşhaş	alkaloitler (papaverin, kodein)	AChE ve KOMT inhibisyonu	PERRY, 1999
Alliaceae	<i>Galanthus nivalis</i>	Kardelen	alkaloitler (galantamin)	AChE inhibisyonu, hafıza güçlendirici	OLİN, 2001a, 2001b

Tablo 2-1’de verilen bitki türlerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, Alzheimer ve Parkinson gibi etiyolojileri henüz tam olarak tanımlanamamış ancak dünya çapında çok sayıda insanda görülen rahatsızlıklar için tedavi olabilecek bir çok kaynak oluşturulabileceği görülmektedir. Aktif bileşen olarak, daha çok alkaloidler, terpenler, flavonoid ve flavonoid glikozitlerce zengin bitkilerin terapi niteliği taşıma olasılıkları olduğu çalışmalarda raporlanmıştır.

Ancak, Tablo 2-1’de verilen bitkilerin içerdikleri aktif bileşenlerin teker teker izole edilebilmesi zaman ve maliyet gerektirdiğinden dolayı çalışmalarda bu bitkilerin ham özütleri ve pek azının da standartları kullanılmıştır. KOMT inhibisyonunda etkili olan bitkiler arasından ise genellikle *Camellia sinensis* (yeşil çay) bitkisinden elde edilen kateşin ve kateşin türevlerince zengin özüt ve fraksiyonlarına ait standartlar ile detaylı olarak çalışılmıştır.

Çay kateşinleri ve diyetlerimizde yoğun olarak bulunan flavonoidlerin kateşol halkasına sahip bileşikler olduğu bilinmekte ve KOMT inhibisyonunda kullanılanların yapısal gösterimleri Şekil 2-11’de verilmektedir (ZHU, 2004).

Çayda bulunan fenolikler			Biyoflavonoidler				
							
ÖRNEK	R ₁	R ₂	ÖRNEK	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(-)-Epikateşin	-H	-H	Quersetin	-OH	-OH	-OH	-H
(+)-Epikateşin	-H	-H	Fisetin	-H	-OH	-OH	-H
(-)-Epigallokateşin (EGK)	-OH	-H	Luteolin	-OH	-OH	-H	-H
(-)-Epikateşin gallat (EKG)	-H		Ramnetin	-OCH ₃	-OH	-OH	-H
(-)-Epigallokateşin gallat (EGKG)	-OH		Mirisetin	-OH	-OH	-OH	-OH

Şekil 2-11. KOMT inhibitörü olarak kullanılan bazı polifenolikler

Şekil 2-11’de verilen bileşikler ile yapılan çalışmalarda, polifenolikler ile insan karaciğer hücrelerindeki kateşolestrojenlerin KOMT ile katalize edilmiş *O*-metillenme inhibisyonu için yapı-aktivite ilişkileri rapor edilmiştir (ZHU, 2008; BAİ, 2007). Galloil tip D-halkaları içeren kateşinlerin (EKG ve EGKG) güçlü bir inhibitör olduğu bilinen quersetine göre daha etkili olabilecekleri saptanmıştır (CHEN, 2005; NAGAİ, 2004; ZHU, 2001). Enzim kinetik analizlerine göre en yüksek inhibisyon etkisini gösteren EGKG ((-)-Epigallokateşin gallat)’nin metillenmesi sonucu oluşan bir metabolit olan 4’,4’’-di-*O*-metil-EGKG’nin de yeni tip bir KOMT inhibitörü olabileceği belirtilmiştir (CHEN, 2005; KADOWAKİ, 2005; WEİNREB, 2004).

Gelişen tıp alanında, özellikle kanser ve nörolojik hastalıklar için geliştirilen ilaçların çok fonksiyonlu olmaları istenen bir özellik haline gelmiştir. Parkinson hastalığı’nın da birden çok mekanizmadan etkilenen nörolojik bir bozukluk olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalar arasından oksidatif stresin artması (serbest radikallerin artışı) daha önce de bahsedildiği gibi, hastalığı tetikleyen mekanizmalardan biridir (CAVALLİ, 2008). Dolayısıyla, Parkinson hastalığı’na karşı KOMT enzimini inhibe etme potansiyeli olan bileşiklerin antioksidan aktiviteye de sahip olması istenen bir özellik haline gelmiştir.

Araştırmalara göre, Parkinson hastalarının *substantia nigra*’da glutasyon miktarı azaldığından dolayı lipid peroksidasyonunun arttığı belirlenmiştir (AKYOL, 2004). Bu madde, glutasyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen peroksil radikallerinin suya dönüşmesi reaksiyonunda koenzim olarak kullanılmaktadır (AKYOL, 2004; SİRNONİAN, 1996). Glutasyon eksikliğinde artan peroksil radikallerinin, vücudumuzdaki çoğu proteini koruma görevinden sorumlu olan alkalın fosfotaz enziminin aktivitesini de kaybetmelerine neden oldukları bilinmektedir (BERTOLİNİ, 2007). Birbiri ile yakından ilişkili bu mekanizmalar sonucu protein yapılarında bozulmalar ve oksidatif strese artış gözlenmektedir. Sonuçta, Parkinson hastalığını da tetikleyen nöron ölümleri gerçekleşmektedir (CAVALLİ, 2008).

Serbest radikallerden kaynaklanan bu sonuçlara engel olmak amacıyla KOMT enzimini inhibe etme ve yüksek derecede antioksidan özelliği olduğu bilinen quersetin bileşiği çalışmalarda kullanılmıştır. Quersetin, KOMT enziminin sentetik inhibitörleri arasından gösterilen ve günümüzde halen kullanılan bir ilaç olan tolkapon bileşiğine göre alkalın fosfotaz aktivitesi ve yapısı üzerinde daha koruyucu bulunmuştur. Ayrıca, serbest

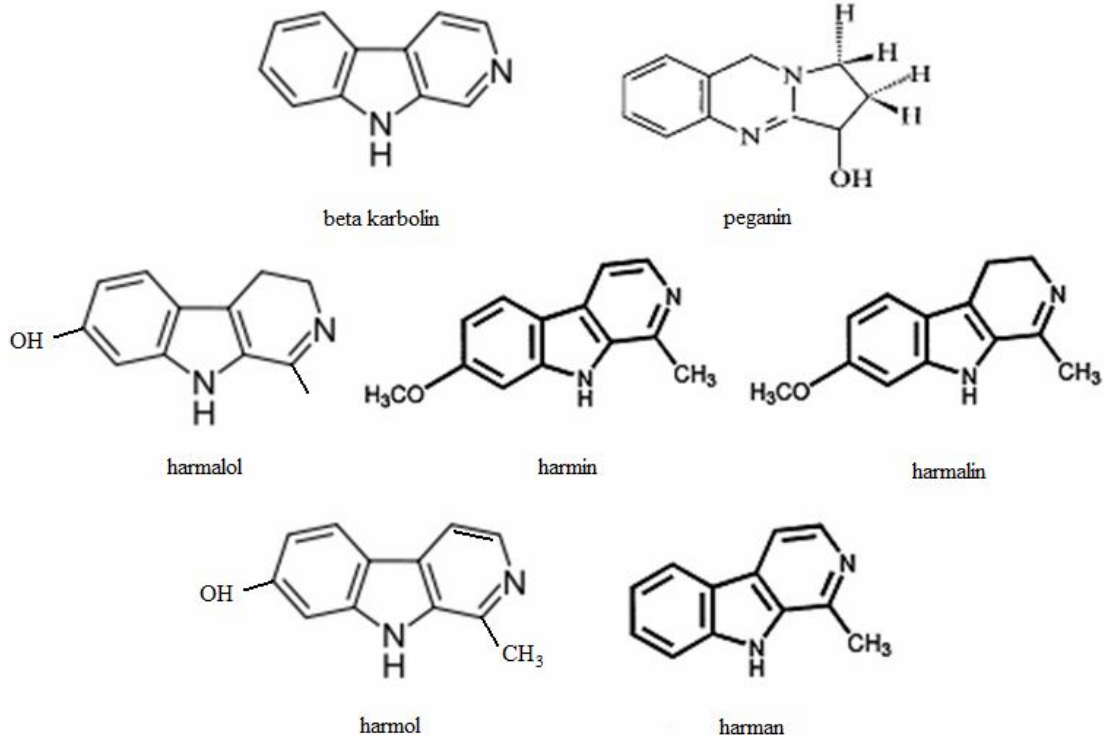
radikalleri deaktive etme potansiyeli de çoğu nitrokateşolik KOMT inhibitörlerine göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (BERTOLINI, 2007).

Antioksidanların Parkinson hastalığını önlediği ve ilerlemesini geçiktirdiği gözlenmiş olmasına karşın KOMT aktivitesinin azalması ile özellikle göğüs kanseri riskinin arttığı da bilinmektedir (CHEN, 2006; VAN DUURSEN, 2004; ESPOSITO, 2002; SUK YİN, 2002; CHİUEH, 2000). Metillenme reaksiyonuna giremeyen kateşolestrojenlerin ve kateşolaminlerin quinon formlarına dönüşmesi ile kanser riskinin arttığı çalışmalarda raporlanmıştır (VAN DUURSEN, 2004; SUK YİN, 2002).

2.2.2.1. Üzerlik (*Peganum harmala*) Tohumu

Tablo 2-1’de verilen bitkilerden biri olan üzerlik (*Peganum harmala*) yabancı kimyongiller (*zygophyllaceae*) familyasına dahil bir bitkidir. Eskiden Hindistan’da bu bitkinin tohumları ile solucan düşürücü ilaç yapılmış ve narkotik olarak kullanılmıştır. Zehirlenmelere ve yılan sokmalarına karşı panzehir yapımında da üzerlikten yararlanılmıştır. Yunanlılar ve Romalılar, üzerliğin ishale karşı mide kuvvetlendirici olarak kullanmışlardır. Bugün modern tıpta da üzerlik, solucan düşürücü ve merkezi sinir sistemi uyarıcısı olarak kullanılmaktadır (WEB_1, 2003). Ayrıca, afrodizyak etkisi olduğundan dolayı eski toplumlarda uzun süre cinsel gücü artırıcı madde olarakta kullanılmıştır (WEB_1, 2003).

Üzerlik tohumlarında %25’ten fazla oranda betakarbolin, tetrabetakarbolin, quinazolin türevleri olan bir çok alkaloid bulunmaktadır (JUMA, 2005; MOLCHANOV, 1996). Geri kalan kısımlarını, eterik yağ, flavonoidler ve glikozitler oluşturmaktadır (WEB_1, 2003; SHARAF, 1997). Tohum içeriğinin en yüksek bölümünü % 2-7 oranında değiştii bilinen betakarbolin türevi alkaloidler oluşturmaktadır. Başta harmalin ve harmin olmak üzere harmalol, harmol, harman ve peganin gibi alkaloidler *P. harmala* tohumunda en çok bulunan betakarbolin türevi alkaloidlerdir (Şekil 2-12) (GRELLA, 1998; OTT, 1996; KHAN, 1990). Ayrıca tohumlarından kırmızı renkli bir boya maddesi elde edilebilmektedir (WEB_1, 2003; KARTAL, 2003).



Şekil 2-12. Üzerlik tohumunda bulunan bazı alkaloitler (SRİVASTAVA, 2001; GRELLA, 1998; KHAN, 1990).

Harmalin ve harmin başta olmak üzere, Şekil 2-12’de yapısal olarak verilen harmala alkaloitleri ile birçok çalışma yapılmaktadır. Bu alkaloitlerin serotonin yerine geçebilme, MAO enzimini inhibe etme, merkezi sinir sistemini uyarma, bağışıklık sistemini güçlendirme gibi özellikleri olmasının yanında halusinojen ve antioksidan etkiye sahip oldukları da tespit edilmiştir (HALPERN, 2004; KARTAL, 2003).

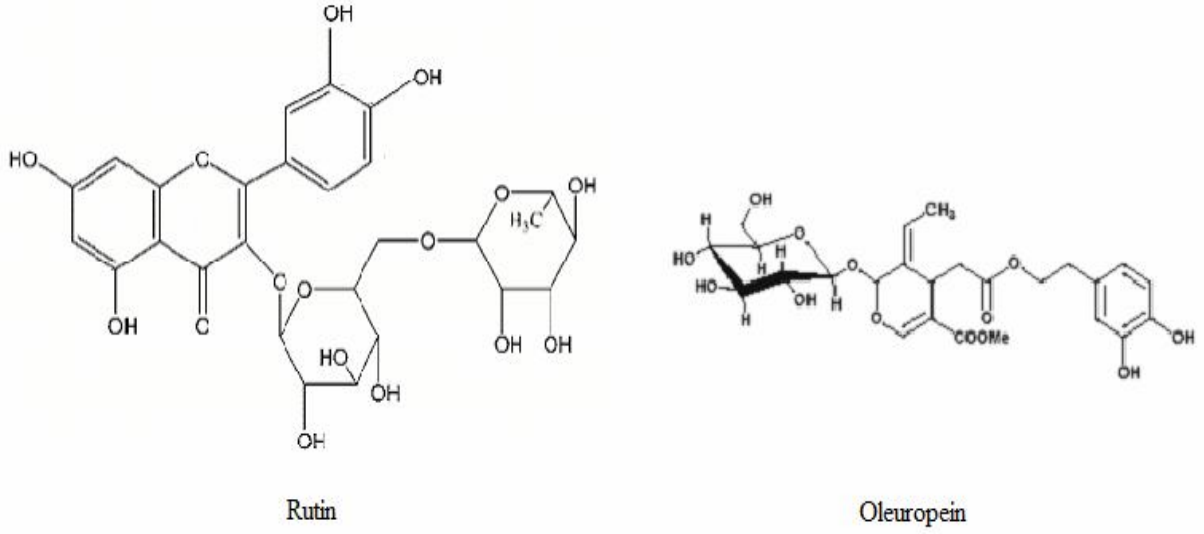
Ayrıca, peganin kan-beyin bariyerinden geçebilen bir bileşik olup beyindeki asetilkolin ve dopamin seviyesini asetilkolin esterez ve monoaminoksidaz enzimlerini inhibe ederek önleyebilmektedir (THEODORE, 1999). Alkaloit içeren çoğu bitki türü için *in vivo* ve sitotoksisite çalışmaları tamamlanmamış olmasına rağmen belladonna, harmala ve aporfin familyasından olan bitkilerden elde edilen alkaloitlerin parkinson hastalığının erken evre tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (THEODORE, 1999).

2.2.2.2. Zeytin (*Olea europaea*) Yaprağı

Zeytingiller (*oleaceae*) sınıfının en önemli üyesi olan zeytin ağacı eski zamanlardan beri Akdeniz'in ve barışın simgesi olarak bilinmektedir (BONİLLA, 2006; AL-AZZAWİE, 2006). Kutsal kitaplar da dahi adı geçen zeytin ağacının yaprakları eskiden beri yüksek ateş ve sıtmaya karşı ilaç olarak kullanılmıştır (LEE-HUANG, 2003). Ayrıca, kan basıncını düşürücü ve spazm önleyici olduğundan dolayı insanlar ve hayvanlar içinde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (GARCİA, 2000). Günümüzde, zeytin yaprağı özütünün diabet, sarılık, soğuk algınlığı, açık yaralar, bakteriyel ve virütük enfeksiyonlar ve hatta HIV virüsüne karşı terapötik başarı sağlayabildiği klinik çalışmalara ve günlük tecrübelerimize dayanarak bilinmektedir (PAGE, 2002).

Zeytin yaprağının bu kadar geniş yelpazede ve çok sayıda hastalığa karşı başarı sağlamanın nedeni olarak polifenolik içeriğinin zengin olması gösterilmektedir. Bilinen çok sayıda polifenolik sınıftan bileşikler içeren zeytin yaprağında, oleuropein ve türevleri (oleuropein ve verbaskozit); flavonlar (luteolin-7-glikozit, apigenin-7-glikozit, diosmetin-7-glikozit, luteolin ve diosmetin); flavonoller (rutin); flavan-3-oller (kateşin) ve sübstüte fenoller (tirosol, hidroksitirosol, vanillin, vanillik acid ve kaffeik asit) en çok görülen polifenolikler olarak bulunmuştur (GARCİA, 2000).

Polifenolikler arasından rutin, luteolin, hidroksitirosol ve oleuropein bileşiklerinin yüksek antioksidan kapasitesine sahip oldukları raporlanmıştır (BAYÇIN, 2007; GARCİA, 2000). Ayrıca, Şekil 2-13'te kimyasal yapıları gösterilen rutin ve oleuropein bileşikleri, ham özüt içerisinde bulunan en baskın bileşikler olup fibroin adsorpsiyonu yöntemi ile izole edilebilmektedirler (BAYÇIN, 2007; SAVOURNİN, 2001; GARCİA, 2000).



Şekil 2-13. Zeytin yaprağı içindeki major polifenollerin kimyasal yapısı

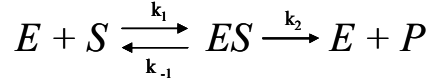
Yapılan çalışmalar oleuropeinin ve rutinin bir çok olumlu sağlık etkisi olduğunu göstermektedir. Oleuropeinin bağışıklık ve tansiyon düzenleyici, kalp ve şeker hastalıklarını iyileştirici, antibakteriyal ve antitümöral etkileri olduğu bilinmektedir. Ayrıca, oleuropein ve onun bir metaboliti olan hidroksitirosol bileşikleri yüksek antioksidan kapasitesine sahiptirler (RANALLİ, 2006; AL-AZZAWİE, 2006).

Zeytin yaprağının ikinci sırada gelen baskın polifenölü olan rutin de enfeksiyon önleyici, antitümöral, antibakteriyal, antioksidan özellikleri bulunmaktadır (GHİCA, 2005). Bunun yanında, rutin DNA bozulmasını önlediği için çoğu hastalıklara karşı kullanılabilen ve diyetlerimizdeki yoğun olarak bulunan bir bileşiktir (KURİSAWA, 2003).

Fitokimyasalların pek çok hastalık için olduğu gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde de kullanım olanakları halen araştırılmaktadır (PERRY, 1999). Bu bileşikler, vücut içindeki bir çok metabolik olayda substrat, koruyucu ajan, reaksiyon başlatıcı ya da stabilize artırıcı ajan olarak kullanılan metabolitler olduğundan dolayı ilaç geliştirme alanındaki önemleri de giderek artmaktadır (SHEU, 2004).

2.3. ENZİM AKTİVASYONU ve İNHİBİSYONU BELİRLEME METOTLARI

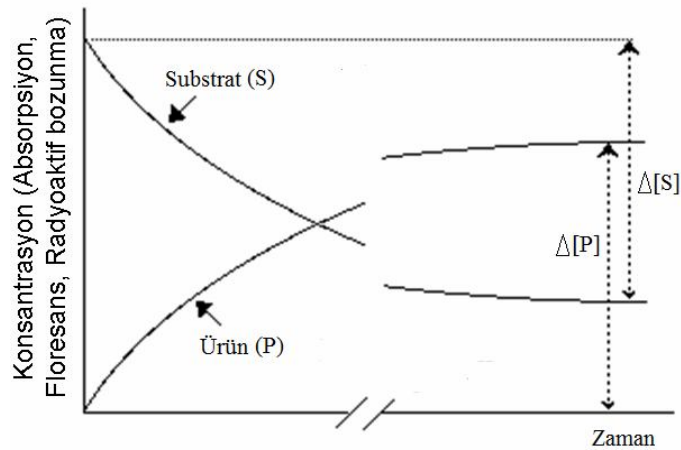
Enzimatik reaksiyonların çoğu basit Michaelis kinetiği olarak bilinen eşitlikler kullanılarak açıklanabilmektedir. Michaelis kinetiğine göre reaksiyon hızı (v); enzim (E), substrat (S), enzim-substrat kompleksi (ES), ürün (P) ve reaksiyon sabitleri (k_1 , k_{-1} ve k_2) ile matematiksel olarak Eşitlik 2-1'de verildiği gibi ilişkilendirilmiştir.



$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eşitlik 2-1})$$

Bu eşitlikte $V_{\max} = k_2[E]_0$ ve $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ 'dir.

Reaksiyonun kinetik gidişatını (Şekil 2-14) ortaya koyan enzim aktivitesi bir çok fizikokimyasal metot ile takip edilebilmektedir. Spektrofotometrik, florometrik ve radioaktif metotlar literatürde en çok kullanılan teknikler arasından gösterilmektedir (COPELAND, 2000). Ancak, yukarıdaki eşitliklerde de verildiği gibi, reaksiyon hızı substrata ve ürüne göre hesaplanabildiğinden dolayı kinetik verinin toplanacağı maddenin belirlenmesi, en uygun kinetik belirleme metotunu da seçerken önem taşımaktadır.



Şekil 2-14. Genel reaksiyon kinetiği eğrisi

2.3.1. Spektrofotometrik Metot

Spektrofotometrik metotta, molekülün bir ışık kaynağına maruz kalması sonucu elektronik diziliminde oluşan değişiklikler gözlenmektedir. Molekül tarafından absorplanan ve molekülün elektronik diziliminde gerekli miktarda değişikliğe yol açacak ışık enerjisi, elektromanyetik spektrumun ultraviyole (UV) ve görünür bölge (toplam 200-800 nm) olarak bilinen kısımlarında mevcuttur (COPELAND, 2000).

Spektrofotometrik metot ile takip edilen reaksiyonlarda, kinetik verisi toplanacak molekülün öncelikle toplam ışık kaynağı aralığına maruz kalması gerekmektedir. Böylece, molekül tarafından absorplanan maksimum ışık enerjisine ait dalga boyu (λ_{\max}) belirlenmekte ve en doğru kinetik ölçümler için bu dalga boyu kullanılmaktadır.

Maksimum dalga boyundaki kinetik ölçümler sonucunda elde edilen absorpsiyon değerleri ile çözelti içindeki maddelerin konsantrasyonları Beer Kanunu kullanılarak analitik olarak ilişkilendirilmiştir (COPELAND, 2000). Beer Kanunu'na göre;

$$A = \epsilon cl \text{ 'dir.}$$

Bu eşitlikte A (absorpsiyon değeri) birimsiz bir ölçü olup, C olarak tanımlanan konsantrasyon değeri (molarite, M), l (ışığın çözelti içinde kat ettiği yol, cm) ve ϵ (molar absorplama katsayısı, $(M.cm)^{-1}$) ile doğru orantılı olarak değiştiği gösterilmektedir (COPELAND, 2000).

2.3.2. Florometrik Metot

Florometrik metotta da spektrofotometrik metotta olduğu gibi, molekül ışık kaynağına maruz bırakılmaktadır. Ancak bu yöntemde molekül tarafından absorplanan ışık, elektron diziliminde değişime yol açmamaktadır. Elektronlar uygulanan ışık enerjisini kullanarak kısa süreliğine daha yüksek enerji seviyesine geçip daha sonra başlangıç seviyelerine geri dönmektedirler. Bu değişim sırasında kullanılan enerji reaksiyon ortamına verilmekte ve floresans miktarındaki artış yada azalışlar olarak kaydedilmektedir (COPELAND, 2000).

Florometrik metotta, kinetik verisi toplanacak molekül için 2 adet maksimum dalgaboyu belirlenmektedir. Işığın absorbe edildiği (emisyon) ve elektronlarının yüksek enerji

seviyesine çıktığı (eksitasyon) maksimum dalga boyları spektral tarama sonucunda bulunmakta ve ölçümler bu dalgaboylarında yapılmaktadır.

Konsantrasyon ile floresans değeri arasındaki ilişki, spektrofotometrik metotta kullanılan Beer's kanununa benzer olarak hesaplanabilmektedir. Florometrik hesaplama yaparken molar absorplama katsayısı yerine molar quantum sabiti (ϕ) kullanılmaktadır. Ancak, pratikte bu sabitin kullanılmasından daha çok kinetik verisi alınacak madde için kalibrasyon eğrisi elde edilmesi önerilmektedir (COPELAND, 2000).

Floresans cihazların daha hassas olması ve interferansın daha az görülmesi nedeniyle bu yöntem absorpsiyona göre daha avantajlıdır ve enzimatik reaksiyonlar için daha çok kullanılmaktadır (COPELAND, 2000).

2.3.3. Radyokimyasal Metot

Bu metotta uygulanan temel strateji substrat ile birleştirilmiş radyoizotoplar (Karbon-14, fosfor-32, trityum gibi) kullanılmasıdır. Enzimatik reaksiyon sonucunda radyoaktif bozunmaya uğrayan bu maddeler ürüne geçmektedir. Uygun ayırma teknikleri ile substrat ve ürün fraksiyonları elde edildikten sonra substratta kalan (yada üründe oluşan) radyoaktif madde miktarına göre reaksiyon hızı belirlenmektedir (COPELAND, 2000).

Radyoaktif bozunma curie (Ci) birimiyle ifade edilmektedir. 1 Ci, 1 gram radyum-226'nın tamamıyla bozunma hızına eşittir. Reaksiyonda kullanılan her bir radyoizotop için bir dakikadaki bozunma miktarı belirlendikten sonra reaksiyon hızı hesaplanabilmektedir (COPELAND, 2000).

Fiziksel olarak, radyoaktif maddenin ışığa yapması sonucu (scintillation) ortaya çıkan ışık reaksiyon ortamındaki diğer maddeler tarafından emilmektedir. Emilen ışık bir ışık sayacı tarafından kaydedilmektedir. Ayırma işlemi gerektiren bu metotta genellikle ışık sayacı bir kromatografi cihazına bağlanmaktadır. Bu metot da, floresans kadar hassas ve çok kullanılan bir metot olarak bilinmektedir.

Enzimatik reaksiyonların kinetik ölçümleri için kullanılan bu metotlardan başka polarografi, elektroforetik ayırma, kromatografik ayırma ve immünolojik reaktiflik teknikleri de kullanılmaktadır (COPELAND, 2000).

2.3.4. KOMT Enzim Aktivitesi/İnhibisyonu Testleri

Genellikle hayvanların ve insanların karaciğerinden, böbreklerinden ve beyninden izole edilerek elde edilen KOMT enziminin SAM ile birlikte bir çok kateşolik bileşiği substrat olarak kullanabildiği bilinmektedir. 1958'den beri yapılan çalışmalarda, KOMT enzim aktivitesi florometrik, spektrofotometrik ve radyoaktif metotlar ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bunlar arasından radyoaktif metot referans standarda ihtiyaç gerektirmediğinden dolayı tercih edilmektedir. Bu metotta genellikle, karbon-14 (^{14}C) ve trityum (^3H) radyoizotopları bağlanmış SAM, metil verici substrat olarak kullanılmaktadır. Ancak, *in vitro* deneylerde oluşan çok sayıdaki izomerik *O*-metillenmiş ürünlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve ilkel kromatografi teknikleri ile ayrımlarının mümkün olmaması radyoaktif metotların her zaman kullanılamayacağını göstermektedir (LAUTALA, 2000).

Son yıllarda, gelişen ayırma yöntemleri sayesinde, sıvı ve gaz kromatografi cihazlarına uyumlu birden fazla dedektör kullanılabilme imkanı bulunmuştur. Bu sayede, hassasiyetleri arttırılmış olan spektrofotometrik, florometrik ve radyoaktif metotlar KOMT aktivitesini belirlemek amacıyla bir çok çalışmada kullanılmıştır. Ancak, florometrik ve radyoaktif metotlar çok düşük konsantrasyon değerlerini ölçebilme kapasitesine sahip olduklarından dolayı daha çok tercih edilmektedirler (LAUTALA, 2000; REENİLÄ, 1999).

Tablo 2-2'de KOMT enzim aktivitesini yada inhibisyonunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar reaksiyon ortamları, substrat seçimleri ve elde edilen bazı kinetik veriler ile birlikte özetlenmektedir. Bu tablodan da görüldüğü gibi, KOMT aktivitesi basit optik yöntemlerden modern tekniklere kadar bir çok metot kullanılarak belilenebilmektedir.

Tablo 2-2. KOMT aktivitesi/inhibisyonu testleri

Referans(lar)	Test koşulları	Analiz metodu	Kateşolik Substrat	Kateşolik substrat konsantrasyonu	SAM konsantrasyonu	Enzim kaynağı (miktarı)	Ek bilgi
TSUNODA, 2002	pH=7.8, 37 C, toplam hacim=300 µl, reaksiyon zamanı=60 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 430 nm; emisyon 505 nm)	Norepinefrin (NE)	2 mM	200 µM	human S-KOMT	[NE] konsantrasyon aralığı 10-2000 µM
TSUNODA, 2002	pH=7.4, 37 C, toplam hacim=300 µl, reaksiyon zamanı=60 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 430 nm; emisyon 505 nm)	Norepinefrin (NE)	0.1 mM	200 µM	human MB-KOMT	[NE] konsantrasyon aralığı 1-100 µM
SALYAN, 2006	pH=7.5, 37 C, toplam hacim=200 µl, reaksiyon zamanı=90 dak.	LC-MS ¹	1) Dopamin 2) DOBA ²	2-128 µM (iki substrat için de)	10 µM	S-KOMT (2 µg/ml)	Km (DOBA) = 11 µM Km (Dopamin) = 42 µM
AOYAMA, 2005	pH=7.8, 37 C, toplam hacim=250 µl, reaksiyon zamanı=60 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 430 nm; emisyon 505 nm)	Norepinefrin (NE)	1.5 mM	200 µM	S-KOMT (62 µg/ml)	Km (NE) = 503 µM (pirogallol ve 3,5 dinitrokateşol ile inhibisyon)
SHEN, 2005	pH=7.8, 37 C, toplam hacim=1 ml, reaksiyon zamanı=60 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 260 nm; emisyon 400 nm)	DOBA	25 µM	100 µM	S-KOMT (0.5 mg/ml)	
LAUTALA, 1999, 2001	pH=7.4, 37 C, toplam hacim=250 µl, reaksiyon zamanı=30-60 dak.	Radioaktivite-UV dedeksiyon (260 nm) HPLC	DOBA	5-300 µM	150 µM	S-KOMT (12.5-100 µg)	İnhibisyon ve Validasyon çalışması

Tablo 2-2. (devamı) KOMT aktivitesi/inhibisyonu testleri

Referans(lar)	Test koşulları	Analiz metodu	Kateşolik Substrat	Kateşolik substrat konsantrasyonu	SAM konsantrasyonu	Enzim kaynağı (miktarı)	Ek bilgi
CHEN, 2005	pH=7.4, 37 C, toplam hacim=100 µl, reaksiyon zamanı=30 dak.	HPLC Elektrokimyasal Dedeksiyon (ECD)	1) 2-OH-E ₂ ³ 2) 4-OH-E ₂ ⁴	50 µM	60 µM	insan k.ciğeri KOMT (0.2 mg)	İnhibisyon çalışması (substrat konsantrasyonları 5-200 µM arasında değişken)
BAİLEY, 2004	pH=7.45, 37 C, toplam hacim=60 µl, reaksiyon zamanı=60 dak.	HPLC - UV dedeksiyon (370 nm)	Kateşolik Azo-boyalari	0.5-150 µM	20 mM	domuz k.ciğeri KOMT (125 U/ml)	İnhibisyon çalışması (inhibitör konsantrasyonları 0-21 µM arasında değişken)
KURKELA, 2004	pH=7.4, 37 C, toplam hacim=100 µl, reaksiyon zamanı=60 dak.	Mikroplaka okuyucu - Floresans (eksitasyon 355 nm; emisyon 460 nm)	Eskuletin	bilgi yok	10 µM	insan k.ciğeri KOMT (15 µg/ml)	İnhibisyon çalışması (6 çeşit kateşolik bileşik)
VESER, 1987	pH=7.4, 37 C, toplam hacim=500 µl, reaksiyon zamanı=30 dak.	Floresans (eksitasyon 390 nm; emisyon 465 nm)	Eskuletin	4 µM	600 µM	<i>Candida tropicalis</i> S-KOMT (20-50 µl)	[Eskuletin] = 1.2-5 µM [SAM] 460, 46 and 7.7 µM'de sabit
HİRANO, 2007	pH=7.8, 37 C, toplam hacim=200 µl, reaksiyon zamanı=30-120 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 430 nm; emisyon 505 nm)	Norepinefrin (NE)	1.5 mM	200 µM	sıçan beyni S-KOMT	sıçan beyninin değişik yerlerinden alınan KOMT için aktivite testi
HİRANO, 2007	pH=7.0, 37 C, toplam hacim=200 µl, reaksiyon zamanı=30-120 dak.	HPLC-Floresans (eksitasyon 430 nm; emisyon 505 nm)	Norepinefrin (NE)	200 µM	200 µM	sıçan beyni MB-KOMT	sıçan beyninin değişik yerlerinden alınan KOMT için aktivite testi

Tablo 2-2. (devamı) KOMT aktivitesi/inhibisyonu testleri

Referans(lar)	Test koşulları	Analiz metodu	Kateşolik Substrat	Kateşolik substrat konsantrasyonu	SAM konsantrasyonu	Enzim kaynağı (miktarı)	Ek bilgi
DHAR, 2000	pH=7.5, 35 C, toplam hacim=1 ml, reaksiyon zamanı=30 dak.	Spektroskopi (absorbans 510 nm)	Eskuletin	1 mM	2 mM	<i>Streptomyces griseus</i> S-KOMT (20-200 µg)	Km (esculetin) = 500 µM Km (SAM) = 600 µM Homosistein (ürün) inhibisyonu (Ki=224 µM)
ZHU, 2001	pH=7.4 ve 10.0, 37 C, toplam hacim=1 ml, reaksiyon zamanı=20 dak.	Radioaktivite-UV dedeksiyon (254 nm) HPLC-MS	Çay kateşinleri	10-100 µM	50 µM	insan k.ciğeri KOMT (0.5 mg/ml)	Çay kateşinleri ile inhibisyon (10-100 µM)
PALMA, 2006	pH=7.8, 37 C, toplam hacim=1 ml, reaksiyon zamanı=15 dak.	YPSK-EIMS ⁵	nitrobenzofenon türevleri (bisubstratlar)	10 µM	500 µM	sıçan S-KOMT (1 mg/ml)	Bisubstrat inhibitörler ile inhibisyon (10 µM)

¹ LC-MS: Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (Liquid chromatography-mass spectroscopy)

² DOBA: 3,4-dihidroksi-benzoik asit

³ 2-OH-E₂: 2-hidroksi-estradiol

⁴ 4-OH-E₂: 4-hidroksi-estradiol

⁵ YPSK-EIMS: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi- elektrosprey iyonizasyon kütle spektroskopisi (High pressure liquid chromatography-electrospray ionization mass spectroscopy)

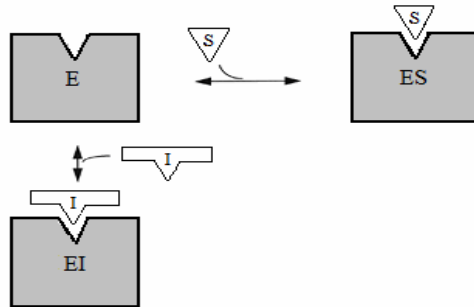
2.4. ENZİM İNHİBİSYONU MEKANİZMALARI

Bir enzimin aktivitesi bir çok yol ile bloke edilebilmektedir. Yüzlerce doğal bileşik ve binlerce sentetik kimyasal madde, enzimlerin katalitik aktivitesini inhibe edebilen maddeler olarak bilinmektedir. Temel olarak bu bileşikler, enzim tarafından katalizlenen reaksiyonların hızlarının düşmesine neden olmaktadır (LESKOVAC, 2003; COPELAND, 2000). Kimi zaman istenmeyen bir durum olan inhibisyon, bazı enzimatik reaksiyonlar için gerekliliği olan bir durumdur. Özellikle canlı organizmalarda oluşan enzimatik reaksiyonların inhibisyonu sağlık ve gıda alanlarında çokça çalışılan konulardandır.

Genel olarak inhibisyon, reaksiyon ortamına direkt ya da indirekt olarak katılan maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu maddelere inhibitör adı verilmekte ve bunlar reaksiyon üzerindeki etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Bölüm 2.3.'te verilen basit bir enzimatik reaksiyonun hızını hesaplamak amacıyla Michaelis ve Menten tarafından türetilen eşitlikler, inhibitörün tipine göre modifiye edilmiştir. Günümüzde, kompleks mekanizmaları açıklayabilmek amacıyla yeni hız eşitlikleri türetiliyor olmasına karşın, çoğu enzimatik reaksiyonun Michaelis-Menten yaklaşımı ile açıklanabilmesi mümkündür (PEKİN, 1970). Bu nedenle, bu çalışmada da doğrusal inhibisyon mekanizmaları ile açıklanabilen inhibitörler için türetilmiş eşitlikler kullanılmıştır.

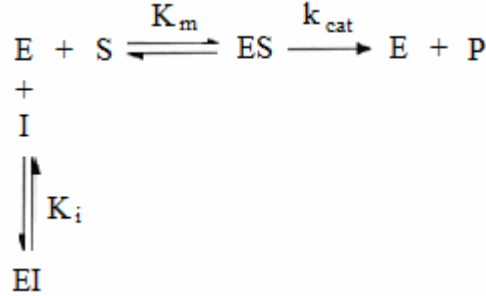
2.4.1. Rekabet Eden İnhibitörler (Kompetitif)

Rekabet eden inhibitörler genellikle, enzimin substratı ile benzer yapıya sahip bileşiklerdir bu özelliklerinden dolayı substrat ile aynı enzim aktif bölgesine bağlanırlar (LESKOVAC, 2003). Sonuç olarak, enzim-inhibitör kompleks yapısı (EI) oluşturularak ürün oluşumuna engel olurlar (Şekil 2-15).



Şekil 2-15. Basit kompetitif inhibisyon (COPELAND, 2000).

Şekil 2-15'te gösterilen muhtemel kompetitif inhibisyon reaksiyonu aşağıda verildiği gibi gerçekleşmektedir.



Inhibitör olmadığı koşulda gerçekleşen reaksiyon için hız, matematiksel olarak Eşitlik 2-1'de verilmiştir.

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eşitlik 2-1})$$

Bu eşitlikte $V_{max} = k_{cat} [E]_0$ olup maksimum hız olarak tanımlanmaktadır. Substratın afinitesi olan $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$ ise enzim-substrat kompleksinin (ES) oluştuğu reaksiyonun denge sabitidir. Bunun gibi bir reaksiyon ortamında kompetitif bir inhibitör (I) olduğu durumda ise Eşitlik 2-1'de verilen hız bağıntısı Michaelis-Menten yaklaşımı (sürekli hal hipotezi dikkate alınarak toplam E miktarı için kütle denkliği yapılır.) ile Eşitlik 2-2'deki gibi türetilmektedir (SHULER, 2001; COPELAND, 2000).

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (\text{Eşitlik 2-2})$$

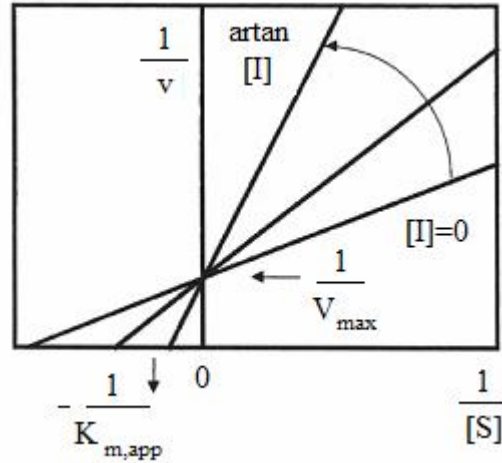
Enzim-inhibitör (EI) kompleksinin oluştuğu reaksiyonun denge sabiti, K_i ise inhibisyon sabiti olarak tanımlanmaktadır ve konsantrasyon birimine sahiptir. Michaelis-Menten eşitlikleri olarak da bilinen hız eşitlikleri kullanılarak inhibisyon mekanizması belirlenmesi ve kinetik sabitlerin bulunması karmaşık işlemler gerektirmektedir. Bu amaçla, Lineweaver ve Burk, Hanes ve Dixon gibi bilim adamları hız bağıntılarını linearize etmişlerdir (LESKOVAC, 2003). Bunlar arasından, Lineweaver ve Burk tarafından türetilmiş

lineer eşitlikler, mekanizma ve kinetik sabitleri grafiksel olarak aydınlatabilmek amacıyla en çok kullanılan eşitliklerdir.

Kompetitif inhibisyon hızının Lineweaver ve Burk tarafından geliştirilen yöntem ile (iki kez tersi alınmış) türetilmiş lineer formu Eşitlik 2-3'te verilmektedir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,app}}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Eşitlik 2-3})$$

Bu eşitlikte $K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ 'dir ve $1/v$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği çizdirildiğinde x ekseninin kestiği noktadan hesaplanabilmektedir. V_{max} değeri ise eşitlikten de anlaşılacağı gibi y eksenini kesen noktadan hesaplanmaktadır. Şekil 2-16'da Lineweaver-Burk grafiği olarak da bilinen kompetitif inhibisyon için elde edilmiş bir lineer hız grafiği verilmektedir.



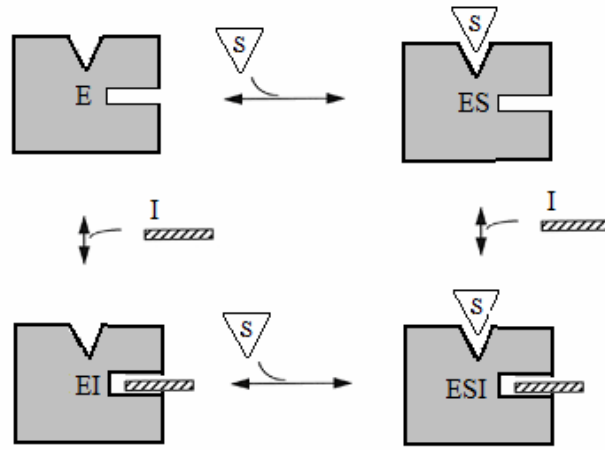
Şekil 2-16. Kompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (LESKOVAC, 2003).

Enzimatik bir reaksiyonun maksimum hızı, kompetitif inhibitör varlığında inhibitör konsantrasyonu artışından etkilenmemektedir. Ancak, inhibitör konsantrasyonundaki artış $K_{m,app}$ değerini arttırmaktadır.

2.4.2. Rekabet Etmeyen İnhibitörler (Nonkompetitif)

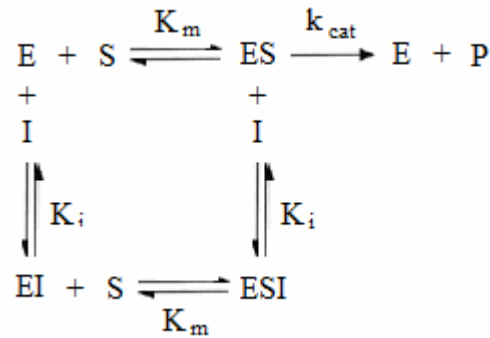
Rekabet etmeyen inhibitörler Şekil 2-17'de de verildiği gibi enzimin substratının bağlanmasına engel olmamaktadır. Enzim yapısına substrattan farklı bir yerden bağlanan bu

inhibitörler EI kompleksi ya da ESI kompleksi oluşturarak ürün oluşumuna engel olmaktadır (LESKOVAC, 2003).



Şekil 2-17. Basit nonkompetitif inhibisyon (COPELAND, 2000).

Nonkompetitif inhibisyon için geliştirilen muhtemel kinetik model aşağıda gösterilmektedir. Bu modele göre, ES ile ESI kompleksleri ve EI ile ESI komplekslerinin oluştuğu reaksiyonların denge sabitleri birbirine eşittir. Reaksiyon hızı, Michaelis-Menten yaklaşımına göre Eşitlik 2-4'te verildiği gibi türetilmiştir.



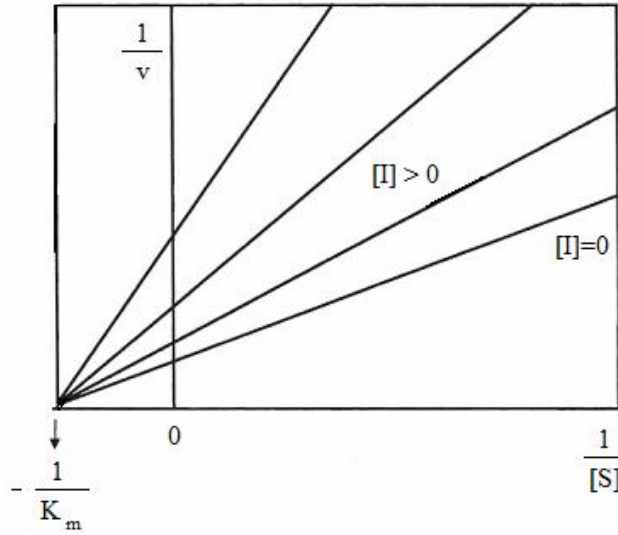
$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (\text{Eşitlik 2-4})$$

Nonkompetitif inhibisyon hızının lineer transformasyonu da yine Lineweaver-Burk tarafından geliştirilen yöntem ile Eşitlik 2-5'te verildiği gibi türetilmiştir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max,app}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max,app}} \quad (\text{Eşitlik 2-5})$$

Eşitlik 2-5'teki $V_{\max,app}$ = $\left(\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \right)$ 'dır ve kinetik sabitlerin hesaplanabilmesi için

yine Şekil 2-18'de verilen Lineweaver-Burk grafiği elde edilmektedir. Bu grafiğin eksenlerini kesen noktalardan gerekli hesaplamalar yapılabilmektedir.

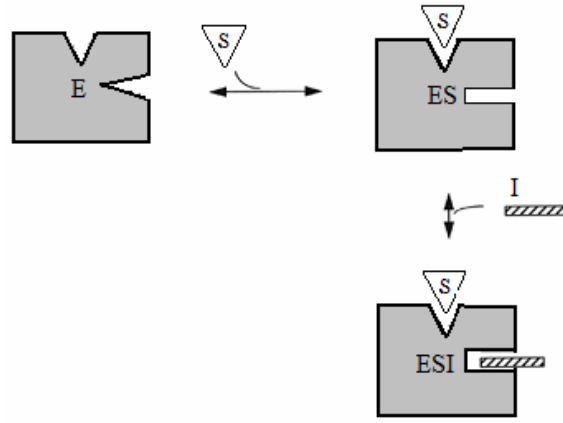


Şekil 2-18. Nonkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (LESKOVAC, 2003).

Bir nonkompetitif inhibitörün konsantrasyonundaki artış, kompetitif inhibitörün aksine K_m değeri üzerinde etki yaratmaz iken reaksiyonun maksimum hızını (V_{\max}) azaltmaktadır.

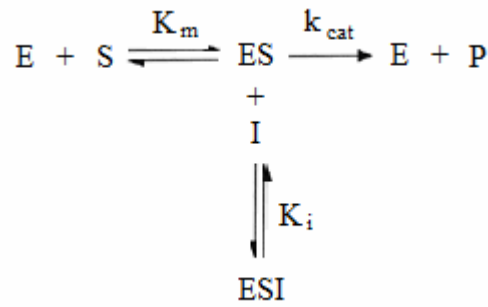
2.4.3. Rekabete Girmeyen İnhibitörler (Unkompetitif)

Rekabete girmeyen inhibitörler Şekil 2-19'da gösterildiği gibi enzimin substratı bağlanmasından sonra oluşan ES kompleksinin uygun aktif bölgesine bağlanırlar. Oluşan yeni ESI kompleksi inaktif bir yapı olup ürün oluşumunu engelleyerek enzimin katalitik aktivitesini düşürmektedir.



Şekil 2-19. Basit unkompetitif inhibisyon (COPELAND, 2000).

Muhtemel unkompetitif inhibisyon için geliştirilen kinetik model aşağıda verilmektedir. ESI kompleksinin oluştuğu reaksiyonun denge sabiti yine inhibisyon sabiti (K_i) olarak tanımlanmaktadır. Michaelis-Menten yaklaşımına göre türetilen hız eşitliğinde (Eşitlik 6) inhibisyon sabiti bir alfa (α) sabiti ile gösterilmiştir. Kompetitif ve nonkompetitif inhibisyon hız eşitliklerinde de bulunan ancak aldığı değere göre eşitliklerin sadeleşmesini sağlayan (α) sabiti inhibisyon mekanizmasını belirleyen en önemli matematiksel parametredir (COPELAND, 2000). (α) sabiti hız eşitliklerinde, enzimin substratına olan afinitesini, inhibitörün bağlanma derecesiyle açıklayabilmek amacıyla kullanılmaktadır.



$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)} \quad (\text{Eşitlik 2-6})$$

Buna göre, (α) sabitinin 1'den çok yüksek değerleri için ($\alpha \gg 1$), inhibisyon mekanizması kompetitif olarak, 1'den çok düşük değerler için ($0 < \alpha \ll 1$) ise unkompetitif olarak açıklanmaktadır. Nonkompetitif inhibisyon için (α) sabiti 1'e eşittir. Kompetitif ve

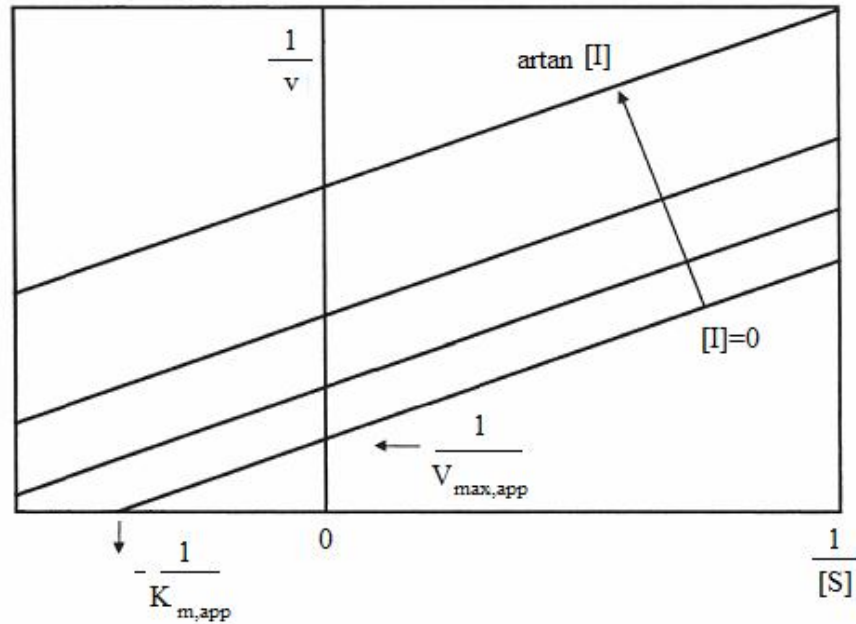
nonkompetitiflik derecesinin belirlenebildiği karışık tip inhibisyonlarda ise (α) sabitinin 1'e yakın olan alt ve üst değerleri ($\alpha < 1$ yada $\alpha > 1$) aldığı bilinmektedir (COPELAND, 2000).

Unkompetitif inhibisyon mekanizmasının grafiksel olarak açıklanabilmesi için türetilmiş linearize hız eşitliği ise Eşitlik 2-7'de verilmektedir.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,app}}{V_{max,app}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max,app}} \quad (\text{Eşitlik 2-7})$$

Buna göre; $K_{m,app} = \left(\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)} \right)$ ve $V_{max,app} = \left(\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)} \right)$ olmaktadır. Şekil 2-

20'de unkompetitif inhibisyona ait linear hız eşitliklerindeki kinetik sabitlerin hesaplanabilmesi için elde edilen Lineweaver-Burk grafiği verilmektedir.



Şekil 2-20. Unkompetitif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (LESKOVAC, 2003).

2.4.4. Karışık Tip İnhibitörler (Nonkompetitif ve Kompetitif)

Kinetik model olarak nonkompetitif inhibisyona benzeyen karışık tip inhibisyonlarda, inhibitör maddenin E ve ES kompleksine olan affinitesi farklıdır. Unkompetitif inhibisyonu

açıklarken belirtilen (α) sabiti karışık tip inhibisyonun baskın mekanizması hakkında bilgi verebilmektedir. Reaksiyon hız eşitliği (Eşitlik 2-8) verilen bu inhibisyon tipinde (α) sabiti 1'e yakın olan alt ve üst değerlerini ($\alpha < 1$ yada $\alpha > 1$) almaktadır.

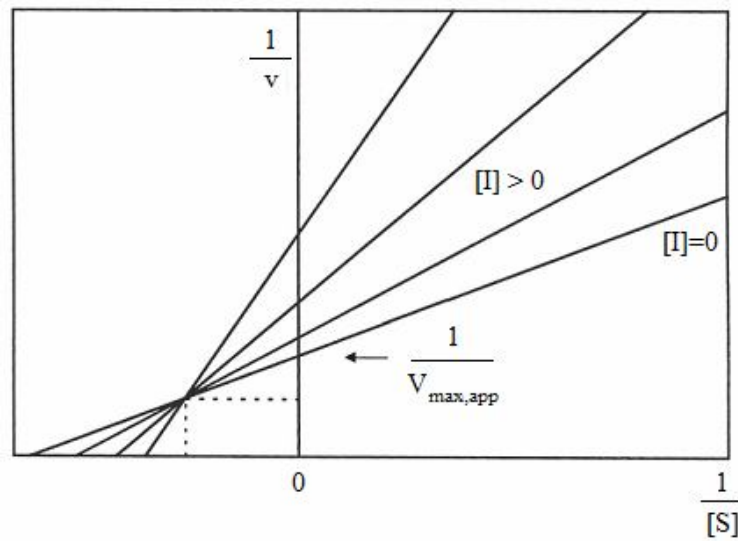
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (\text{Eşitlik 2-8})$$

Kompetitif ve nonkompetitif inhibisyonların bir arada gerçekleştiği bu mekanizmanın grafiksel olarak açıklanabilmesi için türetilmiş linearize hız eşitliği ise Eşitlik 2-9'da verilmektedir.

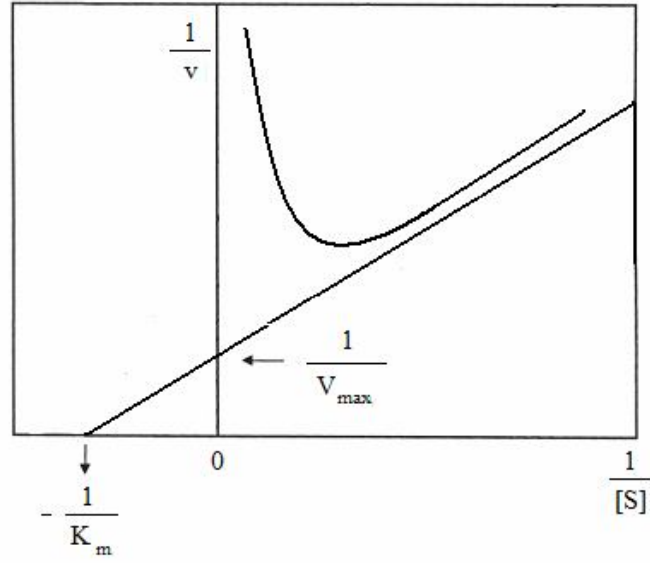
$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m,app}}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{\max,app}} \quad (\text{Eşitlik 2-9})$$

Bu eşitlikte; $K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ ve $V_{\max,app} = \left(\frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)}\right)$ olarak tanımlanmaktadır.

Şekil 2-21'de karışık tip inhibisyona ait lineer hız eşitliği ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği verilmektedir.



Şekil 2-21. Karışık tip inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği (LESKOVAC, 2003).



Şekil 2-22. Substrat inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği (SHULER, 2001).

Kinetik sabitlerin eksenleri kesen noktalara göre bulunabilmesi için substrat konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen hiperbolik fonksiyonun düşük substrat konsantrasyonunu ifade eden bölgesinden teğet bir doğru denklemi çıkartılmaktadır. Elde edilen bu teğetin eksenleri kesen noktalarından V_{max} ve K_m değerleri hesaplanabilmektedir.

3.0. AMAÇ

Bu çalışmanın genel amacı özellikle üzerlik (*P. harmala*) tohumu ve zeytin (*O. europaea*) yaprağından elde edilen alkaloid ve polifenolik bazlı özüt ve fraksiyonların KOMT enzim aktivitesini inhibe etme potansiyellerini araştırmaktır. İlave olarak, zeytin gibi polifenolik içeriği yüksek olduğu bilinen bazı bitkilerin yapraklarından elde edilen özütlerin de inhibisyon potansiyellerinin test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ana amacına bağlı olarak proje süresi boyunca hedeflenen başarı ölçütleri aşağıda sıralanmaktadır:

- ✓ Üzerlik tohumu alkaloidleri ve zeytin yaprağı polifenollerinin verimliliği en yüksek yöntemler ile özütlenmesi,
- ✓ Özütleme verimine etki eden, sıcaklık, pH ve çözügen tipi gibi parametrelerin incelenmesi,
- ✓ Üzerlik tohumundan ve zeytin yaprağından elde edilen özütlerin fraksiyonlanması ve alkaloid ve polifenolik bileşiklerin saflıklarının arttırılması,
- ✓ Alkaloid ve polifenolik bazlı bileşiklerin karakterize edilmesi,
- ✓ KOMT enziminin aktif protein miktarının belirlenmesi,
- ✓ Spektrofotometrik ve florometrik metotlar ile KOMT enziminin aktivitesinin tayin edilmesi ve hassasiyeti en yüksek olan metot ile inhibisyon çalışmalarının yapılması,
- ✓ Toplam on sekiz adet alkaloid ve polifenolik bazlı standartlar, özütler ve fraksiyonların KOMT enzim aktivitesini engelleyebilme potansiyellerinin kinetik olarak incelenmesi,
- ✓ İnhibisyon deneyleri sonucunda elde edilen kinetik parametrelerin literatür verileri ile karşılaştırılması ve bu verilerin literatüre kazandırılması.

4.0. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

4.1. MATERYALLER

İnhibisyon deneylerinde kullanılan bitki türlerinden zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve diğer 4 bitkinin yaprakları; hayıt (*Vitex agnus-castus*), menengiç (*Pistacia terebinthus*), sakız (*Pistacia lentiscus*) ve laden (*Cistus parviflorus*); İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü kampüs alanında ve Karaburun yöresinde yetişen bitkiler olup Mayıs, 2006 tarihinde tarafımızdan toplanmıştır. Üzerlik (*Peganum harmala*) tohumu ise aktardan alınmıştır. Üzerlik dışındaki bitkilerin ekstraksiyonunda kullanılan etanol (C₂H₅OH) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan satın alınmıştır. Metanol (CH₃OH), amonyum hidroksit (NH₄OH) ve kloroform (CHCl₃) solventleri üzerlik tohumundaki alkaloidlerin ekstraksiyonunda kullanılmış olup yine Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan satın alınmıştır. Alkaloid ekstraksiyonunda kullanılan petrol eteri ve hidroklorik asit (HCl) sırasıyla Riedel-de Haen (Almanya) ve Merck KGaA (Almanya)'dan alınmıştır. Bitkilerden elde edilen ekstraktların ve fraksiyonlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) analizlerinde mobil faz olarak kullanılan asetonitril (CH₃CN) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan, izopropil alkol (C₃H₇OH) ve trietilamin (N(CH₂CH₃)₃) Riedel-de Haen (Almanya)'dan, formik asit (HCOOH) ve asetik asit (CH₃COOH) Merck KGaA (Almanya)'dan satın alınmışlardır.

Bradford yöntemi ile yapılan protein miktarı belirleme çalışmasında Merck KGaA (Almanya)'dan temin edilen Bovin Serum Albumin (BSA) referans protein olarak kullanılmıştır. Domuz karaciğerinden izole edilmiş Kateşol-O-metiltransferaz (KOMT) enzimi ve metil kaynağı olarak kullanılan substrat S-adenozil-L-metionin (SAM) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan temin edilmiştir. Florometrik yöntem ile yapılan enzim aktivitesi testlerinde kullanılan diğer reaktif maddelerden Eskuletin (6,7-dihidroksikumarin), magnezyum klorit (MgCl₂) ve L-sistein'de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan satın alınmıştır. Potasyum fosfat (K₂HPO₄/KH₂PO₄) tampon çözelti olarak kullanılmış olup Fluka/Merck (Almanya)'dan alınmıştır. İnhibitör çözgeni olarak kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO) Carlo-Erba Reagents (İspanya)'dan satın alınmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile yapılan enzim deneylerinde kullanılan reaktiflerden dihidroksiasetofenon (substrat-DHAP), ditiotreitol (DTT), tampon çözelti olarak kullanılan N-Tris(hidroksimetil)-metil-2-aminoethan sülfonik asit (TES) ve borik asit Sigma-Aldrich

Chemie GmbH (Almanya)'dan satın alınmıştır. Sodyum hidroksit (NaOH), tampon çözeltinin pH ayarlaması için kullanılmış olup Riedel-de Haen (Almanya)'dan alınmıştır.

Enzim inhibisyon çalışmalarında inhibitör standartları olarak kullanılan 3,5-dinitrokateşol (3,5-DNK), harmin ve harmol hidroklorit dihidrat Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya)'dan, harmalin ve harmalol hidroklorit dihidrat Fluka (Almanya)'dan temin edilmiştir. Oleuropein ve rutin standartları ise sırasıyla Extrasynthese (Genay, Fransa) ve Merck KGaA (Almanya)'dan satın alınmıştır.

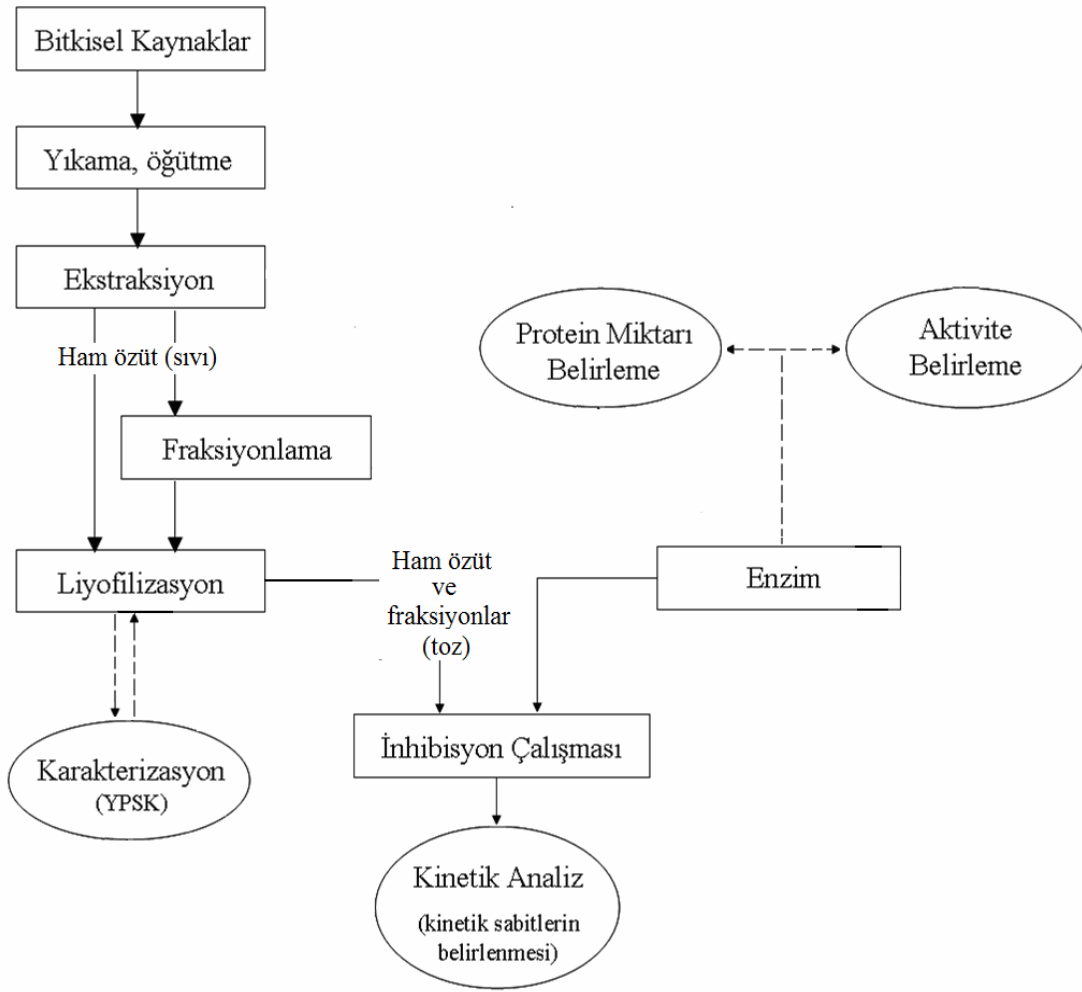
4.2. YÖNTEMLER

Bu çalışmada kullanılan ve geliştirilen metotlar genel olarak altı basamaktan oluşmaktadır. İlk üç basamakta, inhibitör olarak kullanılan bitki özütleri ve fraksiyonları elde edilmiş ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) yardımı ile karakterize edilmişlerdir. Kalan basamaklarda enzim protein miktarı ve aktivitesi belirlenmiş olup bitki özütleri ve fraksiyonları ile enzim inhibisyon kinetiği çalışması yapılmıştır. Aktivite ve inhibisyon kinetiği çalışmaları için ayrıca iki farklı analiz metodu kullanılmış ve hassasiyetleri kıyaslanmıştır. Şekil 4-1'de çalışma boyunca izlenen strateji ve yöntemlerin şematik olarak bir genel gösterimi verilmektedir.

4.2.1. İnhibitörlerin Elde Edilmesi

4.2.1.1. Üzerlik (*P. harmala*) Tohumundan Özüt Eldesi

Üzerlik (*P. harmala*) tohumunda bulunan alkaloidlerin ekstraksiyonu için literatürden yararlanılarak farklı özütleme metotları araştırılmış, uygulanmış ve verimlilik baz alınarak sıklıkla kullanılan ekstraksiyon metotları olan çürütme (maceration), emdirme (soaking) ve Soxhlet ekstraksiyonu metotları karşılaştırılmıştır. Çözgen tipi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ya da pH gibi parametrelerin özütleme verimine etkisi incelenerek karşılaştırılmaları yapılan metotların detayları aşağıda verilmiştir.



Şekil 4-1. Deneysel Çalışmaların Şematik Gösterimi

Metot A (Metanol ile Çürütme (maceration)): Çözgen olarak metanolün kullanıldığı bu metotta ekstraksiyon süresi ve pH'nın ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir.

Basamak 1: Bir miktar kurutulmuş ve öğütülmüş *P. harmala* tohumu,

Sistem 1 (S1): karıştırılmalı mantolu ısıtıcı ile sıcaklığı 50 °C de sabitlenmiş sistemde, 50 ml metanol ile her biri için 1 saat boyunca 4 kez çürütülmüştür.

Sistem 2 (S2): çalkalamalı su banyosunda 50 °C ve 150 devirde metanol ile 24 saat süreyle çürütülmüştür.

Basamak 2: İki sistemden elde edilen metanol çözeltisi filtre edilmiştir. Filtre edilmiş çözeltilerden SpeedVac vakumlu buharlaştırıcı kullanılarak metanol uzaklaştırılmıştır. Kalan katı madde 50 ml % 2'lik HCl ile çözülerek filtre edilmiştir. Asidik çözelti 20 ml petrol eteri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabii tutulmuş ve ayırma hunisi yardımıyla asidik kısım toplanmıştır.

Basamak 3: Üçüncü basamakta pH'nın ekstraksiyon verimi üzerine etkisini incelemek üzere 2 sistemden elde edilen çözeltilerin asitlikleri amonyum hidroksit eklenmesiyle arttırılmıştır. Elde edilen çözeltilerin son pH değerleri aşağıda verilmiştir.

Sistem 1-1 (S1-1): pH = 10,0

Sistem 2-1 (S2-1): pH = 11,0

Sistem 2-2 (S2-2): pH = 8,5

Basamak 4: Sonuç olarak elde edilen farklı asitliklerdeki 3 çözelti, 50 ml kloroform ile 4 kez sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur. Yine ayırma hunisi yardımıyla kloroform kısmı toplanan çözeltilerden solventleri uzaklaştırılarak ham alkaloit özütleri elde edilmiştir.

Metot B (Çözgen Emdirme (Soaking)): Çözgen emdirme metoduna göre yapılan ekstraksiyonlar için üç değişik çözgen ile üç değişik sistem oluşturulmuştur.

Sistem 1 (S1): Çözgen olarak metanolün kullanıldığı bu sistemin ilk basamağı dışında kalan bütün işlemler için Metot A'nın S1-1 sisteminde yapılan işlemler uygulanmıştır. Farklı olarak birinci basamakta bir miktar kurutulmuş öğütülmüş üzerlik tohumuna çalkalamalı inkübatörde 55 °C, 150 devirde 30 saat süre ile metanol emdirilmiştir.

Sistem 2 (S2): İlk olarak üzerlik tohumlarında bulunan yağ ve benzeri bitki materyallerini ayırabilmek amacıyla bu sistemde çözgen olarak petrol eteri kullanılmıştır. 25 °C de 48 saat süre ile petrol eteri emdirilen tohumlara, filtre edildikten sonra 8 saat süre ile 50 °C de metanol emdirilmiştir. Metanolünden uzaklaştırılan katı madde Metot A, S1-1 sisteminde olduğu gibi asidik

çözeltide çözülüp, bazik çözelti ile pH (10,0) ayarlaması yapılarak kloroform ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur.

Sistem 3 (S3): Bu sistemde ise ekstraksiyon çözücü olarak etil asetat kullanılmıştır. Bir miktar sodyum bikarbonat tuzu ile karıştırılan üzerlik tohumlarına 25 °C de 24 saat süre ile 2 kez etil asetat emdirilmiştir. Her bir 24 saatlik süre sonunda filtre edilerek elde edilen bazik etil asetat kısımları toplanmış ve 25 ml % 5'lik HCl ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur. Ayırma hunisi yardımıyla asidik kısmı alınan çözeltiliye bir miktar 5 M'lık NaOH eklenerek pH değeri 3,5'a ayarlanmıştır.

Metot C (Soxhlet Ekstraksiyonu): Soxhlet aparatı ile gerçekleştirilen bu metotta da çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Farklı sürelerde tamamlanan Soxhlet ekstraksiyonu yöntemi ile ekstraksiyon süresinin verimliliğe etkisi incelenmiştir. Buna göre bir miktar öğütülmüş üzerlik tohumu 70 °C de;

Sistem 1 (S1): 7.5 saat

Sistem 2 (S2): 20 saat

Sistem 3 (S3): 26 saat sürelerle ekstre edilmiştir. Daha sonraki işlemler Metot A'da verilen basamaklar takip edilerek uygulanmıştır. Bu metotta, kloroform ile ekstraksiyon öncesi çözelti pH'sı 10.0'da sabitlenmiştir.

Üzerlik (*P. harmala*) tohumundaki alkaloidlerin ekstraksiyonu için uygulanan bu metotlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Optimum verimliliğe ulaşılan metot ile gerekli miktarda elde edilen özütler enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılmak üzere koyu renkli cam kaplarda serin bir ortamda saklanmıştır.

4.2.1.2. Zeytin (*O. europaea*) Yaprağından Özüt Eldesi

Zeytin yaprağı ve diğer bitkilerin yaprakları (hayıt, menengiç, laden ve sakız) literatürde belirtilen şekilde elde edilmiştir (ALTIOK, 2008; BAYÇIN, 2007). Toplanıp yıkanıp, kurutulan bitki yaprakları öğütüldükten sonra %70'lik sulu etanol çözeltisi ile ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi çalkalamalı inkübatörde 250 devir, 25°C ve katı/sıvı oranı 1/20 olacak şekilde 2 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işlemi

sonunda elde edilen % 70'lik etanol çözeltisi içerisindeki özüt, döner vakumlu evaporatör kullanılarak etanolünden arındırılmıştır. Sulu özüt Telstar Cryodos marka liyofilizatörde (-52 °C ve < 0,2 mbar) dondurularak kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Fenoliklerce zengin olan ham özüt enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılmak üzere koyu renkli cam kaplarda serin bir ortamda saklanmıştır.

4.2.2. Özütlerin Fraksiyonlanması

Optimize edilmiş ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ham alkaloidlerce ve fenoliklerce zengin özütlerin her biri için farklı fraksiyonlama teknikleri kullanılmıştır.

4.2.2.1. Üzerlik (*P. harmala*) Tohumu Özütünün Fraksiyonlanması

Üzerlik tohumundan elde edilen ham alkaloid özütü Agilent 1100 Serisi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) cihazı ile uyumlu Gilson marka fraksiyonlama ünitesi kullanılarak fraksiyonlanmıştır. Bu işlem için uygun YPSK çalışma koşulları ve özellikleri Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler
(Alkaloid Fraksiyonlama)

Birim ve Parametreler	Özellik ve Koşullar
Kolon	Zorbax SB-C18 semipreparatif kolon
Kolon boyu	25 cm
Kolon çapı	9,4 mm
Parçacık boyutu	5 µm
Mobil faz(lar)	Mobil faz A: Asetonitril/izopropil alkol (1:1) (hacimce) Mobil faz B: Asetonitril/izopropil alkol/Deiyonize su/Formik asit (100:100:300:0,3) (ml) (Karışımın pH'sı trietilamin eklenerek 8,6 ya ayarlanmıştır.)
Akış debisi	1 ml/dak
Sıcaklık	30 °C
Basınç	60-70 bar
Dedektör tipi	Diyot Dizisi Dedektörü (DAD-diode array detector)
Dalga boyu	330 nm

Fraksiyonlama işlemi için en uygun ayırımın elde edildiği elusyon programı mobil fazların kuvvetliliği değiştirilerek belirlenmiştir. Mobil faz konsantrasyonlarının analiz süresi boyunca değişimi Tablo 4-2’de verilmiştir.

Tablo 4-2. YPSK elusyon programı (Alkaloit Fraksiyonlama)

Zaman (dak)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	5	95
18	5	95
21	30	70
24	38	62
27	36	64
30	35	65
35	0	100
40	0	100

Ham alkaloit özütü için yapılan YPSK analiz sonuçlarına göre üzerlik tohumu alkaloitleri üç fraksiyon olarak toplanmışlardır. Mobil faz içindeki bu fraksiyonlar vakumlu buharlaştırıcı yardımı ile çözgenlerden arındırılmıştır. Toz haldeki alkaloit fraksiyonları YPSK analizlerinde ve enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır.

4.2.2.2. Zeytin (*O. europaea*) Yaprağı Özütünün Fraksiyonlanması

Zeytin yaprağı özütündeki fenolikler literatürde belirtilen şekilde ipek fibroin dolgulu kolon kullanılarak fraksiyonlarına ayrılmıştır (BAYÇIN, 2007). Buna göre ilk olarak, 15 g ipek fibroin ile doldurulmuş kolon safsızlık yaratabilecek maddelerden arındırmak ve aktifleştirmek amacıyla sırasıyla deiyonize su, etanol ve tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır. Daha sonra, 250 ml suda çözünmüş 20 g ham özüt, kolon doyuma ulaşana kadar yüklenmiştir. İlk olarak suda çözünen ve polariteleri yüksek olan oleuropein gibi fenolikleri fraksiyonlamak amacıyla kolon 9 kez su ile yıkanmıştır. Elde edilen 9 su fraksiyonu, YPSK analizleri sonucu belirlenen içeriklerine göre 4 ana fraksiyon olarak birleştirilmiştir.

Daha sonra, daha düşük polaritedeki fenoliklerin (rutin vb.) fraksiyonlanması amacıyla kolon % 70’lik etanol çözeltisi ile 4 kez yıkanmıştır. Alkol fraksiyonları da yine

YPSK analizleri sonucu kendi içinde 2 ana fraksiyon olarak toplanmıştır. Zeytin yaprağı özütünden elde edilen özellikle oleuropein ve rutin içeriği bakımından zengin fraksiyonlar liyofilizatörde kurutulup enzim çalışmasında ve YPSK analizlerinde kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmaktadır.

4.2.3. İnhibitörlerin Karakterizasyonu

Enzim inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere elde edilen bitki özütleri ve bunların fraksiyonları da yine Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) cihazı kullanılarak karakterize edilmişlerdir.

4.2.3.1. Üzerlik (*P. harmala*) Tohumu Özütünün Karakterizasyonu

Üzerlik tohumlarından elde edilen özüt ve fraksiyonların içerisindeki alkaloidlerin tanımlanması, miktarlarının belirlenmesi amacıyla YPSK analizleri yapılmıştır. Elde edilen örnekler analiz öncesinde 0,45 µm'lik membran filtreler ile filtre edilmiştir. Alkaloidlerin karakterizasyonu için uygun YPSK çalışma koşulları ve özellikleri Tablo 4-3'de verilmiştir.

Tablo 4-3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler
(Alkaloid Karakterizasyon)

Birim ve Parametreler	Özellik ve Koşullar
Kolon	LiChrospher 100 RP-18 analitik kolon
Kolon boyu	25 cm
Kolon çapı	4 mm
Parçacık boyutu	5 µm
Mobil faz(lar)	Mobil faz A: Asetonitril/izopropil alkol (1:1) (hacimce) Mobil faz B: Asetonitril/izopropil alkol/Deiyonize su/Formik asit (100:100:300:0,3) (ml) (Karışımın pH'sı trietilamin eklenerek 8,6 ya ayarlanmıştır.)
Akış debisi	1 ml/dak
Sıcaklık	30 °C
Basınç	170-180 bar
Dedektör tipi	Diyot Dizisi Dedektörü (DAD-diode array detector)
Dalga boyu	330 nm

Fraksiyonlama işlemi için en uygun ayırımın elde edildiği elusyon programı mobil fazların kuvvetliliği değiştirilerek belirlenmiştir. Mobil faz konsantrasyonlarının analiz süresi boyunca değişimi Tablo 4-4'de verilmiştir.

Tablo 4-4. YPSK elusyon programı (Alkaloit Karakterizasyon)

Zaman (dak)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	10	90
3	10	90
6	15	85
15	15	85
18	18	82
20	0	100

Alkaloit fraksiyonlaması ve karakterizasyonu için seçilen 330 nm dalga boyu, ham özütün, fraksiyonlarının ve alkaloit standartlarının Thermo Multiskan mikropilaka okuyucu ile spektrofotometrik taranması sonucu optimum dalga boyu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, YPSK analizleri ile her bir alkaloit standardı için kalibrasyon eğrileri, dedeksiyon ve kantifikasyon limitleri belirlenmiştir (bkz. EK-A).

4.2.3.2. Zeytin (*O. europaea*) Yaprığı Özütünün Karakterizasyonu

Zeytin yaprağı özütü içerisindeki oleuropein ve rutin gibi polifenollerin karakterizasyonu da yine literatürde belirtildiği şekilde YPSK ile yapılmıştır (ALTIOK, 2008; BAYÇIN, 2007). Polifenoliklerin karakterizasyonu için uygun YPSK çalışma koşulları ve özellikleri Tablo 4-5'de verilmiştir.

Tablo 4-5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi çalışma koşulları ve özellikler
(Polifenolik Karakterizasyon)

Birim ve Parametreler	Özellik ve Koşullar
Kolon	LiChrospher 100 RP-18 analitik kolon
Kolon boyu	25 cm
Kolon çapı	4 mm
Parçacık boyutu	5 µm
Mobil faz(lar)	Mobil faz A: % 2,5 'luk sulu asetik asit çözeltisi Mobil faz B: Asetonitril
Akış debisi	1 ml/dak
Sıcaklık	30 °C
Basınç	120-130 bar
Dedektör tipi	Diyot Dizisi Dedektörü (DAD-diode array detector)
Dalga boyu	280 nm

Zeytin yaprağı özütü içerisindeki polifenoliklerin karakterizasyonu için literatürde verilen optimum YPSK elusyon programı Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-6. YPSK elusyon programı (Polifenolik Karakterizasyon)

Zaman (dak)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	95	5
20	75	25
40	50	50
50	20	80
60	5	95

Özüt içerisindeki bir çok polifenolik arasından en baskın olan oleuropein ve rutin miktarları standartlarının kalibrasyonu ile belirlenmiştir (bkz. EK-B).

4.2.4. Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzimatik reaksiyonlarda aktif protein miktarının belirlenmesi kinetik hesaplamaların yapılması sırasında önem taşımaktadır. Literatürde raporlanan bir çok protein tayini metodu arasında Bradford metodu hassasiyeti yüksek bir metot olarak bilindiğinden dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir (ROSENBERG, 1996). Bradford metodundaki temel prensip bazik ve aromatik amino asitlere bağlanma eğilimi olan asidik bir boyar maddenin farklı konsantrasyonlarda protein içeren çözeltilere katılmasıyla protein çözeltisinin absorbansında yarattığı değişimi ölçmektir. Bu metotta, her bir protein konsantrasyonu için değişen absorbans değerleri kullanılarak proteine ait kalibrasyon eğrileri oluşturulmaktadır (WEB_6).

Bu prensibe dayanarak domuz karaciğerinden izole edilmiş standart KOMT enziminin aktif protein analizi için uygulanan Bradford metodunda, Bovin Serum Albumin (BSA) referans protein, Commassie Mavisi ise asidik boyar madde olarak kullanılmıştır. BSA ve KOMT proteinleri için 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmıştır. Her iki protein için de oluşturulan kalibrasyon eğrileri için 0-16 µg/ml konsantrasyon aralığında beş farklı noktada optimum dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Thermo Varioskan Mikroplaka Okuyucu kullanılarak 400-700 nm dalga boyları arasında yapılan spektral tarama sonucuna göre 595 nm optimum dalga boyu olarak belirlenmiştir.

BSA ve KOMT için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimleri oranlanarak KOMT enzimi içerisindeki aktif protein miktarı belirlenmiştir.

4.2.5. KOMT Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Kinetiği Belirlenmesi

KOMT enziminin aktivitesi, literatürde verilen protokollere göre spektrofotometrik ve florometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemler arasında daha hassas ve daha ekonomik olan florometrik yöntem ile inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.5.1. Spektrofotometrik Metot ile Aktivite Tayini

KOMT enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak tayin edilmesi için Sigma-Aldrich Chemie GmbH firması tarafından hazırlanan protokol kullanılmıştır. Bu protokole göre, KOMT tarafından katalizlenen DHAP metillenme reaksiyonu sonucunda oluşan O-

metillenmiş ürünlerin 344 nm dalga boyunda yarattıkları absorpsiyon değerleri Thermo Multiskan küvet okuyucu ile ölçülmüştür.



Reaksiyon hızı durdurma yöntemi ile 7,6 pH'da gerçekleştirilen bu protokole reaksiyon sıcaklığı 37 °C ve toplam reaksiyon hacmi 1 ml olarak sabit tutulmuştur. Reaksiyonun metil verici substratı olan SAM 4-0,2 mM konsantrasyon aralığında (5, 10, 15 ve 20 kat seyreltme) değiştirilirken DHAP konsantrasyonu 0,5 mM'da sabit tutulmuştur. 150 ünitelik KOMT standart enzimi (1,9 mg katı) ise 2,55 mg katı madde/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Test ve kör çözeltiler için sırasıyla eklenen reaktifler ve miktarları Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-7. Spektrofotometrik Metot için Reaksiyon Ortamı

Reaktifler	Test çözeltisi (µl)	Kör Çözelti (µl)
TES ¹	200	300
DHAP	100	100
SAM	100	-
KOMT	100	100
Sodyum Borat ²	500	500

¹ 0,2 M TES (enzim seyreltmeleri için tampon çözelti) 6 mM MgCl₂ ve 20 mM DTT içermektedir. 1 M'lık NaOH ile pH 7,6'da sabitlenmiştir.

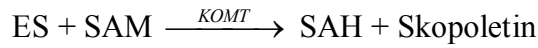
² 0,4 M Sodyum borat (durdurma çözeltisi) borik asit çözeltisinin pH değeri 1 M'lık NaOH ile 10,0'a sabitlenerek hazırlanmıştır.

Enzim aktivitesi, uygulanan protokole belirtilen matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Bu metot için yapılan hesaplamalar sonuç bölümünde verilmiştir.

4.2.5.2. Florometrik Metot ile Aktivite ve İnhibisyon Kinetiği Tayini

Florometrik yöntem ile KOMT aktivitesi belirleme çalışması için literatürdeki çalışmalar baz alınmıştır (KURKELA, 2004; VESER, 1987). Bu metotta, KOMT tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunda metil alıcı substrat olarak Eskuletin (ES)

kullanılmıştır. Substratın *O*-metillenme sonucu skopoletine dönüşme miktarı, Thermo Varioskan mikropkaya okuyucu kullanılarak 355 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında florometrik olarak ölçülmüştür. Reaksiyon süresi toplam 2 saat olup 30 sn. aralıklar ile floresan değerleri ölçülmüştür. Reaksiyonun durağan fazının 0,5 saatlik aralığında alınan iki floresan değeri kinetik hesaplamaları yapmak amacıyla belirlenmiştir. Birim floresan ünitesindeki artış skopoletin standardı ile yapılan kalibrasyon eğrisinden hesaplanmıştır (bkz. EK-C).



37 °C'de ve pH 7,4'te gerçekleştirilen aktivite ve inhibisyon deneylerindeki reaksiyonların toplam hacimleri sırasıyla 200 µl ve 250 µl olarak belirlenmiştir. Florometrik enzim deneyleri için 5 mM MgCl₂ ve 20 mM L-sistein içeren 100 mM'lık potasyum fosfat tampon çözeltisi hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikropkalarda gerçekleştirilen bu yöntem için ilk olarak enzim ve substratlar için doğrusal çalışma aralığı bulunmuştur. Buna göre optimum enzim (KOMT) ve eskuletin (ES) konsantrasyonları sırasıyla 11 µg protein/ml ve 4 µM olarak belirlenmiş ve inhibisyon deneylerinde sabit tutulmuştur. Çalışmalarda kullanılan SAM konsantrasyonları ise 10 ile 600 µM arasında değiştirilmiştir.

İnhibisyon deneylerinde kullanılan bitki özütlerinin, fraksiyonların ve standartların konsantrasyonları gerekli inhibisyonun elde edildiği değere kadar incelenmiştir. Buna göre, 3,5-dinitrokateşol 0,1-0,005 µg/ml konsantrasyonlarında, diğer inhibitörler ise 0,5 ve 10 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Tablo 4-8'de aktivite ve inhibisyon deneylerine ait test ve kör çözeltiler için reaksiyon ortamında kullanılan reaktiflerin miktarları verilmiştir.

Tablo 4-8. Florometrik Metot için Reaksiyon Ortamı

Reaktifler	Test çözeltisi (µl)	Kör Çözelti (µl)	Test çözeltisi (µl)	Kör Çözelti (µl)
SAM	50	-	50	-
ES	75	75	125	125
KOMT	50	50	50	50
Tampon	25	75	-	50
İnhibitör(ler)	-	-	25	25

4.2.6. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Kinetiği Veri Analizi

Enzim aktivitesi ve inhibisyon kinetiğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucu elde edilen reaksiyon hızı (v) verileri Bölüm 2.3. ve 2.4.'te verilen literatür bilgilerine dayanarak analiz edilmiştir. Elde edilen reaksiyon hızı verileri COPELAND, 2000 kitabında açıklanan Michaelis kinetik modellerinin (Eşitlik 2-1, 2-2, 2-4, 2-6 ve 2-8) kullanıldığı GraphPad Prism 5.0 doğrusal olmayan regresyon programı ile uygun modele uydurulmuştur. Bu sayede aktivite ve inhibisyon kinetik parametreleri hesaplanmıştır. İnhibisyon mekanizmalarının doğrulamaları hız ve substrat konsantrasyonu verilerinin doğrusal transformasyonu ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılarak yapılmıştır. Ayrıca, seçilen kinetik modelin istatistiksel olarak uygunluğu varyansların analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testi teknikleri ile tespit edilmiştir.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Eşitlik 2-1})$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (\text{Eşitlik 2-2})$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (\text{Eşitlik 2-4})$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (\text{Eşitlik 2-6})$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)} \quad (\text{Eşitlik 2-8})$$

- * Eşitlik 2-1: İnhibitörsüz enzim kinetiği model eşitliği; Eşitlik 2-2: Kompetitif inhibisyon kinetiği model eşitliği; Eşitlik 2-4: Nonkompetitif inhibisyon kinetiği model eşitliği; Eşitlik 2-6: Unkompetitif inhibisyon kinetiği model eşitliği; Eşitlik 2-8: Karışık tip inhibisyon kinetiği model eşitliği.

5.0. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. İNHİBİTÖRLERİN ELDE EDİLMESİ ve KARAKTERİZASYONU

Bölüm 4’te detaylı olarak anlatılan metotlar ile yapılan ekstraksiyon, fraksiyonlama, karakterizasyon ve enzim aktivitesi/inhibisyonu belirleme deneylerinin sonuçları bu bölümde sırasıyla verilmektedir.

5.1.1. Üzerlik (*P. harmala*) Tohumundan Özüt Eldesi ve Karakterizasyonu

Üzerlik (*P. harmala*) tohumunda bulunan alkaloidleri elde etmek amacıyla detayları yöntemler bölümünde verilen bir çok metot denenmiştir. Buna göre, çürütme (maceration), emdirme (soaking) ve Soxhlet ekstraksiyonu ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar verimlilik baz alınarak karşılaştırılmıştır.

Üzerlik tohumunda baskın olarak harmin, harmalin, harmol ve harmalol alkaloidleri bulunduğu bilinmektedir. Bu açıdan farklı ekstraksiyon metotları uygulanarak elde edilen özütler ilk olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) kullanılarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemi için öncelikle alkaloid standartları ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (bkz. EK-A Alkaloidlere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Örnek Hesaplama). Buna göre her bir ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş özütlerin içerisindeki baskın alkaloidlerin miktarları belirlenmiştir. Tablo 5-1’de çözügen tipi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH gibi parametrelerin değiştirildiği ekstraksiyon yöntemlerinin uygulama koşulları özetlenmiştir.

Tablo 5-1. Alkaloid ekstraksiyonu yöntemleri için çalışma koşulları

Ekstraksiyon Metodu	Çözgen Tipi	Sıcaklık (°C)	pH	Ekstraksiyon Süresi (saat)
Metot A, S1-1	Metanol	50	10,0	4
Metot A, S2-1	Metanol	50	11,0	4
Metot A, S2-2	Metanol	50	8,5	4
Metot B, S1	Metanol	55	10,0	30
Metot B, S2	Petrol Eteri/ Metanol	50	10,0	56
Metot B, S3	Etil Asetat	25	3,4	48
Metot C, S1	Metanol	70	10,0	7,5
Metot C, S2	Metanol	70	10,0	20
Metot C, S3	Metanol	70	10,0	26

Tablo 5-1’de verilen yöntemler ile elde edilen özütlerin, alkaloit standartları için oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanan verimlilikleri Tablo 5-2’de verilmiştir.

Tablo 5-2. Üzerlik tohumundan elde edilen alkaloit özütlerinin verimlilik analizi

Ekstraksiyon Metodu	Harmalol (mg)	Harmol (mg)	Harmaline (mg)	Harmine (mg)	Toplam özüt miktarı (mg)	Başlangıçtaki tohum miktarı (mg)	verim (%) = (mg alkaloit*100/ mg tohum)
Metot A*, S1-1	-	14,85	61,48	38,72	115,05	2000	5,75
Metot A, S2-1	-	-	53,45	35,43	88,88	1550	5,73
Metot A, S2-2	-	-	43,82	26,95	70,77	1550	4,57
Metot B*, S1	-	8,88	77,01	52,27	138,16	2000	6,91
Metot B, S2	-	-	44,47	28,07	72,54	9770	0,74
Metot B, S3	-	-	23,03	11,63	34,66	3100	1,12
Metot C*, S1	-	-	97,06	68,70	165,76	2500	6,63
Metot C, S2	-	-	126,57	86,50	213,07	3500	6,09
Metot C, S3	-	18,30	81,85	55,52	155,68	3500	4,45

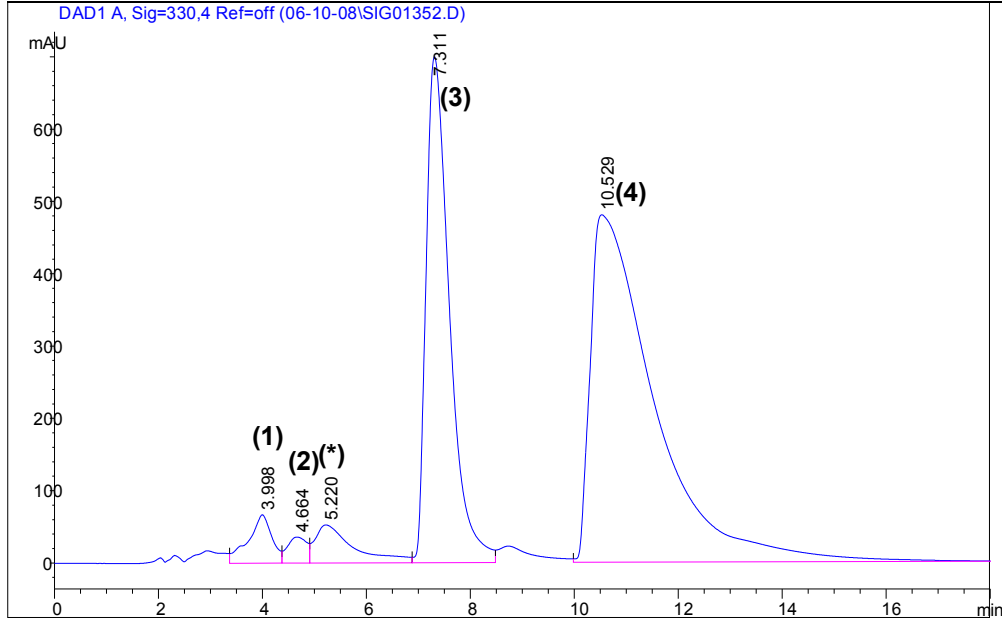
* Metot A: Çürütme, Metot B: Çözgen emdirme, Metot C: Soxhlet

Üzerlik tohumunda % 2-7 oranında alkaloit bulunması literatür araştırmasına göre bilinmektedir (OTT, 1996). Bu oran dikkate alındığında, Tablo 5-2’de verilen ekstraksiyon yöntemlerinin çoğu verimlilik açısından yeterli bulunmuştur. Ekstraksiyon parametreleri arasından pH’nın verimliliğe etkisi Metot A’da incelenmiştir. Buna göre Tablo 5-1 ve 5-2’den de anlaşılacağı gibi çözelti pH’sının 10,0 ve daha yüksek değerlerinde ekstraksiyon verimi artmıştır. Optimum pH değeri bu sonuçlara göre 10,0 olarak belirlenmiştir.

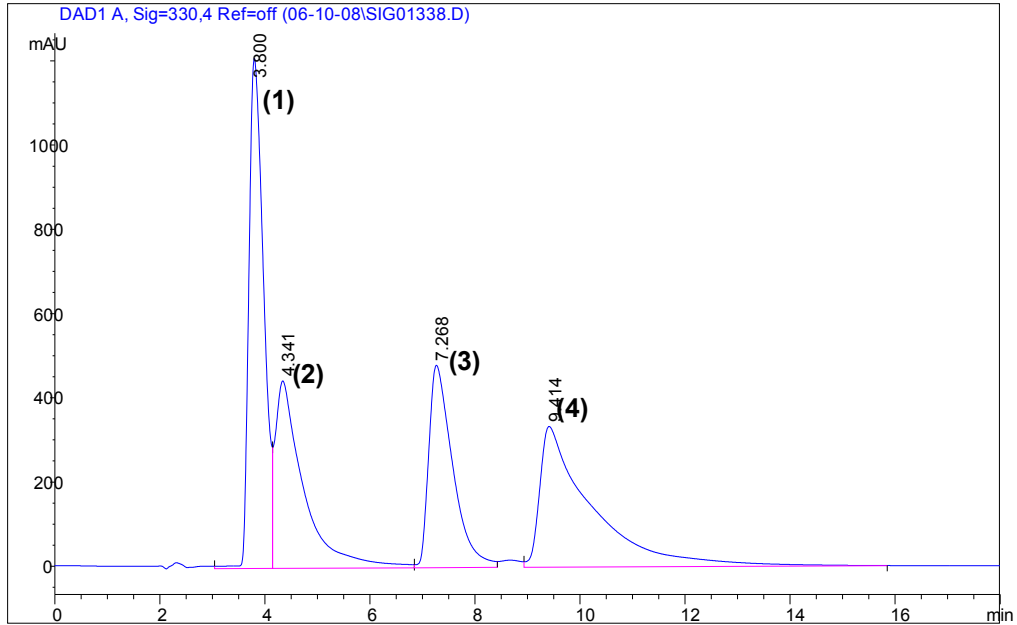
Çözgen tipinin etkisini görmek amacıyla geliştirilen Metot B için elde edilen sonuçlar metanolün alkaloit ekstraksiyonu için en uygun çözgen olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çözgen olarak metanol kullanılan S1 sistemi ile en yüksek verimlilik elde edilmiştir.

Ekstraksiyon süresinin verimliliğe olan etkisini incelemek amacıyla Soxhlet aparatı kullanılmış (Metot C) ve süre artışının özütlerin verimini düşürdüğü bulunmuştur. Tablo 5-1 ve 5-2’den görüldüğü gibi Metot C-S1 ve Metot B-S1 ile elde edilen verim değerleri birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu iki metot arasından Metot C-S1 ile daha kısa sürede istenilen oranda verime ulaşılmasından dolayı optimum alkaloit ekstraksiyonu metodu olarak

belirlenmiştir. Optimum alkaloit ekstraksiyonu metodu uygulanarak elde edilmiş özütün ve alkaloitleri karışım halindeyken karakterize etmek amacıyla hazırlanan standartların karışımının örnek kromatogramları sırasıyla Şekil 5-1 ve 5-2’de verilmiştir.



Şekil 5-1. Üzerlik tohumundan elde edilen özütün örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon)



Şekil 5-2. Alkaloit standartlarının karışımının örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi: 1ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon)

Şekil 5-2'deki alkaloit standartlarının karışımı için yapılan analiz sonucu elde edilen YPSK kromatogramına göre, alkaloitlerin polar olmayan kolon üzerindeki alıkonma zamanları sırasıyla Harmol için 3.8 dak., Harmalol için 4.3 dak., Harmin ve Harmalin için 7.3 dak. ve 9.4 dak. olarak belirlenmiştir. Buna göre, üzerlik otu tohumu özütünde bulunan alkaloitler alıkonma zamanlarına göre karakterize edilmişlerdir (Şekil 5-1). Polar mobil faz karışımı ile gerçekleştirilen elusyon yüksek polaritedeki alkaloitlerin kolondan daha kısa sürede çıkmalarını sağlamaktadır.

Özüt ve standartların karışımı için verilen bu kromatogramlara göre, özüt içerisindeki alkaloitlere ait alıkonma zamanlarında bir kayma olduğu görülmüştür. Kolon üzerindeki alıkonma zamanlarında görülen kaymanın, ekstraksiyon işlemi sırasında bitki materyalinden elde edilen diğer bileşiklerden, bunların miktarlarından ve moleküller arası etkileşmeden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Özüt için verilen örnek kromatogramdan (Şekil 5-1) görüldüğü gibi, üzerlik otu tohumunda baskın olarak harmin ve harmalin alkaloitleri bulunmuş ve miktarları Tablo 5-2'de verilmiştir. Bunun yanında, Soxhlet yöntemi ile elde edilen özütün harmol ve harmalol içeriği, alkaloit standartları ile belirlenmiş dedeksiyon limitlerinin altında kaldığından dolayı miktar olarak hesaplanamamıştır. Standart alkaloitlerin kalibrasyon konsantrasyonları ile belirlenen dedeksiyon ve kantifikasyon limitleri ise Tablo 5-3'te koyu rakamlar ile verilmiştir.

Tablo 5-3. Alkaloitlerin kalibrasyon için kullanılan konsantrasyon aralıkları

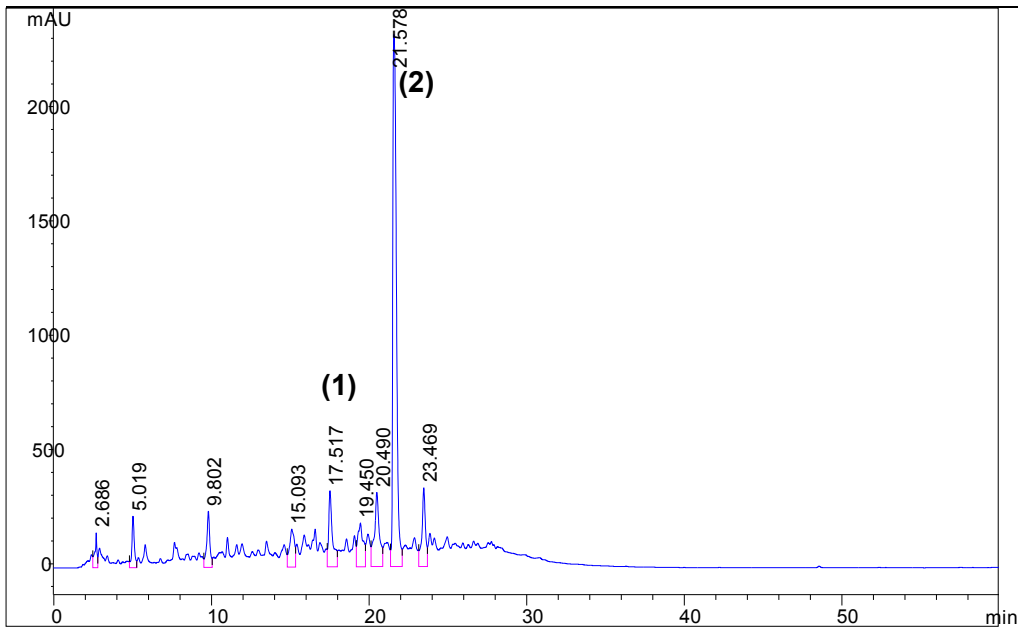
Alkaloit Tipi	Harmol (1)	Harmalol (2)	Harmin (3)	Harmalin (4)
Konsantrasyon aralığı (µg/ml)	1050	1270	983	1180
	525	635	492	590
	210	254	196	236
	105	127	98	118
	42	51	39	47

Ayrıca, Şekil 5-1'de verilen özütün kromatogramı üzerinde dört ana alkaloit dışında bir madde tespit edilmiştir. (*) olarak işaretlenmiş bu pikin harmol ya da harmalol alkaloitlerinin değişik formları olduğu düşünülmektedir. Özüt içerisindeki ana alkaloitler kadar baskın olmadığından dolayı karakterize edilmemiştir.

5.1.2. Zeytin (*O. europaea*) Yaprağından Özüt Eldesi ve Karakterizasyonu

Yöntemler bölümünde de verildiği gibi, zeytin yaprağından özüt elde etme işlemi literatürdeki optimum koşullara göre gerçekleştirilmiştir (ALTIOK, 2008; BAYÇIN, 2007). Bir takım ön işlemler sonunda toz haline getirilmiş yapraklar katı/sıvı oranı 1/20 olacak şekilde 70 % sulu etanol çözeltisi içerisinde 2 saat süreyle 250 devir ve 30 °C’de ekstre edilmiştir.

Elde edilen özütün oleuropein ve rutin zengin olduğu bilgisine dayanarak alkaloidler için uygulandığı gibi YPSK ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Özüt içerisindeki 2 ana polifenol olan oleuropein ve rutin miktarları standartlarının kalibrasyonları ile belirlenmiştir. Oleuropein ve rutin standartları için elde edilen kalibrasyon eğrileri EK-B’de örnek hesaplamaları ile birlikte verilmiştir. Şekil 5-3’te zeytin yaprağından elde edilen özütün örnek kromatogramı gösterilmektedir.



Şekil 5-3. Zeytin yaprağı özütünün örnek kromatogramı (1) rutin, (2) oleuropein (Mobil faz akış debisi: 1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon)

Kromatogramdan da görüldüğü gibi, oleuropein zeytin yaprağı özütü içerisindeki en baskın polifenol olarak bulunmuştur. Polifenollerin polariteleri baz alındığında rutin oleuropeinden daha polar olduğu görülmüş ve kolon üzerindeki alıkonma zamanları 17,5. ve 21,6. dakikalar olarak belirlenmiştir. Kantitatif olarak baskın olmayan diğer pikler ise

ALTIOK, 2008' un çalışmasında luteolin-7-glukozit, verbaskozit, apigenin-7-glukozit ve luteolin gibi glukozit ve glukozit türevi polifenoller olarak belirlenmiştir.

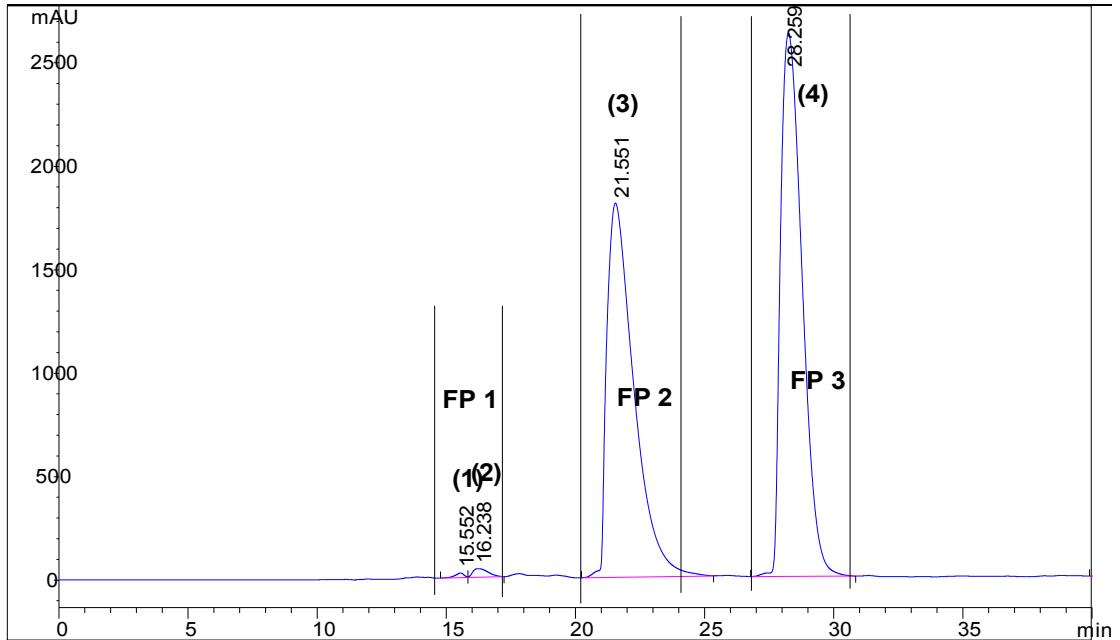
Ayrıca, oleuropein ve rutin standartları için elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre zeytin yaprağı özütü içerisindeki miktarları sırasıyla % 9,0 ve 0,9 olarak bulunmuştur.

5.2. ÖZÜTLERİN FRAKSİYONLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Optimum koşullarda ekstraksiyonları gerçekleştirilen alkaloidler ve polifenoliklerce zengin özütler için uygulanan fraksiyonlama teknikleri yöntemler bölümünde verilmiştir.

5.2.1. Üzerlik Tohumu Özütünün Fraksiyonlanması ve Karakterizasyonu

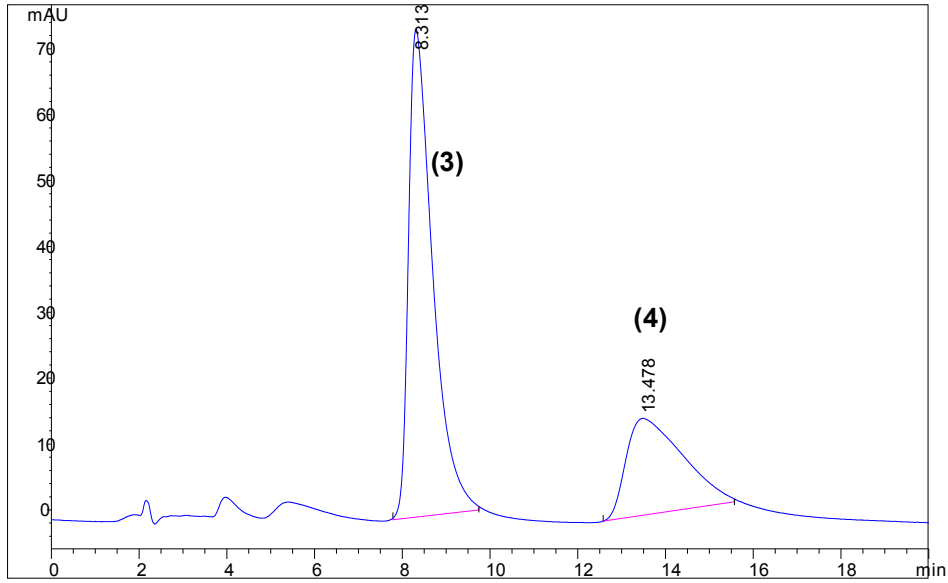
Soxhlet ekstraksiyonu metodu (70 °C, 7,5 saat) ile elde edilen üzerlik otu tohumu alkaloidleri yöntemler bölümünde de verildiği gibi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile üç ayrı fraksiyon olarak toplanmıştır. YPSK-semipreparatif kolon sistemine bağlı Gilson marka fraksiyonlama ünitesi ile toplanan fraksiyonlar yine YPSK-analitik kolon ile karakterize edilmiştir. YPSK-semipreparatif kolon koşullarında gerçekleştirilen üzerlik otu tohumu özütünün kromatogramı Şekil 5-4'te verilmiştir.



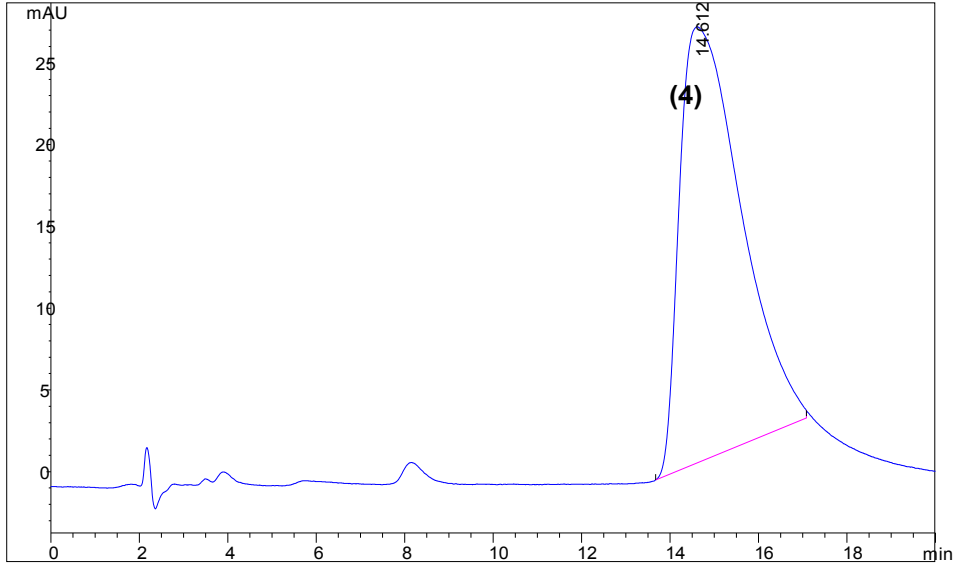
Şekil 5-4. Üzerlik tohumu özütünün fraksiyonlama öncesine ait örnek kromatogramı (1) harmol, (2) harmalol, (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi:1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, semipreparatif kolon)

Üzerlik tohumu özütünün semipreparatif kolon ile yapılan YPSK analizine göre alkaloidlere ait alıkonma zamanları harmol için 15.6 dak., harmalol için 16.2 dak., harmin ve Harmalin için ise sırasıyla 21.6 dak. ve 28.3 dak. olarak belirlenmiştir. Fraksiyonlama işlemi sırasında ham özüt, alkaloidlerin alıkonma zamanları ve özüt içerisindeki yoğunluklarına göre 3 kısma ayrılmıştır. Şekil 5-4'teki kromatogram üzerinde gösterildiği gibi 14. ve 18. dakikalar arasında dedekte edilen 1 ve 2 nolu alkaloidler birinci *P. harmala* fraksiyonu (FP 1) olarak belirlenirken, harmin fraksiyonu (FP 2) 20. ve 24. dakika arasında YPSK sistemine bağlı Gilson marka fraksiyonlama ünitesi kullanılarak toplanmıştır. Harmalin fraksiyonu (FP 3) ise 27. ve 31. dakika arasında toplanarak elde edilmiştir.

Her bir fraksiyon içerisindeki bileşiklerin yoğunlukları YPSK-analitik kolon ile analiz edildikten sonra alkaloid standartları için elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre belirlenmiştir. Şekil 5-5 ve 5-6'da sırasıyla harmin ve harmalin fraksiyonlarının analitik kolon analizleri sonucunda elde edilen kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 5-5. Harmin fraksiyonunun (FP 2) örnek kromatogramı (3) harmin, (4) harmalin (Mobil faz akış debisi:1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon)



Şekil 5-6. Harmalin fraksiyonunun (FP 3) örnek kromatogramı (4) harmalin (Mobil faz akış debisi:1 ml/dak, kolon sıcaklığı 30 °C, analitik kolon)

Fraksiyonlara ait kromatogramlardan da görüldüğü gibi, ham özüt analizinde (Şekil 5-1) harmin ve harmalin alkaloidleri olarak belirlenen 3 ve 4 nolu alkaloidlerin fraksiyonlama sonrasında kolon üzerindeki alıkonma zamanlarında kayma görülmüştür. Buna göre harmin pikinin dedeksiyon zamanı 7.3. dakikadan 8.3. dakikaya, harmalin pikinin dedeksiyon zamanı ise 10.5. dakikadan 14. dakikaya kadar gecikme göstermiştir. Bu sonuç, saflıkları arttırılmış fraksiyonların polaritelerinin azaldığını göstermektedir.

Özüt içerisindeki baskın alkaloidler için elde edilen fraksiyonların saflıkları standartlarının kalibrasyonları kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 5-4'te verilmiştir.

Tablo 5-4. Üzerlik otu tohumundan elde edilen majör alkaloidlerin fraksiyonları için karakterizasyon sonuçları

Alkaloid Adı	Fraksiyon No.		Fraksiyonların Pik Yüzdesi (%)	
	FP 2	FP 3	FP 2	FP 3
Harmin piki	var	eser	77,0	6,1
Harmalin piki	var	var	22,5	93,2

Bunun dışında, harmol ve harmalol alkaloidlerinin bulunduğu FP 1 fraksiyonunun YPSK analizleri yapılmıştır. Ancak, elde edilen sonuçlara göre eser miktarda çok sayıda

harmala alkaloidi türevleri olduğu düşünölen pikler görölmüştür. Her bir alkaloit fraksiyonu enzim inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere yeterli miktarlarda toplanmış kurutulmuş ve uygun koşullarda saklanmıştır.

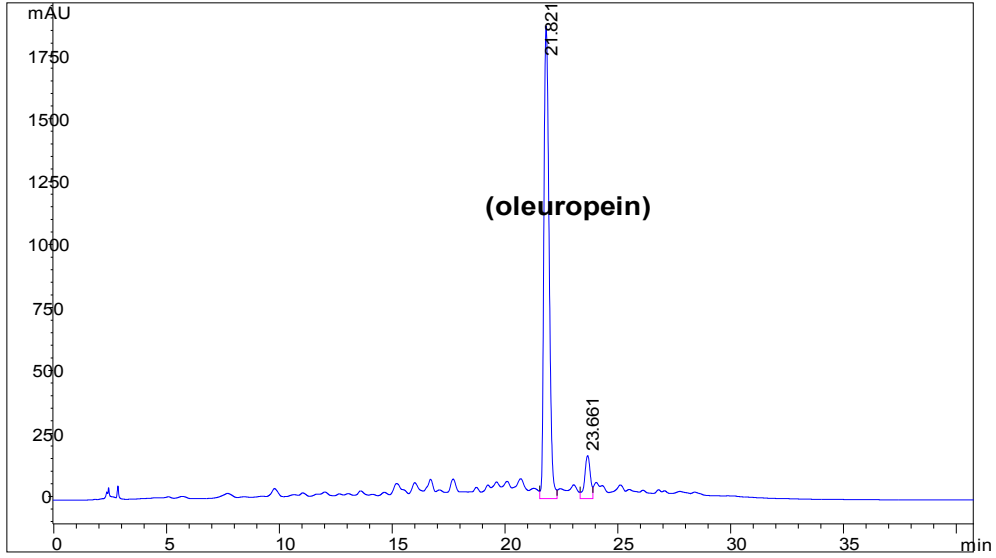
5.2.2. Zeytin Yaprığı Özütünün Fraksiyonlanması ve Karakterizasyonu

Zeytin yaprağında bulunan polifenollerin ekstraksiyonu, karakterizasyonu ve ipek dolgulu kolon kullanılarak yapılan fraksiyonlama işlemleri yöntemler bölümünde detayları ile verilen BAYÇIN, 2007 ve ALTIÖK, 2008'un çalışmaları baz alınarak yapılmıştır. Ham özütün kromatogramından da (Şekil 5-3) göröldüğü gibi, zeytin yaprağında baskın olarak oleuropein ve rutin polifenollerini görölmüştür. Bunlar dışında özüt içerisinde var olan bir çok glikozit türevi ALTIÖK, 2008'un çalışmasında karakterize edilmiştir. İpek dolgulu kolon kullanılarak gerçekleştirilen fraksiyonlama işleminde içerikleri Tablo 5-5'te verilen toplam 6 adet fraksiyon toplanmıştır.

Tablo 5-5. Zeytin yaprağı özütünün fraksiyonlarının içerikleri

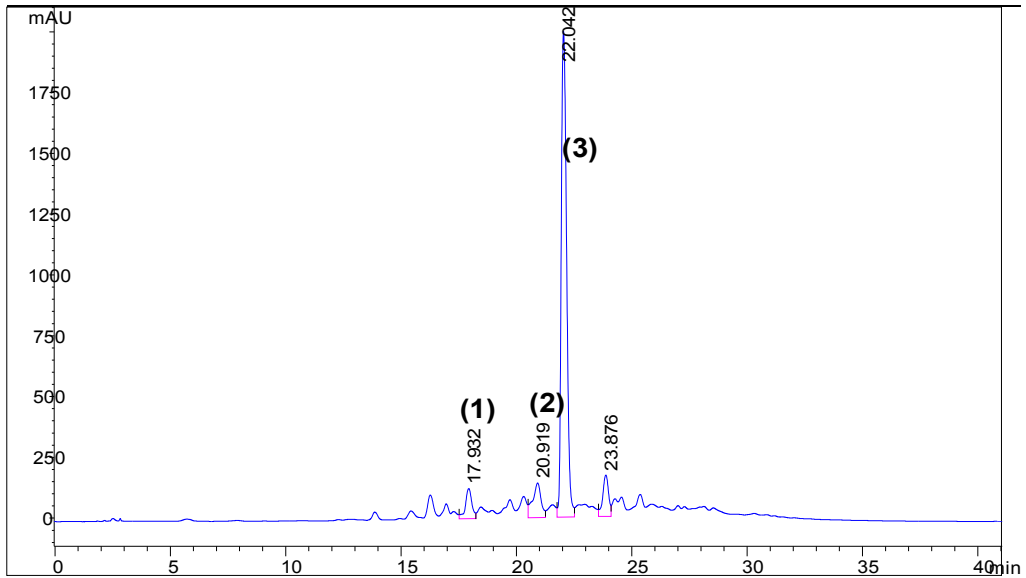
Fraksiyon No.	İçerik
FO 1	1. ve 2. su fraksiyonu
FO 2	3. ve 4. su fraksiyonu
FO 3	5. ve 6. su fraksiyonu
FO 4	7., 8. ve 9. su fraksiyonu
FO 5	1. ve 2. % 70 sulu etanol fraksiyonu
FO 6	3. ve 4. % 70 sulu etanol fraksiyonu

Zeytin yaprağı fraksiyonlarının kromatogramları Tablo 5-5'teki sıralarına göre Şekil 5-7'den Şekil 5-12'ye kadar verilmiştir. YPSK analizleri sonuçlarına göre su fraksiyonları oleuropeince zengin, sulu etanol fraksiyonları ise rutin ve glikozitlerce zengin fraksiyonlar olarak karakterize edilmiştir.



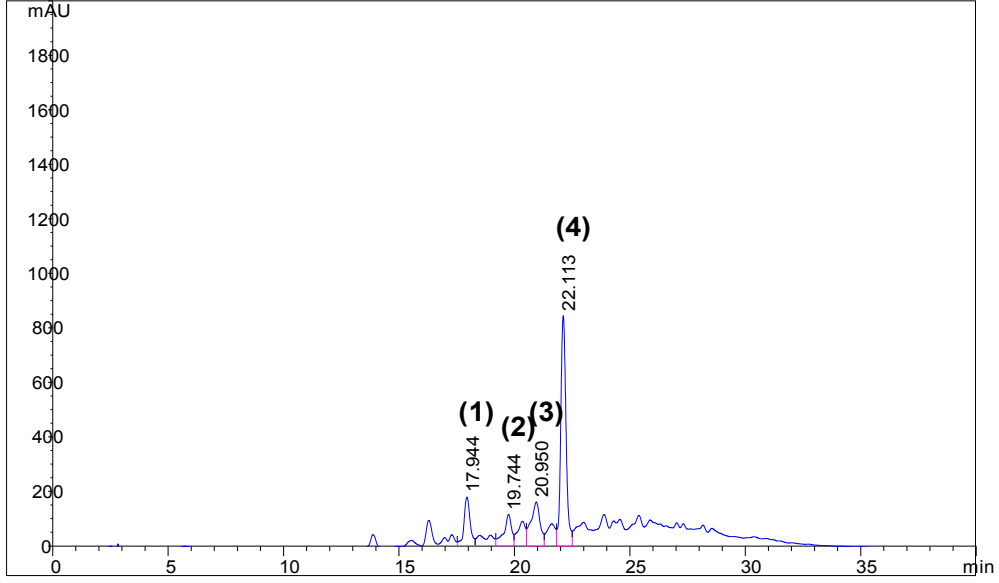
Şekil 5-7. FO 1 kodlu fraksiyonun kromatogramı

Kolon üzerindeki alıkonma zamanı 21.6. dakika olarak belirlenen oleuropeinin ilk 2 su fraksiyonu (FO 1) içerisindeki saflığı % 91.0 olarak hesaplanmıştır.

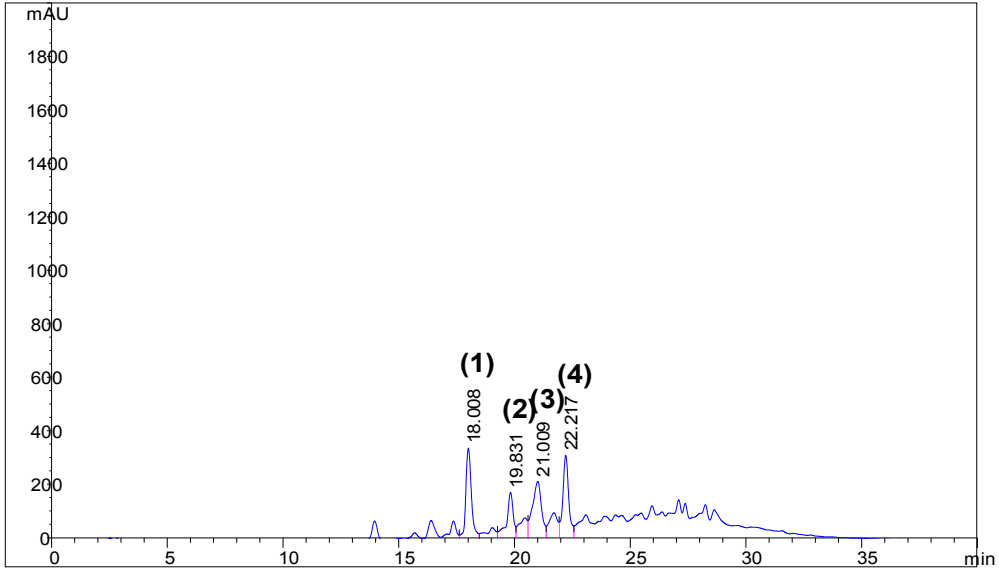


Şekil 5-8. FO 2 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) verbaskozit, (3) oleuropein

İpek kolonun su ile yıkanmaya devam edilmesi sonucunda zeytin yaprağı fraksiyonunun oleuropein yüzdesi azalmış ve az miktarlarda rutin ve verbaskozit gibi polifenoller görülmüştür.

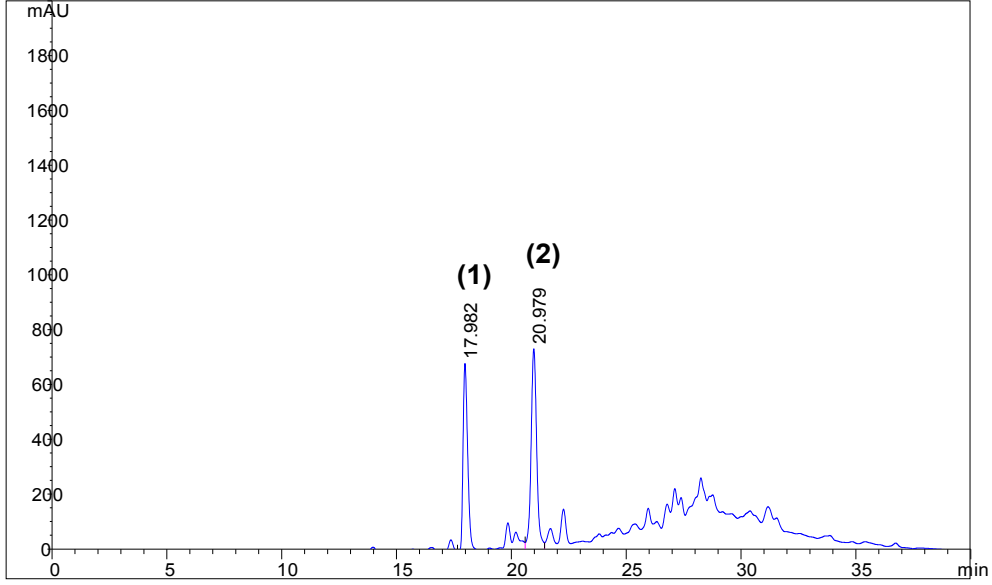


Şekil 5-9. FO 3 kodlu fraksiyonun kromatogramı
 (1) rutin, (2) luteolin-7-glikozit, (3) verbaskozit, (4) oleuropein

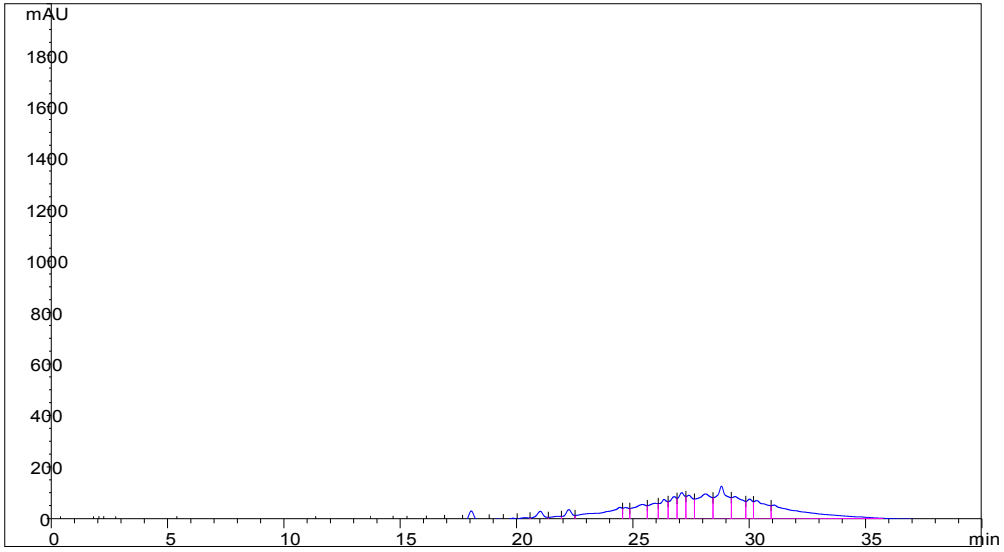


Şekil 5-10. FO 4 kodlu fraksiyonun kromatogramı
 (1) rutin, (2) luteolin-7-glikozit, (3) verbaskozit, (4) oleuropein

Şekil 5-9 ve 5-10'da verilen su fraksiyonlarına ait kromatogramlardan da görüldüğü gibi, elusyonun su ile yapılmaya devam edilmesi sonucunda fraksiyonlar içerisindeki oleuropein yaklaşık % 25'lere kadar düşmüştür. Bu seviyeden sonra sulu etanol ile yapılan elusyonların ise rutin ve glikozitlerce zengin olduğu görülmüş ve bunlara ait kromatogramlar Şekil 5-11 ve 5-12'de verilmiştir.



Şekil 5-11. FO 5 kodlu fraksiyonun kromatogramı (1) rutin, (2) verbaskozit



Şekil 5-12. FO 6 kodlu fraksiyonun kromatogramı
(polariteleri düşük diğer glikozit formları)

Sulu etanol elusyonu ile elde edilen FO 5 ve FO 6 kodlu fraksiyonların oleuropein içerikleri dedeksiyon limitlerinin altında kalmıştır. Buna karşın, FO 5 ve FO 6 kodlu fraksiyonlar rutin ve glikozitlerce zengin fraksiyonlar olarak karakterize edilmiştir. Özet olarak, zeytin yaprağı özütünden elde edilen fraksiyonların oleuropein içerikleri kalibrasyon eğrilerine göre yüzde olarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 5-6'da verilmiştir.

Table 5-6. Zeytin yaprağı fraksiyonlarının oleuropein içerikleri

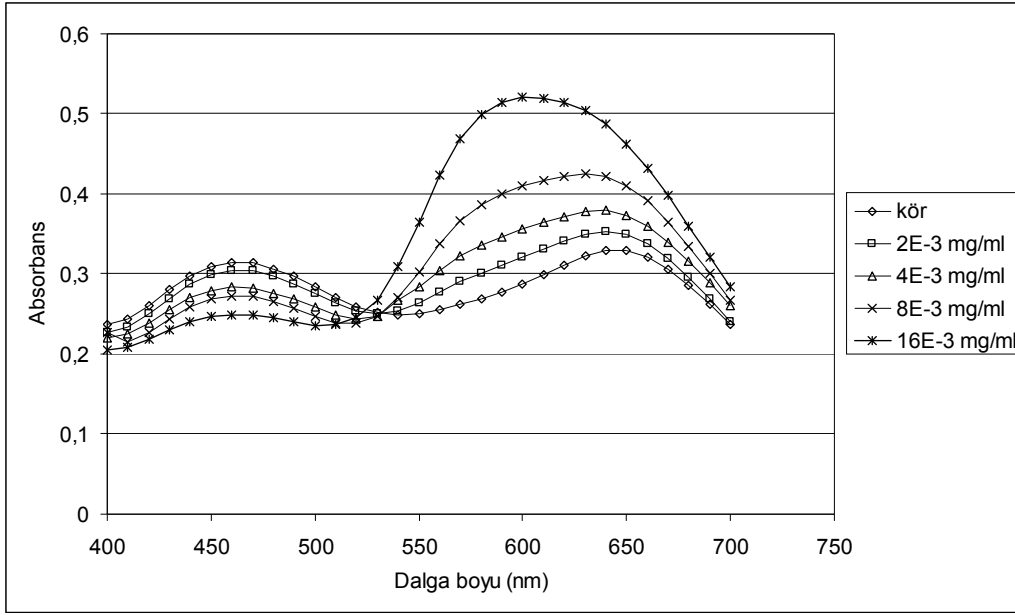
Fraksiyon No.	Zaman (dak.)	Pik Alanı Yüzdesi (%)
FO 1	21.8	90.95
FO 2	22.0	78.15
FO 3	22.1	54.70
FO 4	22.2	26.86
FO 5	oleuropein piki yok	-
FO 6	oleuropein piki yok	-

Buna göre, zeytin yaprağı özütü içerisindeki en baskın polifenol olan oleuropeinin ipek dolgulu kolon kullanılarak % 90 saflıklara çıkartılabildiği görülmüştür. Oleuropein cinsinden fraksiyonlama verimi su elusyonuna devam edildiği müddetçe azalmıştır. Elusyon çözgeni olarak sulu etanol kullanıldığında ise kolona daha sıkı adsorbe olan rutin ve glikozitlerce zengin fraksiyonlar elde edilmiştir. Zeytin yaprağı fraksiyonları arasından FO 1 ve FO 5 kodlu oleuropeince ve rutince zengin fraksiyonlar enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere yeterli miktarda elde edilmiş ve uygun koşullarda saklanmıştır.

5.3. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

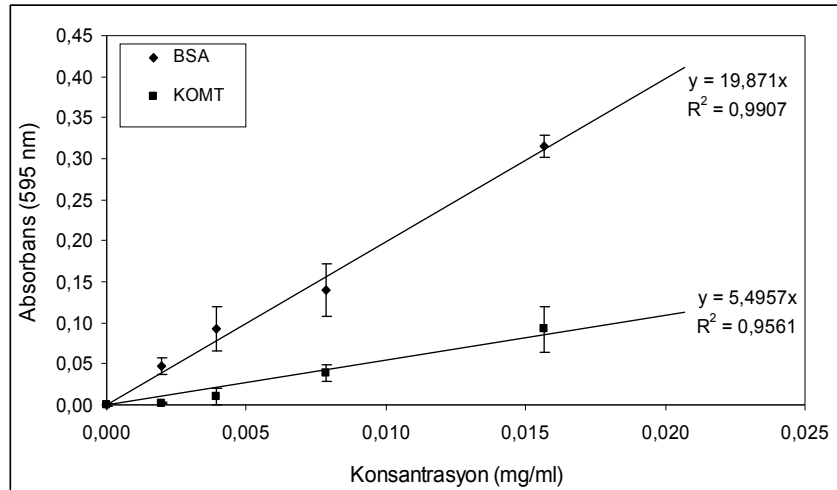
Bradford metodu olarak bilinen enzim protein miktarı belirleme metodunda daha önce bahsedildiği gibi Bovin Serum Albumin (BSA) referans protein ve Commassie mavisini asidik boyar madde olarak kullanılmıştır. Protein miktarındaki artışın absorbans üzerindeki etkisini görmek ve optimum dalga boyunu belirlemek amacıyla elde edilen spectral taramanın sonucu şekil 5-13'te verilmiştir. Bu tarama sonucunda, proteine bağlanmamış Commassie mavisinin (kör) maksimum absorbansı literatürde de verildiği gibi 465 nm dalga boyu olarak bulunmuştur (ROSENBERG, 1996). Aynı miktarda boyar madde içeren çözeltilere farklı konsantrasyonlardaki BSA'nın eklenmesi ile maksimum absorbans değerini 465 nm'den 595 nm'ye kayma göstermiştir.

Aynı zamanda, protein konsantrasyonundaki artış 400-525 nm arasında absorbans ile ters orantılı olarak değerirken, 525-700 nm arasında absorbans değerinin de artmasına neden olmuştur. Bradford yönteminin karakteristik özelliği sayılan bu sonuçta literatür ile uyum göstermiştir (ROSENBERG, 1996).



Şekil 5-13. Farklı BSA konsantrasyonu için spektral tarama

Bu çalışmanın enzim kaynağı olarak kullanılan domuz ciğerinden izole edilmiş KOMT enziminin protein miktarının belirlenmesi amacıyla optimum dalga boyu olarak bulunan 595 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. 0-16 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan BSA ve KOMT çözeltilerinin 595 nm'deki absorbans değerleri ile Şekil 5-14'te verilen kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur.



Şekil 5-14. Proteinler için elde edilen kalibrasyon eğrileri

Kalibrasyon eğrilerinin eğimleri oranlandığında KOMT enziminin aktif protein miktarı BSA referans proteinine göre % 27,7 olarak belirlenmiştir.

5.4. KOMT ENZİM AKTİVİTESİ VE İNHİBİSYON KİNETİĞİ BELİRLENMESİ

5.4.1. Spektrofotometrik Metot ile Aktivite Tayini

KOMT enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak tayin edildiği protokole göre metillenme reaksiyonunda;



oluşan *O*-metillenmiş ürünlerin 344 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Reaksiyon bir saat süreyle 7.6 pH'da ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Toplam 500 µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyonda DHAP son konsantrasyonu 0.1 mM'da sabit tutulurken değişen SAM konsantrasyonları Tablo 5-7'de verilmiştir. 150 ünitelik KOMT standart enziminin reaksiyon ortamındaki son konsantrasyon değeri ise 0.51 mg katı madde/ml'de sabit tutulmuştur. Bir saat sonunda 500 µl sodyum borat eklenerek durdurulan reaksiyonun test ve kör çözeltilerinin 344 nm'deki absorbans değerleri de yine Tablo 5-7'de verilmiştir.

Tablo 5-7. Spektrofotometrik Metot için Reaksiyon Ortamı

Reaksiyon No.	SAM Konsantrasyonu (mM)	Absorbans (344 nm)
Kör*	-	0.481
Test 1	0.800	0.512
Test 2	0.160	0.498
Test 3	0.080	0.492
Test 4	0.053	0.490
Test 5	0.040	0.488

* Protokole göre kör çözelti absorbans değeri 0.3-0.5 arasında olmalıdır.

Enzim aktivitesi, uygulanan protokolde belirtilen matematiksel eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Birim / ml} = \frac{(A_{\text{test}} - A_{\text{kör}})(126.2)(\text{seyreltmefaktörü})}{0.1}$$

$$\text{Birim / mgprotein} = \frac{\text{Birim / ml}}{\text{mgprotein / ml}}$$

126.2 =1 ml reaksiyon hacmindeki dönüşüm faktörü ve 0.1 = reaksiyon ortamına eklenen enzim hacmi (ml) olarak alınmıştır.

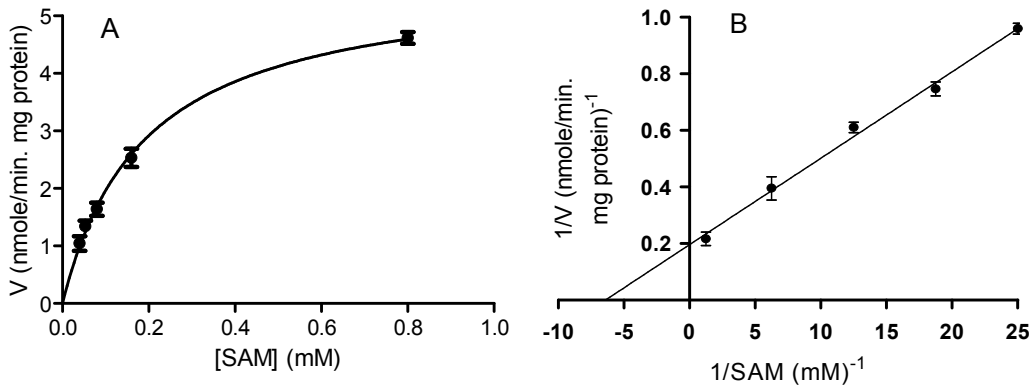
Buna göre, test çözeltileri için elde edilen mg protein başına enzim aktivitesi (1 birim = 1 nmol *O*-metillenmiş ürünlerin 1 dakikadaki oluşum hızı) değerleri Tablo 5-8'de verilmiştir.

Tablo 5-8. Enzim Aktivite değerleri (spektrofotometrik)

Reaksiyon No.	Birim/ml	Birim/mg protein	Birim/mg katı*	v (nmol/mg protein.dak.)	$1/v$ (nmol/mg protein.dak.) ⁻¹
Kör	0	0	0	0	-
Test 1	195.61	276.93	76.70	4.62 ± 0.10	0.22 ± 0.02
Test 2	107.27	151.86	42.06	2.53 ± 0.16	0.39 ± 0.04
Test 3	69.41	98.26	27.21	1.64 ± 0.11	0.61 ± 0.01
Test 4	56.79	80.39	22.27	1.34 ± 0.10	0.75 ± 0.02
Test 5	44.17	62.53	17.32	1.04 ± 0.13	0.96 ± 0.01

* 1 mg katı maddenin %27,7'si protein olarak alınmıştır (bkz. Bradford metodu)

Tablo 5-8'deki reaksiyon hızı (v) ve reaksiyon hızının tersi ($1/v$) verileri, 4.2.6. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyon Kinetiği Veri Analizi bölümünde açıklandığı gibi GraphPad Prism 5.0 programı ile doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon analizleri ile açıklanmıştır. Buna göre elde edilen Michaelis ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 5-15'te verilmiştir.



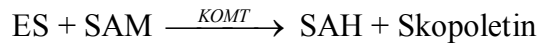
Şekil 5-15. Spektrofotometrik metot ile inhibitörsüz ortamda
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

İnhibitörsüz ortamda gerçekleştirilen bu reaksiyon için V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 5.69 ± 0.15 nmol/dak. mg protein ve 0.19 ± 0.01 mM olarak hesaplanmıştır. Spektrofotometrik metotta harcanılan enzim ve substrat miktarlarının çok olması, protokolün optik küvette gerçekleştirilen reaksiyonlar için oluşturulmuş ve dolayısıyla zaman kaybı yaratmasından dolayı inhibisyon deneyleri sadece mikropalakalar kullanılarak florometrik metot ile gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik yöntem ile KOMT aktivitesi tayini için oluşturulan bu protokolün ticari bir protokol olması nedeni ile elde edilen sonuçlar için literatür ile karşılaştırma olanağı bulunamamıştır. Ancak, bu çalışmanın yapılması ile KOMT enzimi için yapılan aktif protein tayininin doğruluğu, kullanılabilirliği ve aynı zamanda standart olarak satın alınan KOMT enziminin aktivitesi test edilmiştir.

5.4.2. Florometrik Metot ile Aktivite ve İnhibisyon Kinetiği Tayini

Florometrik yöntem ile takip edilen enzimatik reaksiyonlardan elde edilen sonuçların absorpsiyona göre daha hassas olduğu ve daha az interferans görüldüğü bilinmektedir (COPELAND, 2000). Bu nedenle, KOMT aktivitesi ve inhibisyon deneylerinde uygulanan protokol, literatürdeki florometrik yöntemin baz alındığı KOMT enzimi çalışmalarından esinlenilerek oluşturulmuştur (KURKELA, 2004; VESER, 1987).

Bu metotta, 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirilen *O*-metillenme reaksiyonu ile eskuletinin (ES) skopoletine dönüşme miktarı 355 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında florometrik olarak ölçülmüştür.



37 °C'de ve pH 7.4'te gerçekleştirilen aktivite ve inhibisyon deneylerindeki reaksiyonların toplam hacimleri sırasıyla 200 µl ve 250 µl olarak belirlenmiştir.

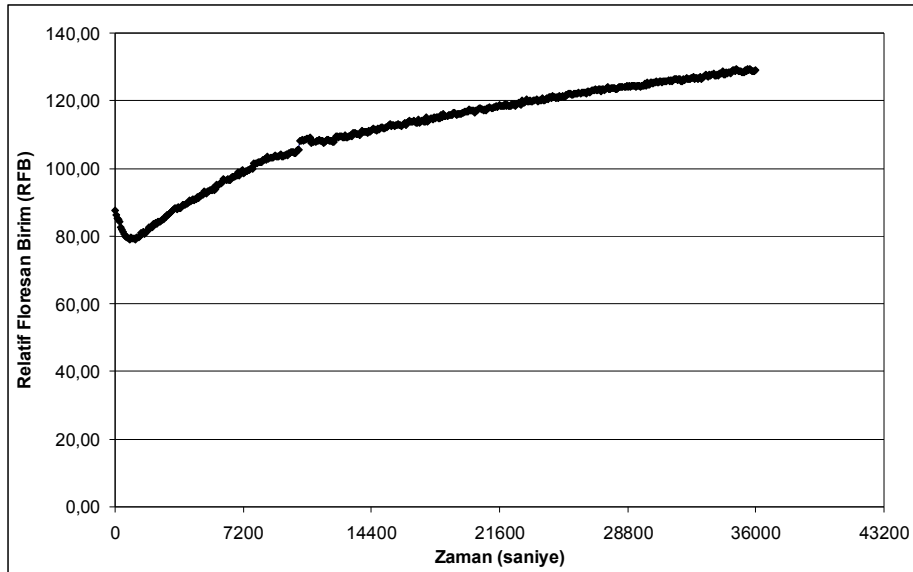
5.4.2.1. Florometrik Metot ile Aktivite Tayini

Florometrik yöntem ile aktivite tayini çalışmasında ilk olarak, farklı enzim ve substrat konsantrasyonları için doğrusal çalışma aralığı bulunmuştur. KOMT tarafından katalizlenen bu reaksiyonda enzim ve substratların konsantrasyon değişimleri Tablo 5-9'da verilmiştir.

Tablo 5-9. Enzim ve Substratların konsantrasyon değişimleri

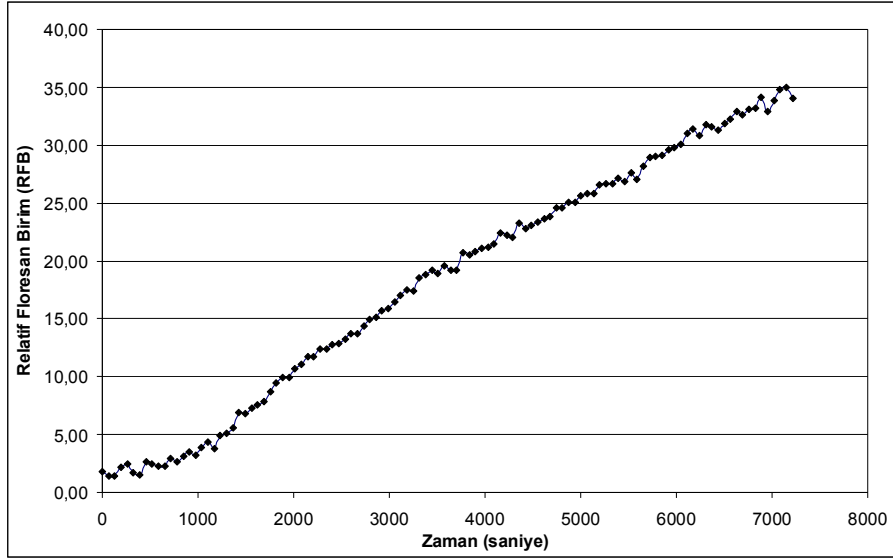
Enzim konsantrasyonları ($\mu\text{g protein/ml}$)			
E1	16.5		
E2	11.0		
E3	8.5		
SAM konsantrasyonları (μM)		Eskuletin konsantrasyonları (μM)	
SAM 1	10	ES1	2
SAM 2	50	ES2	3
SAM 3	100	ES3	4
SAM 4	200	ES4	5
SAM 5	300	ES5	7
SAM 6	500	ES6	10
SAM 7	600		

Toplam reaksiyon süresi yaklaşık 6-8 saat olduğu bilinen bu reaksiyon da aktivite tayini belirli zaman aralığında durağan bölgedeki iki noktanın floresan değeri farkı alınarak belirlenmiştir. Reaksiyonun durağan fazının kesin olarak belirlenebilmesi için 10 saat süreyle zamana bağlı floresan ölçümleri alınmış ve E1-ES3-SAM1 konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonun kinetik verileri Şekil 5-16'da örnek olarak verilmiştir.



Şekil 5-16. E1-ES3-SAM1 konsantrasyonlarındaki ürün oluşma kinetiği (10 saat)

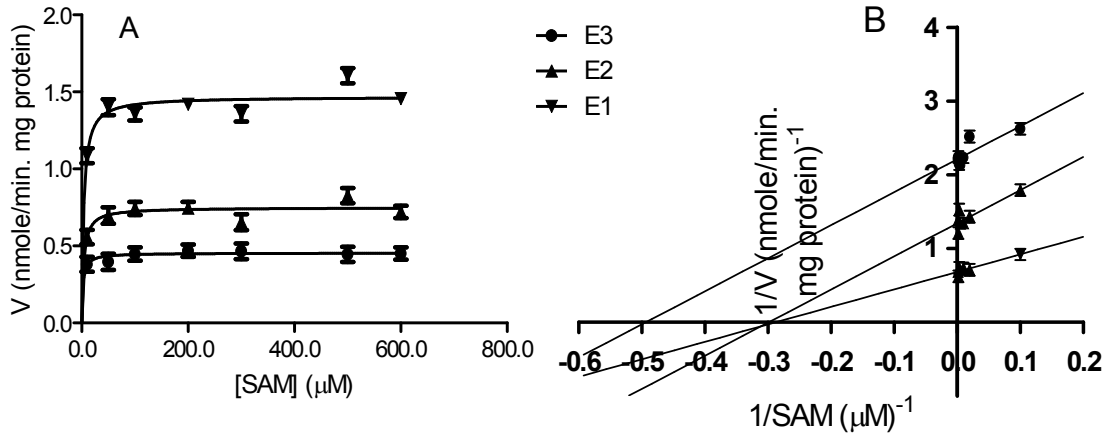
Şekil 5-16’da verilen geniş zaman ölçeğindeki kinetik veriler baz alındığında KOMT tarafından katalizlenen reaksiyonlar için ilk iki saatlik floresan değişimi ölçülmesi yeterli bulunmuştur. Ayrıca, ilk 20 dakika boyunca görülen floresan azalışı reaksiyonun karakteristik bir özelliği olup aktivite tayini için kullanılacak kinetik ölçümler bu süreden sonraki ilk 30 dakikalık değerlerden oluşturulmuştur. Bu amaçla, aynı reaksiyon koşulları için elde edilen toplam iki saatlik floresan ölçümleri Şekil 5-17’de verilmiştir.



Şekil 5-17. E1-ES3-SAM1 konsantrasyonlarındaki ürün oluşma kinetiği (2 saat)

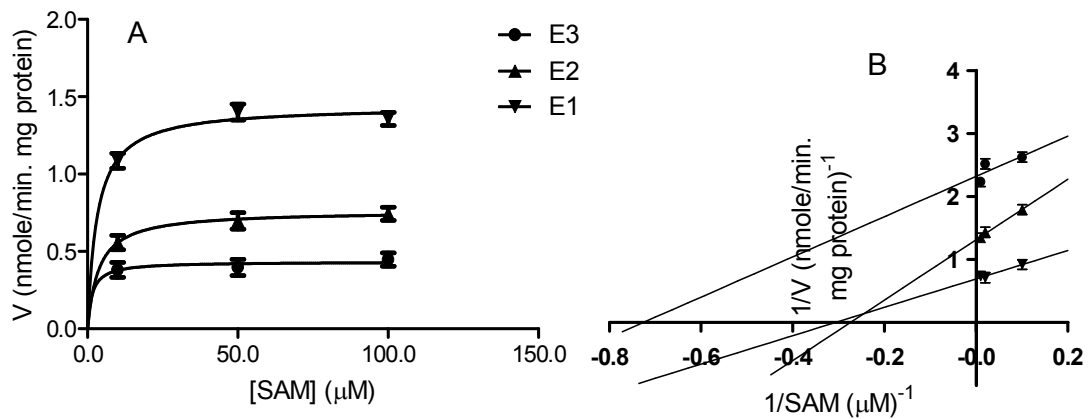
Şekil 5-17’de örnek olarak gösterilen reaksiyon sonucu elde edilen kinetik data grafiği gibi, Tablo 5-9’da verilen bütün konsantrasyon değerleri için kinetik data grafikleri oluşturulmuştur. Her biri için elde edilen ölçümler sonucunda 1500. saniyeden sonraki ilk 30 dakikalık bölgenin durağan fazın ilk doğrusal bölgesi olduğu tespit edilmiştir. Bu iki nokta arasındaki floresan değişimi farkı, enzim aktivitesi verisine dönüştürülmüştür. Skopoletin standardı için oluşturulan kalibrasyon sonucuna göre belirlenen enzim aktiviteleri için örnek hesaplamalar EK-C Skopoletine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Örnek Hesaplama bölümünde verilmiştir.

Buna göre, enzim-substrat ilişkisini ortaya koymak amacıyla yapılan ve reaksiyon hızının SAM ve ES substratlarına göre değişiminin incelendiği çalışmaların sonuçları sırasıyla Şekil 5-18 ve Şekil 5-19’da verilmiştir.



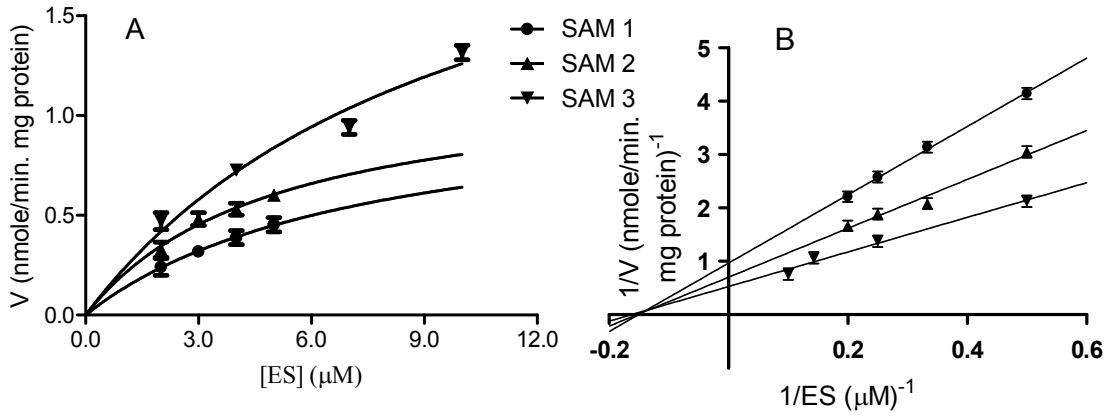
Şekil 5-18. Reaksiyon hızının SAM'a göre değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri (eskuletin konsantrasyonu 4 μM 'da sabit tutulmuştur).

Şekil 5-18'den görüldüğü gibi enzim konsantrasyonundaki artış reaksiyon hızını da arttırmıştır. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda kullanılan SAM'ın bu reaksiyon için inhibitör etki yarattığı bilinmektedir (YASSİN, 1998; VESER, 1987). Bu nedenle, en düşük enzim konsantrasyonunda E3 (8.5 μg protein/ml) gerçekleştirilen reaksiyonun hız verilerinin doğrusallıktan saptığı görülmüştür (Şekil 5-18B). Substrat inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülen bu sapma, E2 ve E1 konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlar için de görülmüştür. Ancak, 100 μM SAM konsantrasyonuna kadar E2 ve E1 konsantrasyonlarında elde edilen hız verileri Şekil 5-19'da da verildiği gibi doğrusallıktan sapmamıştır.



Şekil 5-19. Reaksiyon hızının 100 μM SAM konsantrasyonuna kadar değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri (eskuletin konsantrasyonu 4 μM 'da sabit tutulmuştur).

Enzim kaynağının daha ekonomik kullanılabileceği ve doğrusal bölgede çalışma imkanı bulunan E2 konsantrasyonu, çalışmalarda kullanılacak sabit enzim konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, sabit E2 konsantrasyonunda ve 100 μM 'a kadar değiştirilen SAM konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonların elde edilen hız verileri ile substratların birbiri üzerindeki ilişkileri açıklanabilmektedir. Buna göre, reaksiyon hızının ES'e göre değişimi Şekil 5-20'de verilmiştir.



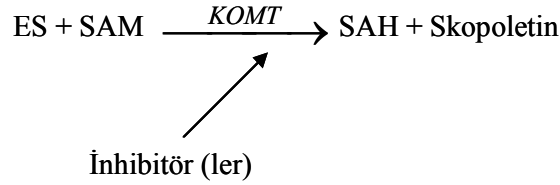
Şekil 5-20. Reaksiyon hızının ES'e göre değişimini gösteren A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri (enzim konsantrasyonu 11.0 μg protein/ml (E2)'de sabit tutulmuştur).

SAM konsantrasyonu arttıkça artan reaksiyon hızının eskuletin substratı için belirlenen konsantrasyon aralığında doğrusallıktan sapmadığı görülmüştür. Enzim-substrat ilişkisini ortaya koymak amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda SAM ve ES için K_m değerleri sırasıyla $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ve $6.4 \pm 0.4 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. VESER, 1987'in çalışmasında eskuletin için bulunan K_m değeri $6.2 \mu\text{M}$ olarak raporlanmıştır. Farklı çalışmalarda SAM için bulunan K_m değerleri ise kullanılan KOMT enzimi kaynağına ve doğrusal konsantrasyon aralıklarına göre farklılık göstermiştir.

Florometrik yöntem ile yapılan aktivite testleri sonuçlarına dayanılarak, inhibisyon çalışmalarında eskuletin konsantrasyonu $4 \mu\text{M}$, enzim konsantrasyonu ise $11 \mu\text{g}$ protein/ml'de sabit tutulmuştur. Reaksiyon hız belirleyici substratı olan SAM konsantrasyonu ise $10\text{-}300 \mu\text{M}$ aralığında değiştirilmiştir.

5.4.2.2. Florometrik Metot ile İnhibisyon Çalışması

Aktivite tayininde de açıklandığı gibi, florometrik metot baz alınarak gerçekleştirilen inhibisyon çalışmalarında, KOMT tarafından katalizlenen reaksiyonunun hızı, bitkisel kaynaklı alkaloidler, polifenoller ve bunların standartları kullanılarak düşürülmeye çalışılmıştır.

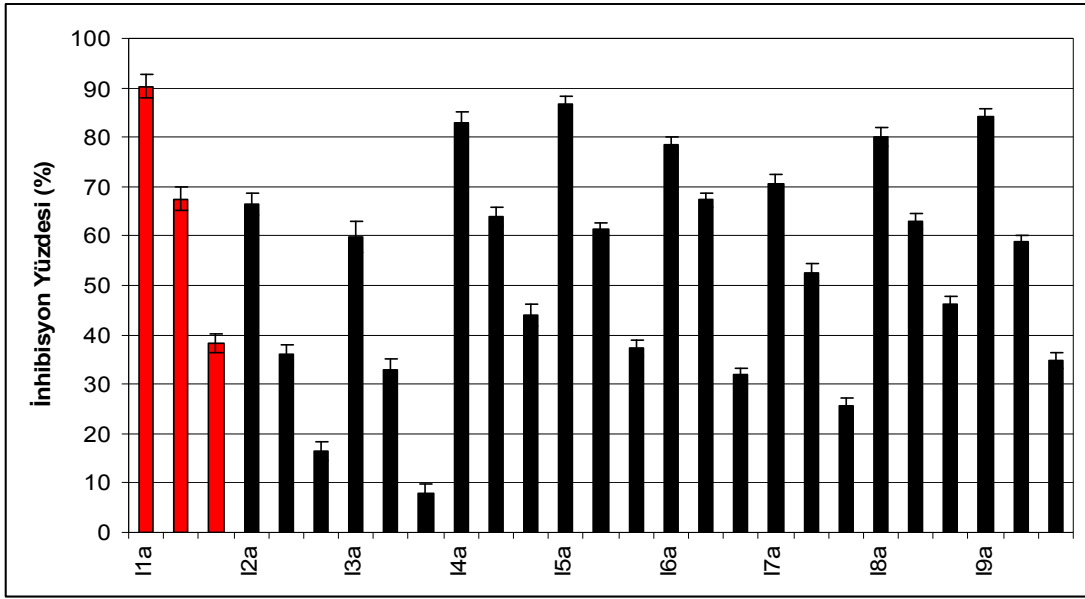


Tablo 5-10'da verilen inhibitörler varlığında gerçekleştirilen inhibisyon deneylerinde enzim kinetik ölçümleri yine 355 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında kaydedilmiştir. 37 °C'de ve pH 7.4'te gerçekleştirilen inhibisyon deneylerinin reaksiyon hacmi ise 250 µl olarak belirlenmiştir. İlk 16 inhibitör için SAM konsantrasyonu 10-100 µM arasında değiştirilirken farklı deney setlerinde kullanılan 17. ve 18. inhibitörler ile yapılan çalışmalarda 10-300 µM arasında değiştirilmiştir.

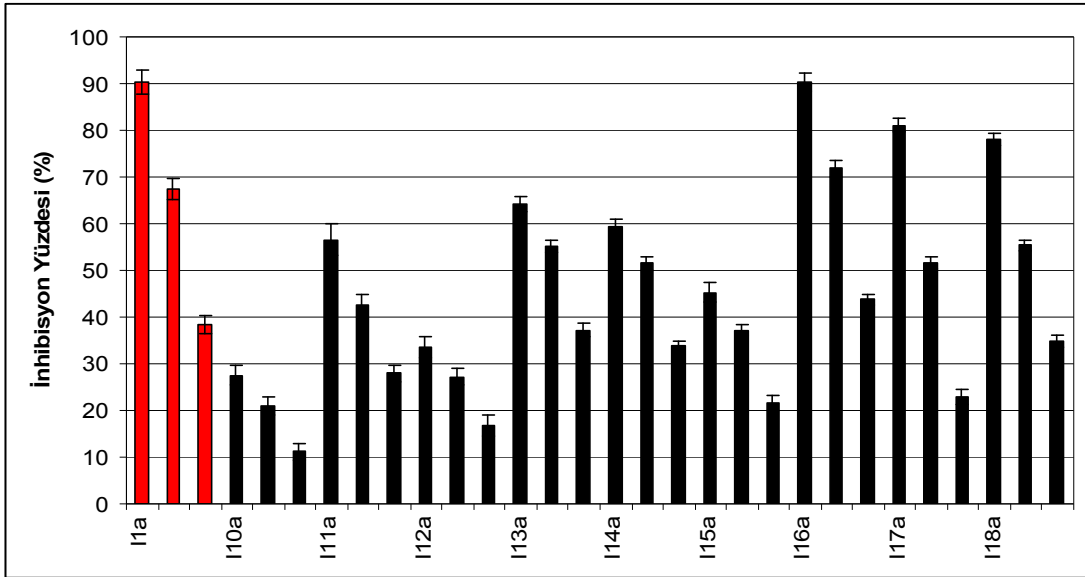
Tablo 5-10'da verilen inhibitörler arasından 3,5-DNK, pozitif kontrol olarak kullanılmış ve diğer inhibitörlerin inhibisyon performansları pozitif kontrolün performansı ile kıyaslanmıştır. Şekil 5-21 ve 5-22'de alkaloid ve polifenolik tabanlı standartlar, özütler ve fraksiyonlar için 100 µM SAM konsantrasyonunda elde edilen inhibisyon performansları yüzde olarak verilmektedir. İnhibitör içermeyen reaksiyonun 100 µM SAM konsantrasyonunda elde edilen hızı, yüzde hesaplamalarında referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 5-10. KOMT inhibitörü olarak kullanılan bazı bitki özütleri, fraksiyonlar ve bunların standartları

İnhibitör Adı	Kodu	Konsantrasyon (µg/ml)	İnhibitör Adı	Kodu	Konsantrasyon (µg/ml)
3,5-dinitrokateşol (3,5-DNK)	I1a	0,1	Oleuropein	I10a	10
	I1b	0,02		I10b	5
	I1c	0,005		I10c	2
Harmol	I2a	5	Rutin	I11a	10
	I2b	2		I11b	5
	I2c	0,5		I11c	2
Harmalol	I3a	5	Zeytin (<i>O. europaea</i>) yaprağı ham özüt	I12a	10
	I3b	2		I12b	5
	I3c	0,5		I12c	2
Harmin	I4a	5	Oleuropeince zengin fraksiyon (FO 1)	I13a	10
	I4b	2		I13b	5
	I4c	0,5		I13c	2
Harmalin	I5a	5	Rutin ve glikozitlerce zengin fraksiyon (FO 5)	I14a	10
	I5b	2		I14b	5
	I5c	0,5		I14c	2
Üzerlik (<i>P. harmala</i>) tohumu ham özüt	I6a	5	Hayıt (<i>V. agnus-cactus</i>) yaprağı ham özüt	I15a	10
	I6b	2		I15b	5
	I6c	0,5		I15c	2
Harmol ve Harmalol fraksiyonu (FP 1)	I7a	5	Laden (<i>C. parviflorus</i>) yaprağı ham özüt	I16a	10
	I7b	2		I16b	5
	I7c	0,5		I16c	2
Harmin fraksiyonu (FP 2)	I8a	5	Menengiç (<i>P. terebinthus</i>) yaprağı ham özüt	I17a	10
	I8b	2		I17b	5
	I8c	0,5		I17c	2
Harmalin fraksiyonu (FP 3)	I9a	5	Sakız (<i>P. lentiscus</i>) yaprağı ham özüt	I18a	10
	I9b	2		I18b	5
	I9c	0,5		I18c	2



Şekil 5-21. Alkaloit standartları ve alkaloit içeren özüt ve fraksiyonların inhibisyon performansları



Şekil 5-22. Polifenol standartları ve polifenol içeren özüt ve fraksiyonların inhibisyon performansları

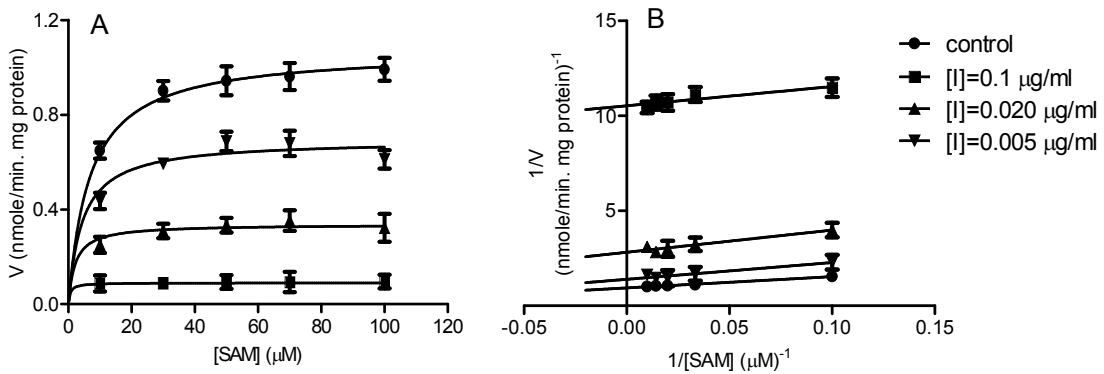
Şekil 5-21 ve 5-22'den görüldüğü gibi bu çalışmada kullanılan alkaloit ve polifenolik standart, özüt ve fraksiyonların inhibisyon performansları KOMT enziminin bilinen en iyi inhibitörü olan 3,5-DNK ile kıyaslanmıştır. Buna göre, 3,5-DNK'nın inhibisyon performansı

özellikle harmin ve harmalin alkaloid standartları ve fraksiyonlarından 100 kat fazla bulunurken polifenoliklerden 200 ve 300 kat fazla inhibisyon özelliği göstermiştir.

İnhibitörlerin konsantrasyon aralıkları göz önüne alındığında, performanslarının pozitif kontrol kadar etkili olmadıkları görülmesine karşın, I6 (*P. harmala*-üzerlik), I16 (*C. parviflorus*-laden), I17 (*P. terebinthus*-menengiç) ve I18 (*P. lentiscus*-sakız) özütlerinin KOMT tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunu engelleme oranı oldukça yüksek bulunmuştur.

Ayrıca, *P. harmala* tohumundan elde edilen özütün YPSK ile yapılan karakterizasyonu sonucunda harmin ve harmalin alkaloidlerinin özüt içerisindeki baskın alkaloidler olduğu tespit edilmiştir. Ham üzerlik özütünün (I6) ve bu özütten elde edilen harmin (I8) ve harmalin (I9) fraksiyonlarının inhibisyon performanslarının alkaloid standartları için elde edilen sonuçlara yakınlığı, üzerlik içerisindeki baskın alkaloidlerin inhibisyondan sorumlu bileşikler olduğunu göstermiştir.

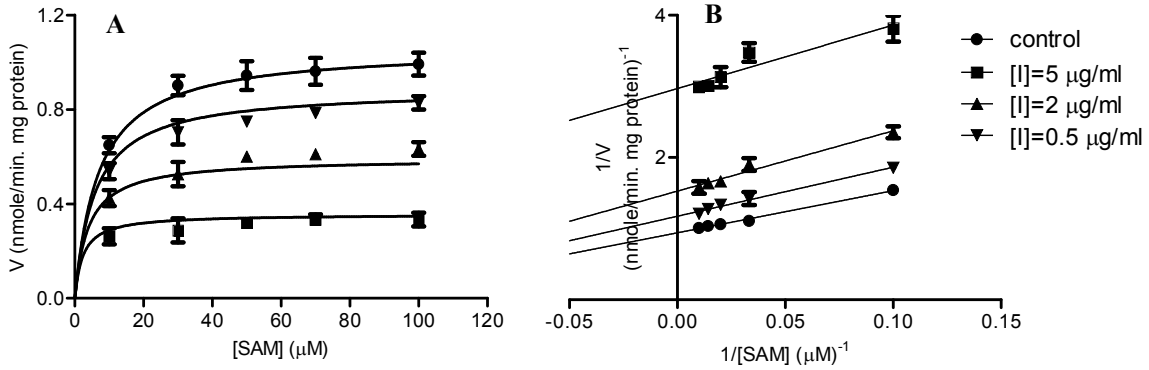
Bu çalışmada kullanılan her bir inhibitörün inhibisyon mekanizmasını açıklayabilmek için daha önce deneysel çalışmalar bölümün de bahsedildiği gibi matematiksel olarak türetilmiş enzim inhibisyon kinetiği hız eşitlikleri model olarak kullanılmıştır. Deneysel veriler, istatikselsel olarak en uygun model ile açıklanmış ve 18 farklı inhibitör için elde edilen Michaelis ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 5-23'ten Şekil 5-40'a kadar verilmiştir.



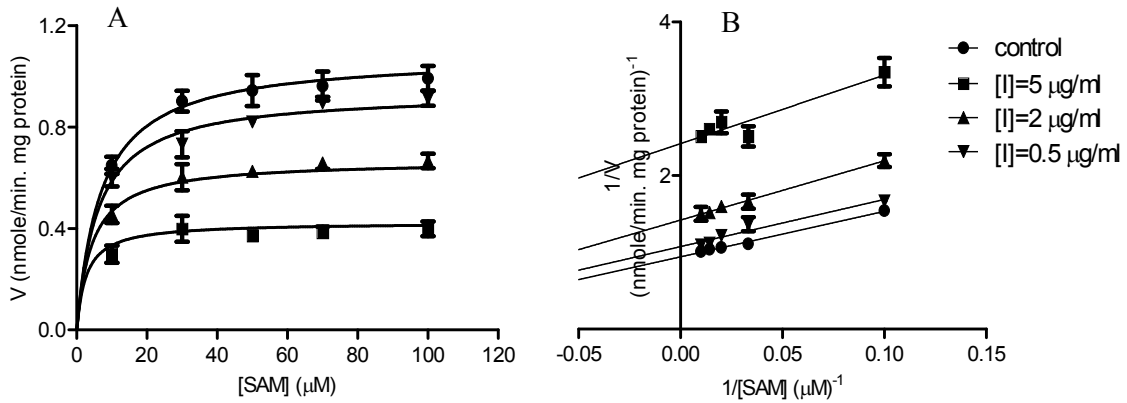
Şekil 5-23. I1 (3,5-DNK) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

BONÍFACIO, 2007' nun çalışmasında genel bilgi olarak verildiği gibi neredeyse bütün nitrokateşolikler KOMT enzimine sıkı bağlanan ve unkompetitif olarak inhibe eden

bileşikler olarak bilinmektedirler. Şekil 5-23A ve B'den de görüldüğü gibi, bu çalışmada da pozitif kontrol olarak kullanılan 3,5-DNK, unkompetitif davranışlı bir KOMT inhibitörü olarak bulunmuştur. Reaksiyon ortamında çok düşük konsantrasyonlarda dahi 3,5-DNK bulunması skopoletin oluşum hızını (v) yüksek oranda engelleyebilmiştir. GraphPad programı ile analizlenen deneysel veriler sonucunda K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla $6.83 \pm 0.77 \mu M$ and 1.07 ± 0.02 nmol/dak. mg protein olarak hesaplanmıştır. Unkompetitif inhibisyon için türetilmiş hız eşitliğindeki (Eşitlik 6) inhibitör bozunma sabiti (αK_i) ise 3,5-DNK için 9.17 ± 0.46 ng/ml (bir başka deyişle; 45.60 ± 2.29 nM). KOMT enzim aktivitesinin yüzde elli oranında engellendiği 3,5-DNK konsantrasyonu (IC_{50}) ise 44.18 ± 0.78 nM olarak bulunmuştur. Bu değer literatürde 35 nM olarak rapor edilmiştir (KURKELA, 2004).



Şekil 5-24. I2 (harmol standart) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

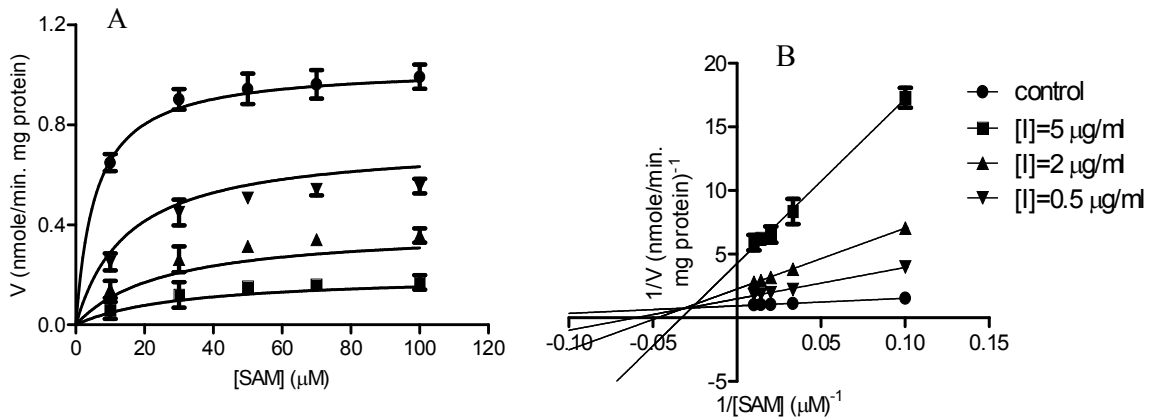


Şekil 5-25. I3 (harmalol standart) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Üzerlik bitkisi alkaloidlerinden olan harmol ve harmalol alkaloidlerinin standartları ile elde edilen deneysel verilerin grafiksel gösterimleri Şekil 5-24 ve 5-25'te verilmiştir. Yapısal olarak birbirlerine benzeyen bu iki alkaloidin KOMT enzimini inhibe etme mekanizmaları da birbirleriyle ve pozitif kontrol ile benzerlik göstermiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden de görüldüğü gibi harmol ve harmalol alkaloidleri KOMT enziminin unkompetitif inhibitörleri olarak bulunmuştur.

Harmol ve harmalol alkaloidleri varlığında gerçekleştirilen bu reaksiyonlar sonucunda K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla $6.97 \pm 0.89 \mu M$ ve 1.06 ± 0.03 nmol/dak. mg protein ve $6.93 \pm 0.64 \mu M$ and 1.08 ± 0.02 nmol/dak. mg protein olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon sabitleri (αK_i) ise harmol için $2.52 \pm 0.16 \mu g/ml$ olarak bulunurken harmalol için $3.21 \pm 0.16 \mu g/ml$ olarak hesaplanmıştır. Harmol ve harmalol için elde edilen yüzde elli inhibisyon konsantrasyon değerleri de sırasıyla $2.79 \pm 0.22 \mu g/ml$ ($=10.31 \pm 0.46 \mu M$) and $3.59 \pm 0.37 \mu g/ml$ ($=13.19 \pm 0.31 \mu M$) olarak hesaplanmıştır. Buna göre, harmol alkaloidinin kısmi olarak harmalolden daha iyi bir inhibitör olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Üzerlik tohumunda baskın olarak bulunan harmin ve harmalin alkaloidleri için elde edilen veri analizi grafikleri sırasıyla Şekil 5-26 ve 5-27'de verilmiştir. Yapısal olarak harmol ve harmalolden farklı olan ancak birbirine benzeyen bu alkaloidlerin inhibisyon mekanizmaları da harmol ve harmalol alkaloidlerinden farklı bulunmuştur.

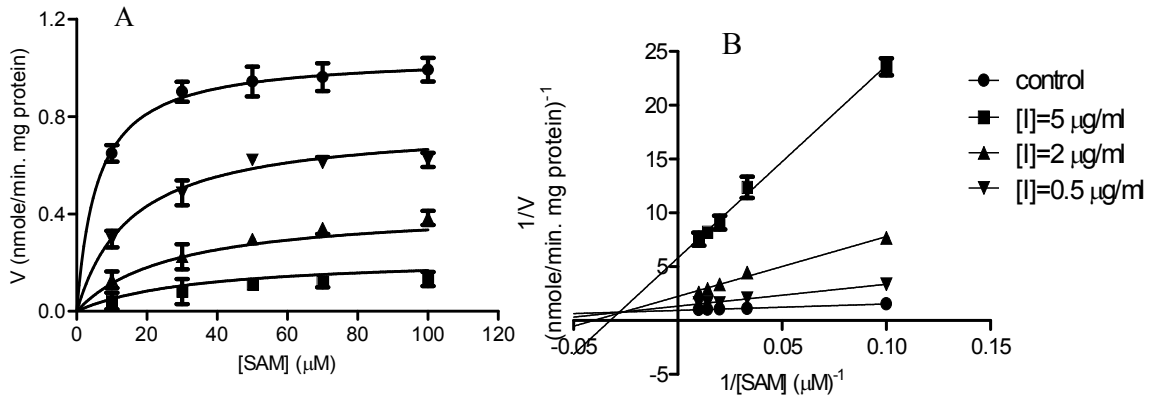


Şekil 5-26. I4 (harmin standart) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 5-26B'de de görüldüğü gibi, harmin standardı ile yapılan inhibisyon deneyi sonucunda elde edilen veriler, karışık tip inhibisyon mekanizması ile açıklanabilmektedir.

Eşitlik 8’de verilen model kullanılarak oluşturulmuş Michaelis grafiği ise Şekil 5-26A’da gösterilmektedir. Bu eşitlikteki kompetitifliğe ve nonkompetitifliğe ait inhibisyon sabitleri olan K_i ve αK_i değerleri sırasıyla $0.18 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ ve $1.18 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. α sabitinin değeri harmin alkaloiti varlığında 6.56 ± 0.81 olarak hesaplanmıştır. K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $5.75 \pm 1.21 \mu\text{M}$ ve $1.03 \pm 0.04 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak hesaplanmıştır.

Harmin alkaloidinin IC_{50} konsantrasyonu $0.75 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$, bir başka deyişle $3.55 \pm 0.16 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.



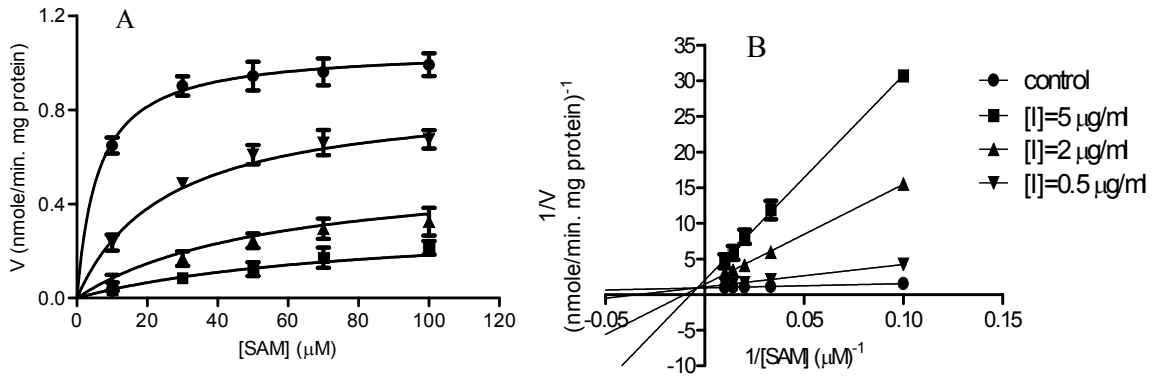
Şekil 5-27. I5 (harmalin standart) için elde edilen

A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Harmalin standardı ile yapılan inhibisyon kinetiği veri analizinde de harmin için olduğu ve Şekil 5-27B’den de görülebildiği gibi karışık tip inhibisyon modeli en uygun model olarak belirlenmiştir. Harmalin standardının inhibisyon sabitleri K_i ve αK_i ise sırasıyla $0.19 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ ve $1.36 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. α sabiti harmin alkaloiti varlığında bulunan değerden biraz fazla ve 7.16 ± 0.78 olarak hesaplanmıştır. Buna göre, birbirinden çok farklı davranış göstermeyen harmin ve harmalin alkaloidleri arasından daha düşük α değerine sahip olan harminin nonkompetitif özelliğinin daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, harmalin alkaloidi için IC_{50} konsantrasyonu $0.98 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$, bir başka deyişle $4.57 \pm 0.14 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. Harmalin varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $5.92 \pm 0.87 \mu\text{M}$ ve $1.05 \pm 0.02 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak hesaplanmıştır.

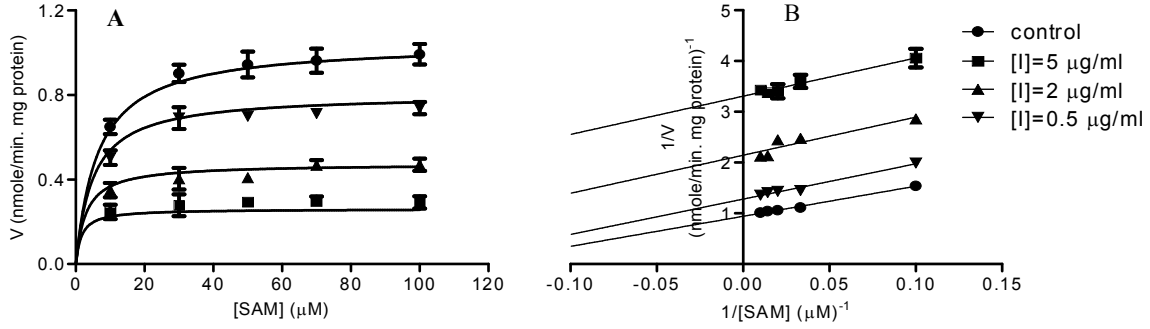
Alkaloid standartları ile yapılan çalışmalar sonucunda harmin ve harmalin alkaloidlerinin KOMT enzim aktivitesini engelleyebilme özelliği harmol ve harmalole göre

daha yüksek bulunmuştur. Harmin ve harmalin aynı tipte davranan inhibitörler olmasına rağmen standartları için elde edilen sonuçlara göre harmin alkaloidinin inhibisyon performansı daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, üzerlik tohumu ham özütü ve bunlardan elde edilen fraksiyonların inhibisyon performansları incelenmiş ve standartları ile kıyaslanmıştır. Şekil 5-28'de reaksiyon ortamında üzerlik tohumu ham özütü bulunurken elde edilmiş veriler grafiksel olarak gösterilmektedir.



Şekil 5-28. I6 (üzerlik tohumu ham özüt) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

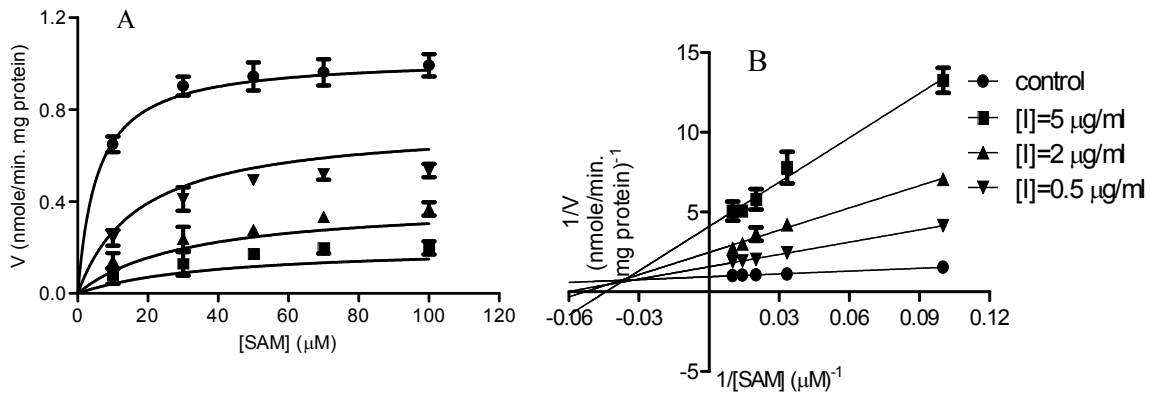
Üzerlik tohumundan elde edilen alkaloidlerin ham özütü ile gerçekleştirilen inhibisyon deneyleri sonuçlarına göre, ham özütün KOMT enzim aktivitesini engelleyebilme özelliği özüt içerisindeki baskın alkaloidler olan harmin ve harmalin kadar etkili bulunmuş ve benzer bir mekanizma ile açıklanabilmiştir. Şekil 5-28B'de görüldüğü gibi karışık tip inhibitör davranışı sergileyen ham özütün inhibisyon sabitleri olan K_i ve αK_i ise sırasıyla 0.12 ± 0.02 µg/ml ve 2.24 ± 0.75 µg/ml olarak bulunmuştur. α sabiti ise 18.72 ± 2.28 olarak hesaplanmış ve harmin ve harmalin alkaloidleri için bulunan değere göre artış göstermiştir. α değerindeki bu artış Lineweaver-Burk grafiğinin (Şekil 5-28B) basit kompetitif inhibisyona benzemesine neden olmuştur. Ham alkaloid özütü için IC_{50} konsantrasyonu ise 1.09 ± 0.33 µg/ml olarak bulunmuştur. K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 6.05 ± 0.69 µM ve 1.06 ± 0.02 nmol/dak. mg protein olarak hesaplanmıştır. Ham özüt varlığında elde edilen sonuçlara göre, K_m değerinde kısmi artış gözlenmiş ve bu artışın kompetitifliğin artmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 5-29. I7 (üzerlik tohumu FP1 nolu fraksiyon) için elde edilen

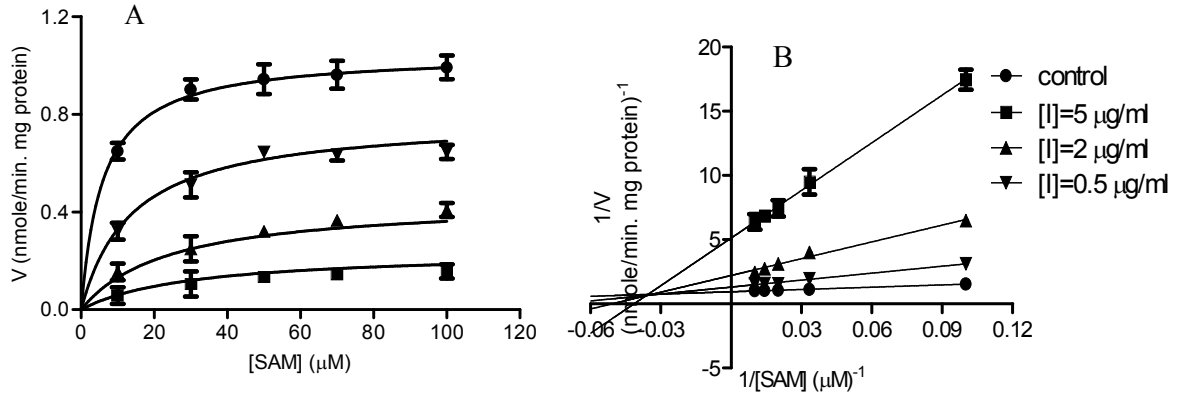
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Üzerlik tohumu alkaloidlerinin fraksiyonları için yapılan inhibisyon deneyleri sonuçları içerdikleri major alkaloidlerin standartları için elde edilen sonuçlar ile uyum göstermiştir. Şekil 5-29'da ham alkaloid özütünün harmol ve harmalol alkaloidlerince zengin fraksiyonu için elde edilen veri analizi sonuçları grafiksel olarak gösterilmektedir. Şekil 5-24 ve 5-25'te harmol ve harmalol standartları için elde edilen sonuçlara benzer olarak FP1 nolu üzerlik fraksiyonu KOMT aktivitesini unkompetitif olarak engellediği görülmektedir. Harmol ve harmalol alkaloidleri bakımından zengin FP1 nolu fraksiyon için αK_i ve IC_{50} değerleri sırasıyla $1.66 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ ve $1.74 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Harmol ve harmalol standartlarına göre daha etkili olduğu görülen FP1 fraksiyonunun inhibisyon özelliğinin artmasında alkaloidlerin beraber bulunmasının sinerjik bir etki yarattığı düşünülmüştür. FP1 fraksiyonu varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $6.44 \pm 0.82 \mu\text{M}$ ve $1.05 \pm 0.02 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5-30. I8 (üzerlik tohumu FP2 nolu fraksiyon) için elde edilen

A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

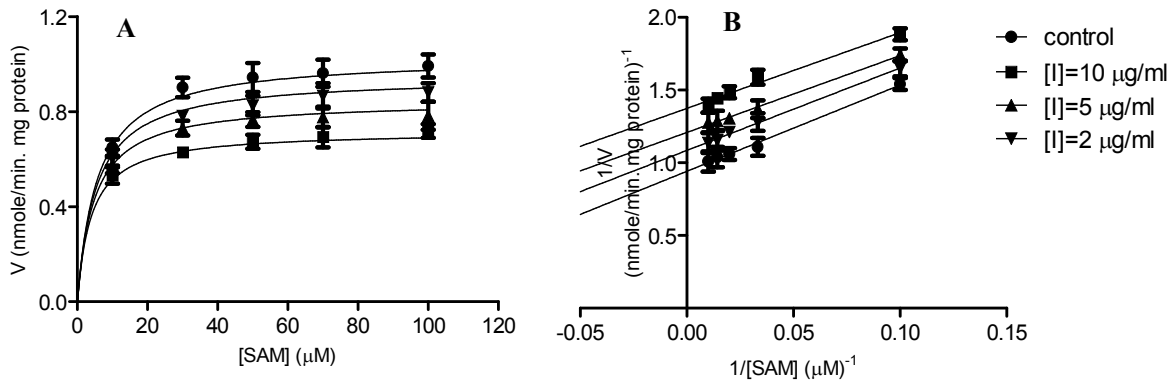


Şekil 5-31. I9 (üzerlik tohumu FP3 nolu fraksiyon) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Fraksiyon için yapılan YPSK analizleri sonucunda FP2 nolu üzerlik fraksiyonunun % 77 oranda harmin ve % 23 oranda harmalinden oluştuğu bulunmuştur. Buna göre, harmince zengin fraksiyon için yapılan inhibisyon deneyleri sonucunda harmin ve harmalinin birlikte bulunmasının inhibisyon mekanizması üzerinde bir etki yaratmadığı görülmüş ve karışık tip inhibitör olarak belirlenmiştir (Şekil 5-30). Ancak, harmol ve harmalol fraksiyonunda olduğu gibi, harmin ve harmalinin beraber bulunması inhibisyon performansı üzerinde kısmen arttırıcı bir etki yaratmıştır. Harmin standardı için sırasıyla 0.18 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.18 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunan K_i ve αK_i değerleri, harmince zengin FP2 nolu fraksiyon için 0.15 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.28 ± 0.06 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Yüzde elli inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) da yine harmin standardına göre daha düşük ve 0.69 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. FP2 fraksiyonu varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla 5.61 ± 1.68 μM ve 1.03 ± 0.05 nmol/dak. mg protein olarak hesaplanmıştır.

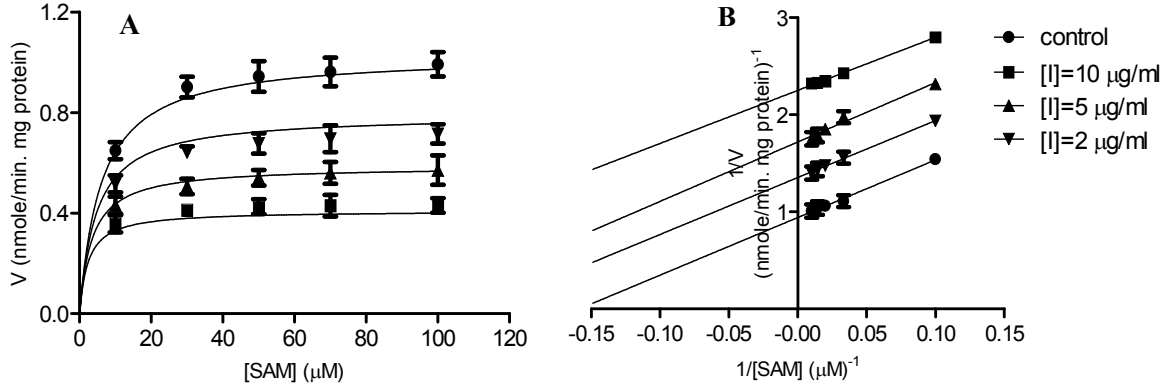
Şekil 5-31'de % 93.3 harmalin içeriği bulunan FP3 nolu üzerlik fraksiyonu için elde edilen veri analizi grafiksel olarak gösterilmektedir. Harmin ve harmalin standartları ile yapılan deneylerin sonuçları ile uyumlu olarak harmalince zengin FP3 fraksiyonunun inhibisyon performansı FP2'ye göre daha düşük bulunmuştur. İnhibisyon mekanizması bu fraksiyon içinde Şekil 5-31B'de de görüldüğü gibi karışık tip olarak belirlenmiştir. Harmalince zengin FP3 fraksiyonu için K_i ve αK_i değerleri 0.23 ± 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ve 1.47 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Sırasıyla 6.39 ± 1.08 ve 1.10 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanan α ve IC_{50} değerleri de yine harmalin standardı için bulunan değerlere çok yakın olarak bulunmuştur.

İnhibisyon deneylerinde fraksiyonlarına ayrılarak ve standartları ile karşılaştırılarak incelenen diğer bitki türünün polifenoliklerce zengin zeytin yaprağı olduğundan daha öncede bahsedilmiştir. Şekil 5-22’de 3,5-DNK ile yüzde cinsinden inhibisyon performansları kıyaslanan zeytin yaprağı polifenoliklerinin alkaloidlere göre daha düşük etki yarattığı gözlenmiştir. Ancak, inhibisyon mekanizmaları hakkında fikir yürütebilmek amacıyla polifenolik standartlar, özüt ve fraksiyonlar için elde edilen deneysel veriler de yine Michaelis yaklaşımı ile açıklanmaya çalışılmıştır.



Şekil 5-32. I10 (oleuropein standart) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Oleuropein, bu çalışmanın karakterizasyon sonuçları içerisinde de verildiği gibi, zeytin yaprağı içerisinde baskın olarak bulunan polifenoldür. Bu açıdan, oleuropein standardının KOMT aktivitesinin inhibisyon mekanizması ilk olarak açıklanmaya çalışılmıştır. Şekil 5-32’de oleuropein standardı ile yapılan inhibisyon deneyi sonuçları grafiksel olarak verilmektedir. Oleuropein standardı için inhibisyon sabiti (αK_i), yapılan analiz sonucunda $22.96 \pm 1.39 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuş ancak, Şekil 5-32A’den de görüldüğü gibi $10 \mu\text{g/ml}$ inhibitör konsantrasyonuna kadar yüzde elli inhibisyon gözlenmemiştir. Dolayısıyla, bu çalışmadaki inhibitör konsantrasyonu için IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Oleuropein varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $5.74 \pm 0.39 \mu\text{M}$ ve $1.03 \pm 0.01 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5-33. I11 (rutin standart) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

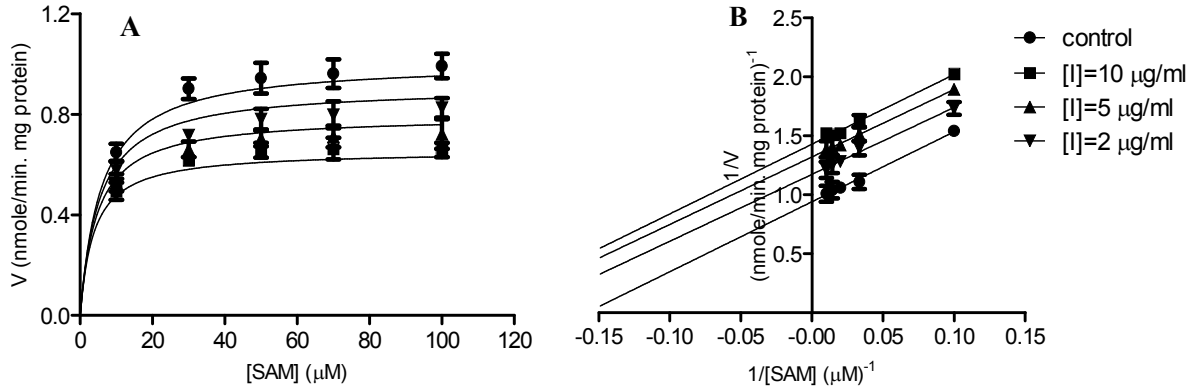
Zeytin yaprağı özütündeki ikinci baskın polifenol olan rutin standardı ile yapılan inhibisyon deneyleri sonuçları ise Şekil 5-33'te verilmektedir.

Yapısal olarak benzer polifenolikler olan oleuropein ve rutin KOMET enziminin unkompetitif inhibitörleri olarak bulunmuştur (Şekil 5-32B ve 5-33B). Ancak, rutin standardı aynı konsantrasyon aralığında oleuropeine göre daha yüksek inhibisyon göstermiştir. İnhibisyon sabiti αK_i , $6.58 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$, bir başka deyişle $10.78 \pm 0.52 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur. GUGLER, 1973'in çalışmasında, bu çalışmaya benzer olarak 19 adet flavonoit KOMET enzim inhibisyon performanslarını ortaya çıkarmak amacıyla taranmıştır. Bunlar arasından, quersetin ve rutin, inhibisyon özellikleri en yüksek flavonoitler olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada quersetin ve rutin için inhibisyon sabitleri sırasıyla 5.3 ve 10.8 μM olarak bulunmuştur. Bu değer, rutin için bu çalışmada hesaplanan inhibisyon sabiti değeri ile neredeyse birebir uyum göstermiştir. Ancak, GUGLER, 1973'in çalışmasında rutin ve quersetinin KOMET enzimini kompetitif olarak inhibe ettiği ileri sürülmüştür. Elde edilen sonuçlardaki farklılığın metil alıcı substratların ve analiz metotlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Rutin standardı için IC_{50} değeri harmol ve harmalol alkaloidleri için hesaplanan değere yakın ve $7.17 \pm 0.81 \mu\text{g/ml}$ ($=11.75 \pm 0.93 \mu\text{M}$) olarak hesaplanmıştır. Rutin varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $6.05 \pm 0.79 \mu\text{M}$ ve $1.03 \pm 0.02 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak bulunmuştur.

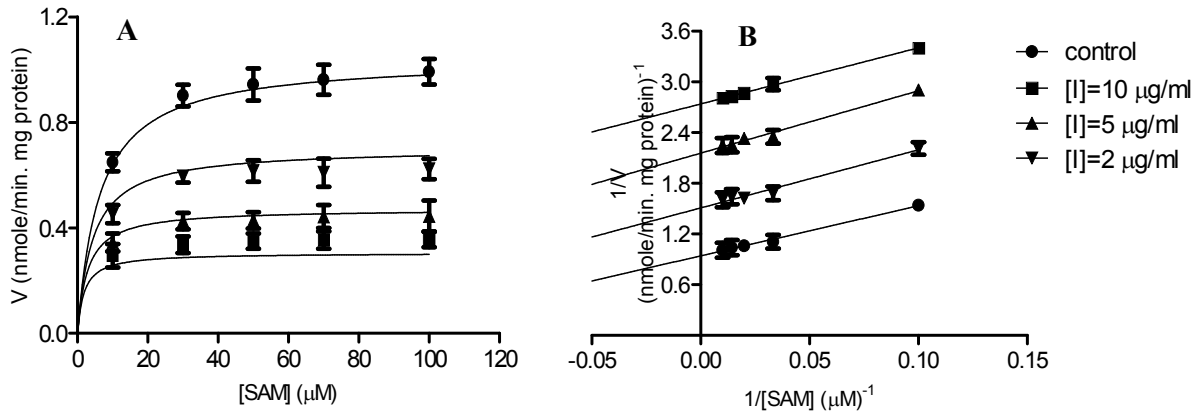
Karakterizasyon deneyleri sonuçları baz alındığında, zeytin yaprağı ham özütü için gerçekleştirilen inhibisyon deneyleri sonuçlarının daha çok oleuropein standardı için elde

edilen sonuçlara benzer olması tahmin edilmiştir. Şekil 5-34'te ham özüt için verilen grafiksel sonuçlardan da görüldüğü gibi, özüt için belirlenen inhibisyon mekanizması ve performansı oleuropein standardı için bulunan sonuçlara daha yakın bulunmuştur.



Şekil 5-34. I12 (zeytin yaprağı ham özüt) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

KOMT enzimini unkompetitif olarak inhibe ettiği gözlenen zeytin yaprağı ham özütünün inhibisyon sabiti (αK_i) $18.51 \pm 2.05 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Oleuropeine göre daha etkili rutine göre daha düşük inhibisyon özelliği gösteren ham özüt için de oleuropein standardında olduğu gibi IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Ham özüt varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $5.83 \pm 0.83 \mu\text{M}$ ve $1.01 \pm 0.03 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak bulunmuştur.

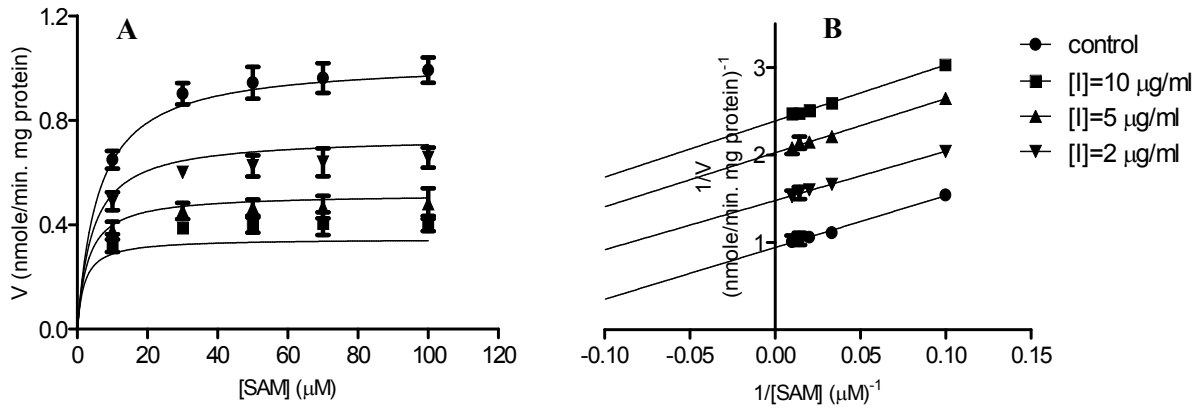


Şekil 5-35. I13 (zeytin yaprağı FO1 nolu fraksiyon) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Zeytin yaprağı özütünden elde edilen FO1 nolu fraksiyonun YPSK analizleri sonucunda, % 91 oranında oleuropein ve az miktarda oleuropeine göre daha az polar olan tanımlanamamış bir polifenol içerdiği bulunmuştur. Şekil 5-35B'den de görüldüğü gibi oleuropeince zengin FO1 nolu fraksiyon, oleuropein ve rutin standartlarına ve zeytin yaprağı ham özütüne benzer olarak unkompetitif inhibisyon davranışı göstermiştir. Ancak, FO1 fraksiyonu beklendiğinin tersine oleuropein ve ham özütten çok daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu sonucun, fraksiyon içeriğindeki tanımlanamamış polifenol ile oleuropeinin birlikte bulunmasının olumlu sonuç yaratabileceği olasılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. FO1 nolu fraksiyonun inhibisyon sabiti (αK_i) ve IC_{50} değeri sırasıyla $4.14 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ve $4.09 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.

FO1 nolu fraksiyon varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $6.29 \pm 1.07 \mu\text{M}$ ve $1.04 \pm 0.03 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak hesaplanmıştır.

Zeytin yaprağı özütünün rutin ve diğer glikozitler, özellikle de verbaskozitce zengin fraksiyonu olan FO5 nolu fraksiyon için elde edilen inhibisyon kinetik verileri Şekil 5-36'da verilmektedir.



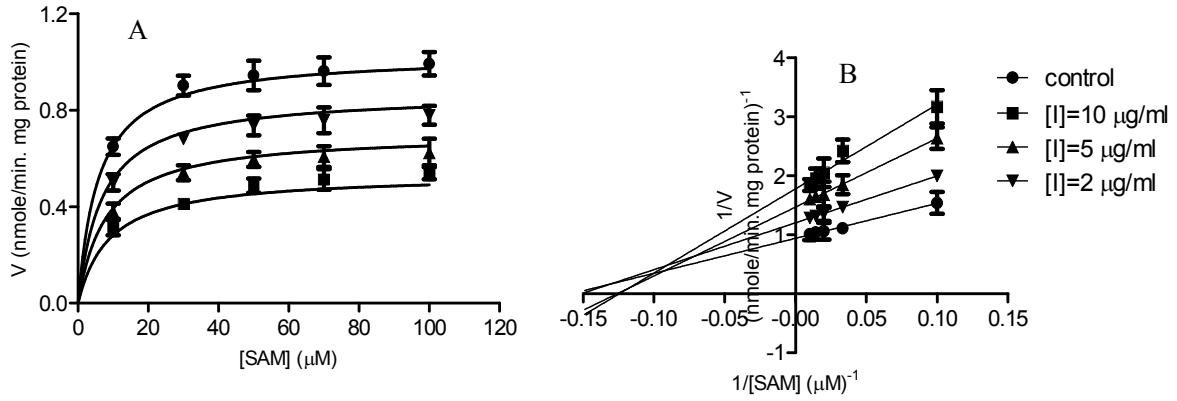
Şekil 5-36. I14 (zeytin yaprağı FO5 nolu fraksiyon) için elde edilen

A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

FO5 nolu polifenolik fraksiyon için de yine diğer polifenolik standart, özüt ve fraksiyonda olduğu gibi, inhibisyon mekanizması unkompetitif davranış ile açıklanmıştır (Şekil 5-36B). Baskın olarak rutin ve verbaskozit içeren bu fraksiyon rutin standardına göre daha yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. FO5 nolu fraksiyon için inhibisyon sabiti (αK_i) ve IC_{50} değeri sırasıyla $5.08 \pm 0.43 \mu\text{g/ml}$ ve $5.21 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. FO5 nolu

fraksiyon varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $5.98 \pm 1.21 \mu M$ ve 1.03 ± 0.04 nmol/dak. mg protein olarak bulunmuştur.

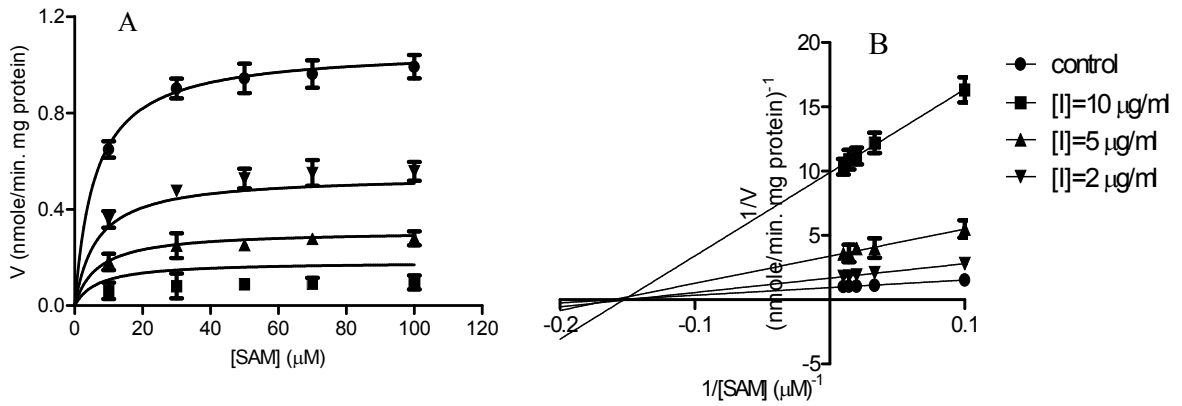
Bu çalışmada, zeytin yaprağı ve üzerlik tohumlarından elde edilen ham özütlerin KOMT enzim aktivitesini engelleyebilme potansiyelleri fraksiyonlama işlemi ile artırılmış olmasına karşın fraksiyonlar içindeki bazı maddelerin birbiri üzerinde sinerjik etki yaratabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer bitki türleri ise fraksiyonlama yapılmadan ham özüt halinde inhibisyon deneylerinde kullanılmıştır. Bu bitkiler arasından hayıt yaprağı ham özütü için elde edilen inhibisyon kinetiği verileri grafiksel olarak Şekil 5-37'de verilmektedir.



Şekil 5-37. I15 (hayıt yaprağı ham özütü) için elde edilen A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 5-37B'de görüldüğü gibi hayıt yaprağı ham özütü, üzerlik tohumu ham özütü ve onun harmin ve harmalin fraksiyonlarına benzer olarak karışık tip inhibisyon davranışı göstermiştir. Hayıt yaprağı ham özütü için elde edilen K_i ve αK_i değerleri sırasıyla $4.43 \pm 0.89 \mu g/ml$ ve $9.48 \pm 0.58 \mu g/ml$ olarak hesaplanmıştır. Bu özüt için harmin ve harmalin standartları ve fraksiyonları için bulunan α değerinden daha düşük bir değer bulunmuştur. 2.14 ± 0.23 olarak hesaplanmış α değeri ile hayıt özütünün alkaloidlere göre nonkompetitifliği daha yüksek bir inhibitör olduğu görülmüştür. Ancak, IC_{50} değeri alkaloidlere göre daha yüksek ve $12.96 \pm 0.29 \mu g/ml$ olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, nonkompetitifliği yüksek olmasına karşın inhibisyon performansı üzerlik özütü ve onun alkaloid fraksiyonlarına göre daha düşük bulunmuştur.

Birinci nesil KOMT inhibitörleri olarak bilinen gallik asit, hidroksibenzoik asit, rutin ve ferulik asit gibi bileşikler içeren hayıt yaprağı özütünün aynı zamanda estrogenik bileşikler olan linoleik asit ve haliman, labdan tipi diterpenleri içerdiği bilinmektedir (ONO, 2008; PROESTOS, 2006). Estrogenik metabolizma üzerinde etkisi daha önce de bahsedilmiş olan KOMT enziminin aktivitesinin hayıt yaprağı özütü gibi estrogenik bileşikler içeren bitkisel kaynaklı inhibitörler ile engellenebilmesi bu açıdan oldukça önem taşımaktadır.



Şekil 5-38. I16 (laden yaprağı ham özütü) için elde edilen

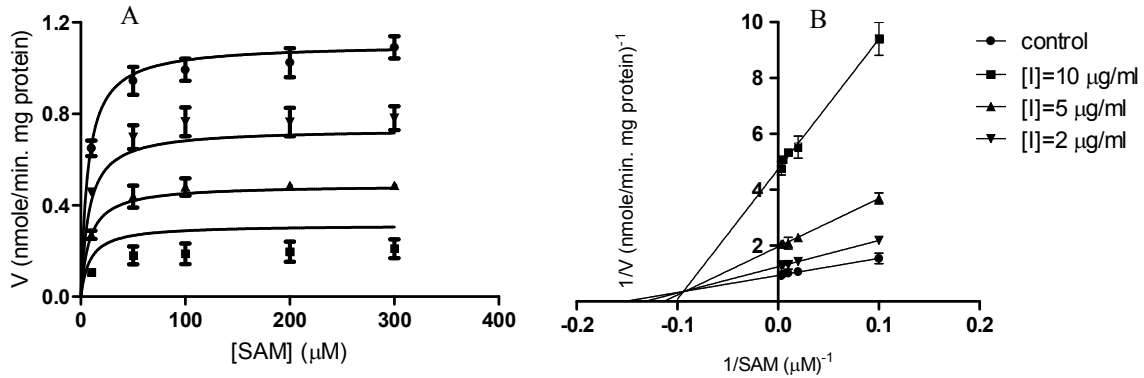
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Hayıt yaprağında olduğu gibi yüksek miktarda terpen ve flavonoit içeriği olduğu bilinen laden yaprağı özütü içinde KOMT inhibisyonu çalışmada kullanılan konsantrasyon aralığında gözlenebilmiştir (SOMOZA, 1996). Şekil 5-38'de laden yaprağı özütü için elde edilen grafiksel sonuçlardan görüldüğü gibi, KOMT enzim aktivitesi laden yaprağı özütü varlığında karışık tip inhibisyon mekanizması ile engellenmiştir. Laden yaprağı ham özütü için kompetitiflik ve nonkompetitifliği belirten inhibisyon sabitleri (K_i ve αK_i) sırasıyla $2.51 \pm 0.54 \mu\text{g/ml}$ ve $1.99 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Bu özüt için yine hayıt yaprağı özütünde olduğu gibi alkaloidlerden daha düşük α değeri bulunmuştur. 0.79 ± 0.32 olarak hesaplanmış α değeri ile nonkompetitifliği en yüksek inhibitör olarak belirlenmiştir. Ayrıca, laden yaprağı ham özütü için IC_{50} değeri de alkaloidler için bulunan değere yakın ve $2.44 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Laden yaprağı özütü varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri ise sırasıyla $6.02 \pm 1.29 \mu\text{M}$ ve $1.06 \pm 0.04 \text{ nmol/dak. mg protein}$ olarak bulunmuştur.

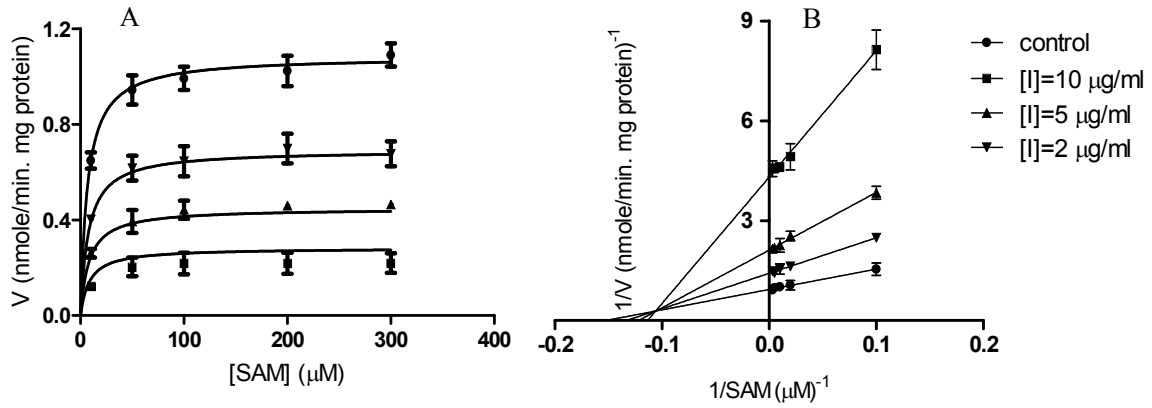
Alkaloidler ile kıyaslanabilecek düzeyde KOMT inhibisyonu etkisi gösteren laden yaprağı özütünün, terpen ve flavonoit içeriği nedeniyle sakinleştirici etkisi olduğu da bilinmektedir (SOMOZA, 1996). Buna ek olarak, literatürde laden yaprağının bazı karvakrol,

timol, manoil oksitler gibi terpenoit uçucu yağlar ve benzil benzoat gibi esterler içerdiği bilinmektedir (ANGELOPOULOU, 2001).

Bu çalışma kapsamında, halk arasında menengiç ve sakız bitkileri olarak bilinen iki adet *Pistacia* türü bitki özütü ile de KOMT enzim inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 5-39 ve 5-40'ta sırasıyla verilmiştir.



Şekil 5-39. I17 (menengiç yaprağı ham özüt) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 5-40. I18 (sakız yaprağı ham özüt) için elde edilen
A: Michaelis ve B: Lineweaver-Burk grafikleri

Şekil 5-39B ve 5-40B'den görüldüğü gibi, menengiç ve sakız yaprağından elde edilen özütler zeytin yaprağı dışındaki diğer polifenolik özütler ve üzerlik tohumu özütünde olduğu gibi karışık tip inhibisyon özelliği göstermiştir. Menengiç ve sakız yaprakları özütleri için bulunan α değerleri bire ve birbirlerine yakın değerler olarak bulunmuştur. Sırasıyla 1.37 ± 0.49 ve 1.35 ± 0.54 α değerleri olan menengiç ve sakız özütleri için αK_i değerleri ise

3.95±0.37 µg/ml ve 3.52±0.61 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Laden yaprağı özütünden daha düşük fakat etkili inhibisyon özelliği gösteren bu iki *Pistacia* türü özütü için IC₅₀ değerleri de birbirlerine yakın bulunmuştur. IC₅₀ değerleri menengiç ve sakız yaprağı özütü için sırasıyla 4.40±0.28 µg/ml ve 3.69±0.32 µg/ml olarak bulunmuştur. Menengiç yaprağı özütü varlığında K_m ve V_{max} kinetik sabitleri sırasıyla 6.79±0.86 µM ve 1.10±0.04 nmol/dak. mg protein olarak bulunurken sakız yaprağı özütü varlığındaki kinetik sabitler 6.76±0.93 µM ve 1.08±0.02 nmol/dak. mg protein olarak hesaplanmıştır.

Laden yaprağı özütü için olduğu gibi, menengiç ve sakız yaprağı özütleri için de alkaloidler ile kıyaslanabilir oranda KOMT inhibisyonu etkisi gözlenmiştir. Literatürde, bu iki aynı tür bitkinin de yapraklarında apigenin, luteolin, quersetin, gallik asit ve türevleri ve bazı antosiyaninler bulunduğu raporlanmıştır (BENHAMMOU, 2008; TOPÇU, 2007). Dolayısıyla, *Pistacia* türlerinin yüksek KOMT inhibisyonu etkilerinin birinci nesil KOMT inhibitörleri olarak da bilinen bu bileşikleri içermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

6.0. SONUÇLAR

Üzerlik tohumu ve zeytin yaprağı içerdikleri alkaloit ve polifenoller sayesinde KOMT enzimini inhibe etme özelliği göstermişlerdir. Bu çalışmada genel olarak üzerlik tohumu içerisinde bulunan harmol, harmalol, harmin ve harmalin olarak bilinen alkaloitlerinin ve zeytin yaprağının iki ana bileşiği olan oleuropein ve rutin polifenollerinin KOMT enzimini inhibe etme performansları üzerinde durulmuştur. Bitkisel kaynakların özütleme ve fraksiyonlama işlemlerine tabi tutulması ile inhibitör olarak kullanılacak maddeler elde edilmiş ve saflıkları arttırılmaya çalışılmıştır. Buna ek olarak, hayıt, laden, sakız ve menengiç bitkilerinin yapraklarından elde edilen özütlerin KOMT enzim aktivitesini engelleyebilme kapasiteleri araştırılmıştır.

İlk olarak, üzerlik tohumu farklı ekstraksiyon metotlarına tabi tutulmuştur. YPSK analizleri ile sıcaklık, pH, ekstraksiyon süresi ve çözen tipi gibi parametrelerin alkaloit ekstraksiyonu verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Buna göre, esas olarak Soxhlet aparatı ile yapılan ekstraksiyon işlemi verimliliği en yüksek metot olarak belirlenmiştir. Bu metotta, toz haline getirilmiş tohumlar çözen olarak metanolün kullanıldığı Soxhlet aparatı ile 7.5 saat süreyle ve 70 °C’de ekstre edilmişlerdir. Metanolünden uzaklaştırılmış ilk özüt % 2’lik hidroklorik asit çözeltisi içinde çözülmüştür. İki kez petrol eteri ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulan özütün asit fazı toplanmıştır. Bu fazdaki özüt çözeltisinin pH değeri amonyum hidroksit eklenerek 10’a ayarlanmıştır. Dört kez kloroform ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılan özütün kloroform fazı toplanarak ham alkaloit özütü elde edilmiştir. Yapılan YPSK analitik kolon analizi sonucunda ham alkaloit özütünde eser miktarda harmol ve harmalol alkaloitleri bulunurken, özütün harmin ve harmalin alkaloit içerikleri % 41 ve % 58 olarak hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimi ise literatür ile uyum göstermiş ve % 6.63 olarak bulunmuştur.

Zeytin yaprağı özütü elde etme işlemi için çözen ekstraksiyonu metodu kullanılmıştır. % 70 sulu etanol çözeltisinin çözen olarak kullanıldığı ekstraksiyon işlemi 25°C, 250 devir ve 1/20 katı-sıvı oranında 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen özütün YPSK analitik kolon analizi sonuçlarına göre bir gram zeytin yaprağında baskın olarak 92,50 mg oleuropein ve 9,12 mg rutin içeriği gözlenmiştir. Ayrıca, zeytin yaprağı özütü içerisinde minör olarak verbaskozit, luteolin 7-glikozit gibi polifenoliklerin bulunduğu YPSK analizleri ile görülmüştür. Çalışmada inhibitör olarak kullanılan hayıt, laden, menengiç ve sakız gibi

bitkilerin yaprakları, zeytin yaprağı için optimize edilen özütleme işlemi uygulanarak özütlenmiştir.

Üzerlik tohumundan elde edilen ham alkaloit özütü, YPSK sisteminde semipreperatif kolon kullanılarak ve bu sisteme bağlı fraksiyonlama ünitesi yardımı ile 3 adet fraksiyona ayrılmıştır. Bunlardan 2 ana fraksiyon olan harmin ve harmalin fraksiyonlarının harmin ve harmalin alkaloiti saflıkları YPSK analitik kolon ile belirlenmiştir. Buna göre, harmin fraksiyonu olarak toplanan kısmın % 77'si harmin ve yaklaşık % 23'ü harmalin olarak belirlenmiştir. Harmalin fraksiyonunun ise % 93 oranında harmalin ve yaklaşık % 7 oranında harmin içerdiği bulunmuştur.

Zeytin yaprağı özütünün fraksiyonlama işlemi ipek dolgulu kolon kullanılarak yapılmıştır. Toplam altı fraksiyon olarak toplanan kısımlardan su ile elüt edilen oleuropeince ve etanol ile elüt edilen rutin ve diğer glikozitlerce zengin olan 2 adet fraksiyon inhibisyon çalışmalarında kullanılmıştır. Fraksiyonların YPSK analizlerine göre su fraksiyonunun oleuropein oranı % 91 olarak belirlenmiştir. Etanol fraksiyonunda ise baskın olarak rutin ve verbaskozit polifenol içeriği tespit edilmiştir.

İnhibisyon çalışmalarından önce enzim kaynağı KOMT'un aktif protein içeriği belirlenmiştir. Bradford protein tayini metodu ile yapılan bu çalışmada KOMT enziminin aktif protein içeriği BSA referans proteinine göre % 27,7 olarak belirlenmiştir. KOMT enzim aktivitesi spektrofotometrik ve florometrik olarak incelenmiş ve florometrik aktivite tayininin absorbansa göre daha hassas ve ekonomik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Florometrik aktivite tayini çalışmasında skopoletin oluşma kinetiği izlenmiş ve ilk olarak KOMT enzimi ve bu enzimin metil verici ve metil alıcı substratları olan SAM ve Eskuletin için doğrusal çalışma aralığı araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda inhibisyon deneylerinde, enzim ve Eskuletin konsantrasyonları sırasıyla 11 µg protein/ml ve 4 µM'da sabit tutulmuştur. Reaksiyon hız belirleyici substratı olan SAM konsantrasyonunun ise 100 µM'dan daha yüksek değerlerde inhibe edici özelliği olduğu tespit edilmiştir. İnhibitörsüz ortamda SAM ve Eskuletin için K_m değerleri sırasıyla $3.5 \pm 0.3 \mu M$ ve $6.4 \pm 0.4 \mu M$ olarak hesaplanmıştır.

Esas olarak üzerlik tohumu ve zeytin yaprağından elde edilen özüt ve fraksiyonların KOMT enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenen çalışmada 3,5-DNK referans inhibitör olarak kullanılmıştır. Bunun dışında, alkaloit ve polifenol standartları, özütler ve fraksiyonlar

olmak üzere 17 adet inhibitörün performansları test edilmiştir. KOMT enziminin bilinen en iyi unkompetitif inhibitörü olan 3,5-DNK'nın inhibisyon performansı özellikle harmin ve harmalin alkaloid standartları ve fraksiyonlarından 100 kat fazla bulunurken polifenoliklerden 200 ve 300 kat fazla inhibisyon özelliği göstermiştir.

İnhibitörlerin konsantrasyon aralıkları göz önüne alındığında, performanslarının pozitif kontrol kadar etkili olmadıkları görülmesine karşın üzerlik tohumundan, laden, menengiç ve sakız yapraklarından elde edilen özütlerin, KOMT tarafından katalizlenen metillenme reaksiyonunu engelleme oranı oldukça yüksek bulunmuştur. İnhibisyon mekanizmaları alkaloidler için ağırlıklı olarak karışık tip model ile açıklanırken, zeytin yaprağı polifenollerinin standartları, özütü ve fraksiyonlarının varlığında unkompetitif inhibisyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer dört bitkinin polifenolik özütleri için ise alkaloidlerde olduğu gibi karışık tip inhibisyon mekanizması görülmüştür.

Bu çalışmada fraksiyonları ile birlikte incelenmiş bitki türü olan üzerlik tohumunun ham özütü ve özellikle harmin ve harmalin fraksiyonları diğer bitki türleri arasından en yüksek ve birbirine yakın inhibisyon özelliği göstermiştir. Elde edilen bu sonuç ile YPSK analizleri sonucu uyum göstermiş ve üzerlik tohumu özütünün yüksek inhibisyon etkisinin harmin ve harmalin alkaloidleri içermesinden kaynaklandığı görülmüştür. Alkaloidler için yüzde elli inhibisyonun gerçekleştiği konsantrasyon değerleri (IC_{50}) 0.69 ve 1.10 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulunmuştur. Bunlar arasından harmin fraksiyonu diğer alkaloid fraksiyonlarına, ham özüte ve kendisinin standardına göre en yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir. Karışık tip bir inhibitör olduğu bulunan harmin fraksiyonunun kompetitiflik ve nonkompetitiflik derecelerine ait inhibisyon sabitleri (K_i ve αK_i) sırasıyla $0.15 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ ve $1.28 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

Zeytin yaprağı polifenollerinin standartları, ham özütü ve fraksiyonlar ile yapılan inhibisyon deneyi sonuçlarına göre oleuropeince zengin su fraksiyonu en yüksek inhibisyon etkisini göstermiştir. Unkompetitif inhibitör olarak belirlenen bu fraksiyonun inhibisyon sabiti (αK_i) ve IC_{50} değeri sırasıyla $4.14 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ve $4.09 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, beklenenin aksine oleuropein standardı ve zeytin yaprağı ham özütüne göre farklılık göstermiştir. Dolayısıyla, bileşiklerin birlikte bulunmalarının spesifik biyolojik etkileri üzerinde olumlu ya da olumsuz sonuçlar doğurduğu gözlemlenmiş ve fraksiyonlamanın önemi anlaşılmıştır.

Elde edilen sonuçlar ışığında, özellikle zeytin yaprağı polifenollerinden oleuropeinin bazı biyotransformasyon yöntemleri ile hidrokstirosol gibi biyolojik olarak kendisinden daha aktif doğal bileşiklere dönüştürülerek KOMT inhibisyon performanslarının test edilmesinin bu çalışmanın devamı niteliğindeki bir çalışma olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu proje kapsamında fraksiyonlarına ayrılmadan ancak ham özütleri için yüksek inhibisyon sonuçları elde edilen özellikle laden, menengiç ve sakız yaprakları özütlerinin fraksiyonlarının elde edilmesi gerektiği ve bunların potansiyel KOMT inhibitörü olabilecekleri öngörülmektedir. Bu açıdan, fraksiyonlama işlemi yapılan bitki türlerinin artırılması ile bu türlerden elde edilecek fraksiyonların KOMT inhibisyon potansiyellerinin araştırılması ileriki zamanlarda hayata geçirilmesi gereken çalışmalar olarak önerilmektedir.

Sonuç olarak, günümüzde halen Parkinson hastalığının tedavisinde sentetik KOMT inhibitörlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışma ile bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentetik türevleri yerine geçebilme potansiyeli olduğu tespit edilmiştir. Özellikle üzerlik tohumu alkaloidlerinin ve saflığı artırılmış zeytin yaprağı fraksiyonlarının umut vaat eden doğal KOMT inhibitörleri oldukları ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri olan alkaloid ve polifenolik bazlı doğal bileşikler için fonksiyonel kullanım olanakları bulunabildiği de bilinmektedir.

REFERANSLAR

- AKYOL O., 'Şizofrenide Oksidatif Stres', *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 15-25, (2004).
- AL-AZZAWİE H. F., Saeed A. M. S., 'Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Oleuropein in Alloxan-Diabetic Rabbits', *Life Sciences*, 78, 1371-1377, (2006).
- ALTIOK E., Baycin D., Bayraktar O., Ülkü S., 'Isolation of Polyphenols from the Extracts of Olive Leaves (*Olea europaea L.*) by Adsorption on Silk Fibroin', *Separation and Purification Technology*, 62, 342-348, (2008).
- ANGELOPOULOU D., Demetzos C., Perdetzoglou D., 'An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus L.* growing in Crete (Greece)', *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 405-415, (2001).
- AOYAMA N., Tsunoda M., Imai K., 'Improved Assay for Catechol-*O*-Methyltransferase Activity Utilizing Norepinephrine as an Enzymatic Substrate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection', *Journal of Chromatography A*, 1074, 47-51, (2005).
- BÄCKSTROM R., Honkanen E., Pippuri A., Kairisalo P., Pystynen J., Heinola K., Nissinen E., Linden I. B., Mlinnisto P. T., Kaakkola S., Pohto P., 'Synthesis of Some Novel Potent and Selective Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibitors', *Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 841-846, (1989).
- BAİ H. W., Shim J. Y., Yu J., Zhu B. T., 'Biochemical and Molecular Modeling Studies of the *O*-Methylation of Various Endogenous and Exogenous Catechol Substrates Catalyzed by Recombinant Human Soluble and Membrane-Bound Catechol-*O*-Methyltransferases', *Chemical Research in Toxicology*, 20, 1409-1425, (2007).
- BAİLEY K., Cowling R., Tan E. W., Webb D., 'A Colorimetric Assay for Catechol-*O*-Methyltransferase', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 595-601, (2004).
- BAİLEY K., Tan E. W., 'Synthesis and Evaluation of Bifunctional Nitrocatechol Inhibitors of Pig Liver Catechol-*O*-Methyltransferase', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 5740-5749, (2005).
- BAYÇIN D., Altıok E., Ülkü S., Bayraktar O., 'Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea L.*) Antioxidants on Silk Fibroin', *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1227-1236, (2007).
- BENHAMMOU N., Atik B. F., Kadifkova P. T., 'Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts', *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 22-28, (2008).
- BERTOLİNİ F., Novaroli L., Carrupt P. A., Reist M., 'Novel Screening Assay for Antioxidant Protection against Peroxyl Radical-Induced Loss of Protein Function', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 2931-2944, (2007).

- BONÍFACIO M. J., Palma P. N., Almeida L., Soares-da-Silva P., 'Catechol-*O*-Methyltransferase and Its Inhibitors in Parkinson's Disease', *CNS Drug Reviews*, 13, 352-379, (2007).
- BONÍFATÌ V., Meco G., 'New, Selective Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibitors as Therapeutic Agents in Parkinson's Disease', *Pharmacology & Therapeutics*, 81, 1-36, (1999).
- BONILLA M., Salido S., Beekb T., Linares-Palomino P. J., Altarejos J., Nogueras M., S'anchez A., 'Isolation and Identification of Radical Scavengers in Olive Tree (*Olea europaea*) Wood', *Journal of Chromatography A*, 1112, 311-318, (2006).
- CAVALLÌ A., Bolognesi M. L., Minarini A., Rosini M., Tumiatti V., Recanatini M., Melchiorre C., 'Multi-Target-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases', *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 347-372, (2008).
- CHATTERJEE S. S., Noldner M., Koch M., Erdelmeier C., 'Antidepressant Activity of *Hypericum Perforatum* and Hyperforin, the Neglected Possibility', *Pharmacopsychiatry*, 31, 7-15, (1998).
- CHEN D., Wang C. Y., Lambert J. D., Ai N., Welsh W. J., Yang C. S., 'Inhibition of Human Liver Catechol-*O*-Methyltransferase by Tea Catechins and Their Metabolites: Structure-Activity Relationship and Molecular-Modeling Studies', *Biochemical Pharmacology*, 69, 1523-1531, (2005).
- CHEN S., Le W., 'Neuroprotective Therapy for Parkinson's Disease', *American Journal of Therapeutics*, 13, 445-457, (2006).
- CHENG D. H., Ren H, Tang X. C., 'Huperzine A, a Novel Promising Acetylcholinesterase Inhibitor', *Neuroreport*, 8, 97-101, (1996).
- CHENG D. H., Tang X. C., 'Comparative Studies of Huperzine A, E2020, and Tacrine on Behavior and Cholinesterase Activities', *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 60, 377-386, (1998).
- CHIUEH C. C., Andoh T., Lai A. R., Lai E., Krishna G., 'Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease: Protection Against Progressive Nigral Damage Induced by Free Radicals', *Neurotoxicity Research*, 2, 293-310, (2000).
- CHUNG Y. K., Heo H. J., Kim E. K., 'Inhibitory Effect of Ursolic Acid Purified from *Origanum Majorana* L. on the Acetylcholinesterase', *Molecules and Cells*, 11, 137-143, (2001).
- COPELAND R. A., 'Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis', 2nd ed., Wiley, New York, (2000).
- DE BOER A. G., Gaillard P. J., 'Drug Targeting to the Brain', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 323-55, (2007).

- DE SANTI C., Giulianotti P. C., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G. M., 'Catechol-*O*-Methyltransferase: Variation in Enzyme Activity and Inhibition by Entacapone and Tolcapone', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 54, 215-219, (1998).
- DHAR K., Rosazza J. P. N., 'Purification and Characterization of *Streptomyces Griseus* Catechol-*O*-Methyltransferase', *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4877-4882, (2000).
- DİNGEMANSE J., 'Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibitors: Clinical Potential in the Treatment of Parkinson's Disease', *Drug Development Research*, 42, 1-25, (1997).
- ERDAL N., Erdal M. E., Çamdeviren H., Gökdoğan T., Herken H., 'Bir Grup Sağlıklı Gönüllüde Kateşol-*O*-Metiltransferaz (KOMT) Gen Polimorfizmi', *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 12, 174-178, (2002).
- ESPOSÍTO E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M., Algeri S., 'A Review of Specific Dietary Antioxidants and the Effects on Biochemical Mechanisms Related to Neurodegenerative Processes', *Neurobiology of Aging*, 23, 719-735, (2002).
- GARCÍA O. B., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del-Rio J. A., 'Antioxidant Activity of Phenolics Extracted From *Olea Europaea* L. Leaves', *Food Chemistry*, 68, 457-462, (2000).
- GHÍCA M. E., Brett A. M. O., 'Electrochemical Oxidation of Rutin', *Electroanalysis*, 17, 313-318, (2005).
- GOGOS J. A., Morgan M., Luine V., Santha M., Ogawa S., Pfaff D., Karayiorgou M., 'Catechol-*O*-Methyltransferase Deficient Mice Exhibit Sexually Dimorphic Changes in Catecholamine Levels and Behavior', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 9991-9996, (1998).
- GRELLA B., Dukat M., Young R., Teitler M., Herrick-Davis K., Gauthier C.B., Glennon R. A., 'Investigation of Hallucinogenic and Related *Beta*-Carbolines', *Drug and Alcohol Dependence*, 50, 99-107, (1998).
- GUGLER R., Dengler H. J., 'Inhibition of Human Liver Catechol-*O*-methyltransferase by Flavonoids', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 276, 223 – 233, (1973).
- GULDBERG H. C., Marsden C. A., 'Catechol-*O*-Methyl Transferase: Pharmacological Aspects and Physiological Role', *Pharmacological Reviews*, 27, 135-206, (1975).
- HALPERN J. H., 'Hallucinogens and Dissociative Agents Naturally Growing in the United States', *Pharmacology & Therapeutics*, 102, 131-138, (2004).

- HİRANO Y., Tsunoda M., Shimosawa T., Fujita T., Funatsu T., 'Measurement of Catechol-O-Methyltransferase Activity in the Brain of Dahl Salt-Sensitive Rats', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2178-2180, (2007).
- HOU W. C., Lin R. D., Chen C. T., Lee M. H., 'Monoamine Oxidase B (MAO-B) Inhibition by Active Principles from *Uncaria Rhynchophylla*', *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 216-220, (2005).
- HOUGHTON P. J., Houghton Howes M. J., 'Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease', *Neurosignals*, 14, 6-22, (2005).
- HOWES M. J. R., Perry N. S. L., Houghton P. J., 'Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders', *Phytotherapy Research*, 17, 1-18, (2003).
- JOY J. E., Watson J. H. J., Benson J. A., 'Marijuana and Medicine; Assessing the Science Base', National Academy Press, Washington, DC, (1999).
- JUMA G. M., 'Peganum Harmala Production', *European Journal of Scientific Research*, 11, 6-12, (2005).
- KADOWAKI M., Ootani E., Sugihara N., Furuno K., 'Inhibitory Effects of Catechin Gallates on O-Methyltranslation of Protocatechuic Acid in Rat Liver Cytosolic Preparations and Cultured Hepatocytes', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1509-1513, (2005).
- KARTAL M., Altun M. L., Kurucu S., 'HPLC Method for the Analysis of Harmol, Harmalol, Harmine and Harmaline in the Seeds of *Peganum Harmala* L.', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31, 263-269, (2003).
- KHAN O. Y., 'Studies in the Chemical Constituents of *Peganum Harmala*', Ph. D. Dissertation, University of Karachi, Pakistan, (1990).
- KONG L. D., Christopher H. K., Cheng H. K., Tan R. X., 'Inhibition of MAO-A and B by Some Plant-Derived Alkaloids, Phenols and Anthraquinones', *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 351-355, (2004).
- KÖSE E., Sarsılmaz M., Ögetürk M., Kub İ., Kavaklı A., Zararsız İ., 'Öğrenme Davranışlarında Gül Esans Yağ Aromasının Rolü: Deneysel Bir Çalışma', *Fırat Tıp Dergisi*, 12, 159-162, (2007).
- KURISAWA M., Chung, J. E., Uyama, H., Kobayashi, S., 'Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin)', *Biomacromolecules*, 4, 1394- 1399, (2003).
- KURKELA M., Siiskonen A., Finel M., Tammela P., Taskinen J., Vuorela P., 'Microplate Screening Assay to Identify Inhibitors of Human Catechol-O-Methyltransferase', *Analytical Biochemistry*, 331, 198-200, (2004).

- LAUTALA P., Ulmanen I., Taskinen J., 'Molecular Mechanisms Controlling the Rate and Specificity of Catechol-*O*-Methylation by Human Soluble Catechol-*O*-Methyltransferase', *Molecular Pharmacology*, 59, 393-402, (2001).
- LAUTALA P., 'Catechol *O*-Methyltransferase: Glucuronidation of Inhibitors and Methylation of Substrates', (Academic Dissertation), University of Helsinki, Finland, (2000).
- LAUTALA P., Ulmanen I., Taskinen J., 'Radiochemical High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Catechol-*O*-Methyltransferase Activity Towards Various Substrates', *Journal of Chromatography B*, 736, 143-151, (1999).
- LEARMONTH D. A., Bonifacio, M. J. Soares-da-Silva P., 'Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of "Ortho-Nitrated" Inhibitors of Catechol-*O*-Methyltransferase,' *Medicinal Chemistry*, 48, 8070-8078, (2005).
- LEARMONTH D. A., Freitas A. P., 'Chemical Synthesis and Characterization of Conjugates of a Novel Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibitor', *Bioconjugate Chemistry*, 13, 1112-1118, (2002).
- LEE-HUANG S., Zhang L., Huang P., Chang Y., Huang P. L., 'Anti-HIV Activity of Olive Leaf Extract (OLE) and Modulation of Host Cell Gene Expression by HIV-1 Infection and OLE Treatment', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 1029-1037, (2003).
- LERNER C., Masjost B., Ruf A., Gramlich V., Jakob-Roetne R., Zürcher G., Borroni E., Diederich F., 'Bisubstrate Inhibitors for the Enzyme Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT): Influence of Inhibitor Preorganisation and Linker Length Between The Two Substrate Moieties on Binding Affinity', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1, 42-49, (2003).
- LERNER C., Siegrist R., Schweizer E., Diederich F., 'Bisubstrate Inhibitors for the Enzyme Catechol *O*-Methyltransferase (COMT): Dramatic Effects of Ribose Modifications on Binding Affinity and Binding Mode', *Helvetica Chimica Acta*, 86, 1045-1062, (2003).
- LESKOVAC V., 'Comprehensive Enzyme Kinetics', Kluwer Academic Publisher, New York, (2003).
- LIN R. D., Hou W. C., Yen K. Y., Lee M. H., 'Inhibition of Monoamine Oxidase B (MAO-B) by Chinese Herbal Medicines', *Phytomedicine*, 10, 650-656, (2003).
- LOTTA T., Vidgren J., Tilgmann C., Ulmanen I., Melen K., Julkunen I., Taskinentn J., 'Kinetics of Human Soluble and Membrane-Bound Catechol-*O*-Methyltransferase: A Revised Mechanism and Description of the Thermolabile Variant of the Enzyme', *Biochemistry*, 34, 4202-4210, (1995).

- LOUREIRO A. I., Bonifácio M. J., Fernandes-Lopes C., Almeida L., Wright L. C., Soares-da-Silva P., 'Human Metabolism of Nebicapone (BIA 3-202), A Novel COMT Inhibitor: Characterization of in Vitro Glucuronidation', *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 1856-1862, (2006).
- LOZANO A. M., Lang A. E., Hutchison W. D., Dostrovsky J. O., 'New Developments in Understanding the Etiology of Parkinson's Disease and in its Treatment', *Current Opinion in Neurobiology*, 8, 783-790, (1998).
- MAMEDOV N., 'Adaptogenic, Geriatric, Stimulant and Antidepressant Plants of Russian Far East', *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 71-75, (2005).
- MANNISTÖ P. T., Kaakkola S., 'Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors', *Pharmacological Reviews*, 51, 593-628, (1999).
- MANNISTÖ P. T., Tuomainen P., Tuominen R. K., 'Different in Vivo Properties of Three New Inhibitors of Catechol-*O*-Methyltransferase in the Rat', *British Journal of Pharmacology*, 105, 569-574, (1992).
- MANYAM B. V., Dhanasekaran M., Hare T. A., 'Effect of Antiparkinson Drug HP-200 (*Mucuna pruriens*) on the Central Monoaminergic Neuro-Transmitters', *Phytotherapy Research*, 18, 97-101, (2004).
- MOLCHANOV L. V., Plugar V. N., D'yakonov A. L., Aripov K. N., 'Isolation of Peganine and Deoxypeganine from the Total Alkaloids of *Peganum Harmala* Through Their Complex Salts', *Chemistry of Natural Compounds*, 32, 56-58, (1996).
- NADEAU S. E., 'Parkinson's Disease', *Journal of American Geriatrics Society*, 45, 233-240, (1997).
- NAGAI M., Conney A. H., Zhu B. T., 'Strong Inhibitory Effects of Common Tea Catechins and Bioflavonoids on the *O*-Methylation of Catechol Estrogens Catalyzed by Human Liver Cytosolic Catechol-*O*-Methyltransferase', *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 497-504, (2004).
- NISSINEN E., Lindén I. B., Schultz E., Pohto P., 'Biochemical and Pharmacological Properties of a Peripherally Acting Catechol-*O*-Methyltransferase Inhibitor Entacapone', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 346, 262-266, (1992).
- NISSINEN E., Linden I. B., Schultz E., Kaakkola S., Mannisto P. T., Pohto P., 'Inhibition of Catechol-*O*-Methyltransferase Activity by Two Novel Disubstituted Catechols in the Rat', *European Journal of Pharmacology*, 153, 263-269, (1988).
- OLIN J., Schneider L., 'Galantamine of Alzheimer's disease', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, (2001a).

- OLIN J., Schneider L., 'Galantamine for Alzheimer's disease: Adult and Geriatric Treatment and Preventative Interventions Branch', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, (2001b).
- ONO M., Yamasaki T., Konoshita M., Ikeda T., Okawa M., Kinjo J., Yoshimitsu H., Nohara T., 'Five New Diterpenoids, Viteagnusins A - E, from the Fruit of *Vitex agnus-castus*', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 1621-1624, (2008).
- OTT, J., 'Entheogenic Drugs, Their Plant Sources and History', *Pharmactheon*, 205, (1996).
- PAGE L., 'Olive Leaf Extract', in *Healthy Healing*, edited by Page L. G. (Traditional Wisdom, USA), 107, (2002).
- PALMA P. N., Rodrigues M. L., Archer M., Bonifacio M. J., Loureiro A. I., Learmonth D. A., Carrondo M. A., Soares-da-Silva P., 'Comparative Study of *ortho*- and *meta*-Nitrated Inhibitors of Catechol-*O*-methyltransferase: Interactions with the Active Site and Regioselectivity of *O*-Methylation', *Molecular Pharmacology*, 70, 143-153, (2006).
- PAULINI R., Lerner C., Diederich F., Jakob-Roetne R., Zürcherb G., Borroni E., 'Synthesis and Biological Evaluation of Potent Bisubstrate Inhibitors of the Enzyme Catechol *O*-Methyltransferase (COMT) Lacking a Nitro Group', *Helvetica Chimica Acta*, 89, 1856-1887, (2006).
- PEKİN B., 'Bazı Kompleks Enzim Reaksiyonları ile İnhibisyon Mekanizmalarının Matematiksel Analizi', *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmî Raporlar Serisi*, Vol: 85, (1970).
- PERRY E. K., Pickering A. T., Wang W. W., Houghton P. J., Perry N. S., 'Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: From Ethnobotany to Phytotherapy', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 527-34, (1999).
- PERRY N. S. L., Houghton P. J., Jenner P., '*Salvia Lavandulaefolia* Essential Oil Inhibits Cholinesterase in Vivo', *Phytomedicine*, 9, 48-51, (2002).
- POLYMEROPOULOS M. H., Higgins J. J., Golbe L. I., Nussbaum R. L., 'Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23', *Science*, 274, 1197-1198, (1996).
- PROESTOS C., Komaitis M., 'Ultrasonically Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Aromatic Plants Comparison with Conventional Extraction Techniques', *Journal of Food Quality*, 29, 567-582, (2006).
- RANALLI A., Contento, S., Lucera, L., Febo, M., Archegiani, D., Fonzo V., 'Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.)', *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 434-440, (2006).

- REENİLÄ I., ‘*Catechol-O-Methyltransferase Activity: Assay, Distribution and Pharmacological Modification*’, (Academic Dissertation), University of Helsinki, Finland, (1999).
- ROSENBERG I.M., *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, Birkhäuser, Boston, (1996). Pp: 110-117.
- RUOTTINEN H. M., Rinne U. K., ‘COMT Inhibition in the Treatment of Parkinson’s Disease’, *Journal of Neurology*, 245, 25-34, (1998).
- SALYAN M. E. K., Pedicord D. L., Bergeron L., Mintier G. A., Hunihan L., Kuit K., Balanda L. A., Robertson B. J., Feder J. N., Westphal R., Shipkova P. A., Blat Y., ‘A General Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy-Based Assay for Detection and Quantitation of Methyltransferase Activity’, *Analytical Biochemistry*, 349, 112-117, (2006).
- SAVOURNIN C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., Balansard G., ‘Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves’, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 618-621, (2001).
- SCHLIEBS R., Liebmann A., Bhattacharya S. K., Kumar A., Ghosal S., Bigl V. R., ‘Systemic Administration of Defined Extracts from *Withania Somnifera* (Indian Ginseng) and Shilajit Differentially Affects Cholinergic but not Glutamatergic and Gabaergic Markers in Rat Brain’, *Neurochemistry International*, 30, 181-190, (1997).
- SCHWARZ M. J., Houghton P. J., Rose S., Jenner P., Lees A. D., ‘Activities of Extract and Constituents of *Banisteriopsis Caapi* Relevant Parkinsonism’, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 627-633, (2003).
- SHARAF M., El-Ansari M. A., Matlin S. A., Sale N. A. M., ‘Four Flavonoid Glycosides from *Peganum Harmala*’, *Phytochemistry*, 44, 533-536, (1997).
- SHEN X., Puthran N., Weissman A., ‘A Refined HPLC Method to Measure Catecholamine-O-Methyltransferase Activity in Selected Brain Regions’, *Journal of Neuroscience Methods*, 144, 137-142, (2005).
- SHEU J. R., Hsiao G., Chou P. H., Shen M. Y., Chou D. S., ‘Mechanisms Involved in the Antiplatelet Activity of Rutin, Glycoside of the Flavonol Quercetin, in Human Platelets’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4414-4418, (2004).
- SHULER M. L., Kargı F., ‘*Bioprocess Engineering: Basic Concepts*’, 2nd ed., Prentice Hall PTR, (2001).
- SINGH N., Pillay V, Choonara Y. E., ‘Advances in the Treatment of Parkinson’s Disease’, *Progress in Neurobiology*, 81, 29-44, (2007).

- SIRONIAN N. A., Coyle J. T., 'Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 83-106, (1996).
- SLOLEY B. D., Urichuk L. J., Morley P., Durkin J., Shan J. J., Pang P. K., Coutts R. T., 'Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of *Ginkgo Biloba* Leaves', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 451-459, (2000).
- SOMOZA B., Sanchez de Rojas V. R., Ortega T., Villar A. M., 'Vasodilator effects of the extract of the leaves of *Cistus populifolius* on rat thoracic aorta', *Phytotherapy Research*, 10, 304-308, (1996).
- SRIVASTAVA S., Verma R. K., Gupta M. M., Singh S. C., Kumar S., 'HPLC Determination of Vasicine and Vasicinone in *Adhatoda Vasica* with Photo Diode Array Detection', *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24, 153-159, (2001).
- SUDHA K., Rao A. V., Rao S., Rao A., 'Free Radical Toxicity and Antioxidants in Parkinson's Disease', *Neurology India*, 51, 60-62, (2003).
- SUKYİN A., Catechol-*O*-Methyltransferase (COMT) Gene and Breast Cancer, Technical Report, National Office of Public Health Genomics, (2002).
- SUMIO O., 'The Physiological Function of the Blood-Brain Barrier Transporters as the CNS Supporting and Protecting System', *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 124, 791-802, (2004).
- THEODORE L. S., "Rational Hope" in the Early Treatment of Parkinson's Disease', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77, 375-382, (1999).
- TOPÇU G., Ay M., Bilici A., Sarıkürkçü C., Öztürk M., Ulubelen A., 'A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*', *Food Chemistry*, 103, 816-822, (2007).
- TSUNODA T., Takezawa K., Masuda M., Imai K., 'Rat Liver and Kidney Catechol-*O*-Methyltransferase Activity Measured by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection', *Biomedical Chromatography*, 16, 536-541, (2002).
- VAN DUURSEN M. B. M., Sanderson J. T., de Jong P. C., Marlies K., Van den Berg M., 'Phytochemicals Inhibit Catechol-*O*-Methyltransferase Activity in Cytosolic Fractions from Healthy Human Mammary Tissues: Implications for Catechol Estrogen-Induced DNA Damage', *Toxicological Sciences*, 81, 316-324, (2004).
- VESER J., 'Kinetics and Inhibition Studies of Catechol *O*-Methyltransferase from the Yeast *Candida tropicalis*', *Journal of Bacteriology*, 169, 3696-3700, (1987).

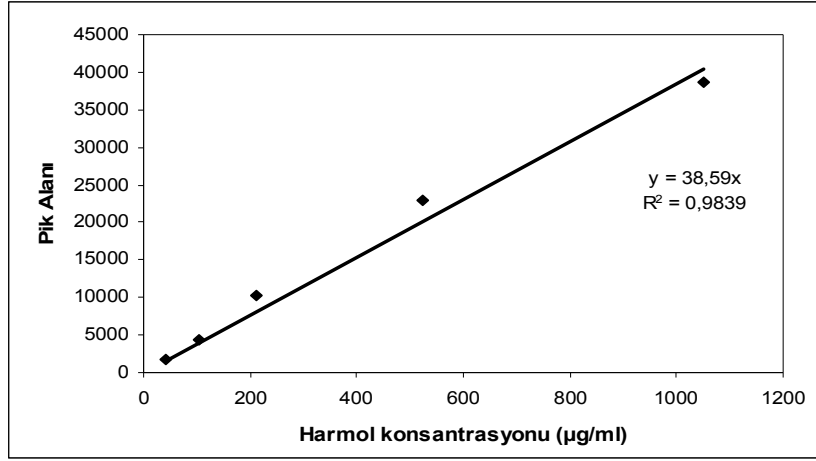
- VIERIA-COELHO M. A., Soares-da-Silva P., 'Ontogenic Aspects of Liver and Kidney Catechol-*O*-Methyltransferase Sensitivity to Tolcapone', *British Journal of Pharmacology*, 117, 516-520, (1996).
- YASSIN M. S., Cheng H., Ekblom J., Orelund L., 'Inhibitors of catecholamine metabolizing enzymes cause changes S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat brain', *Neurochemistry International*, 32, 53-59, (1998).
- WAIDMEIER P. C., Baumann P. A., Feldtrauer J. J., Hauser K., Bittiger H., Bischoff S., Sprecher G., 'CGP 28014 a New Inhibitor of Cerebral Catechol-*O*-Methylation with a Non-Catechol Structure', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 342, 305-311, (1990).
- WAKE G., Court J., Pickering A., 'CNS Acetylcholine Receptor Activity', *Ethnopharmacology*, 69, 105-14, (2000).
- WEB_1, 'Elemtere Fis, Anadolu'da Buyu ve Inanclar', İstanbul, Akalın S. H., "Uzerlik", http://turkoloji.cu.edu.tr/CUKUROVA/sempozyum/semp_2/akalin.pdf, (2003).
- WEB_2, Institute of Neurodegenerative Diseases, University of California, <http://ind.universityofcalifornia.edu/diseases>
- WEB_3, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, http://www.ninds.nih.gov/disorders/parkinsons_disease/parkinsons_disease.htm
- WEB_4, National Parkinson Foundation, <http://www.parkinson.org>
- WEB_5, Parkinson's Disease Society, www.parkinsons.org.uk
- WEB_6, Pierce Biotechnology, Inc., Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Kit, <http://www.piercenet.com>
- WEINREB O., Mandel S., Amit T., Youdim M. B. H., 'Neurological Mechanisms of Green Tea Polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's Diseases', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 506-516, (2004).
- ZHANG R. W., Tang X. C., Han Y. Y., 'Drug Evaluation of Huperzine A in the Treatment of Senile Memory Disorders', *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 12, 250-252, (1991).
- ZHENG W., Chodobski A., 'The Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier', CRC Press, Florida, (2004).
- ZHU B. T., Shim J. Y., Nagai M., Bai H. W., 'Molecular Modelling Study of the Mechanism of High-Potency Inhibition of Human Catechol-*O*-Methyltransferase by (-)-Epigallocatechin-3-*O*-Gallate', *Xenobiotica*, 38, 130-146, (2008).
- ZHU B. T., 'CNS Dopamine Oxidation and Catechol-*O*-Methyltransferase: Importance in the Etiology, Pharmacotherapy, and Dietary Prevention of Parkinson's Disease', *International Journal of Molecular Medicine*, 13, 343-353, (2004).

ZHU B. T., Patel U. K., Cai M. X., Lee A. J., Conney A. H., 'Rapid Conversion of Tea Catechins to Monomethylated Products by Rat Liver Cytosolic Catechol-*O*-Methyltransferase', *Xenobiotica*, 31, 879-890, (2001).

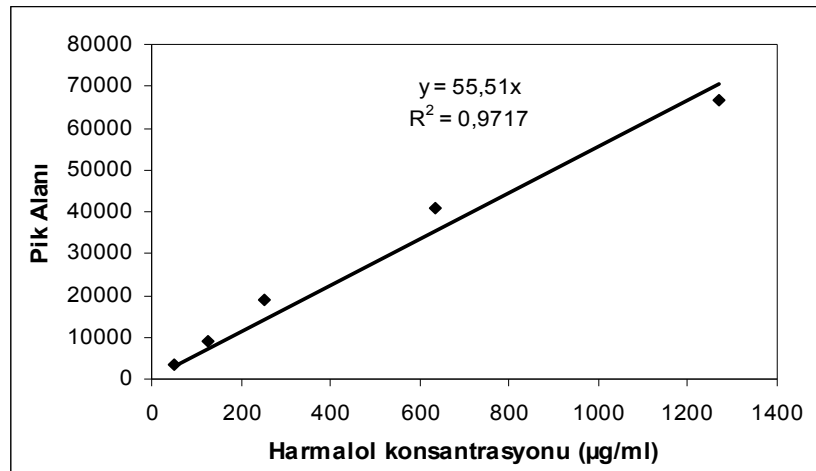
EKLER

EK-A Alkaloitlere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Örnek Hesaplama

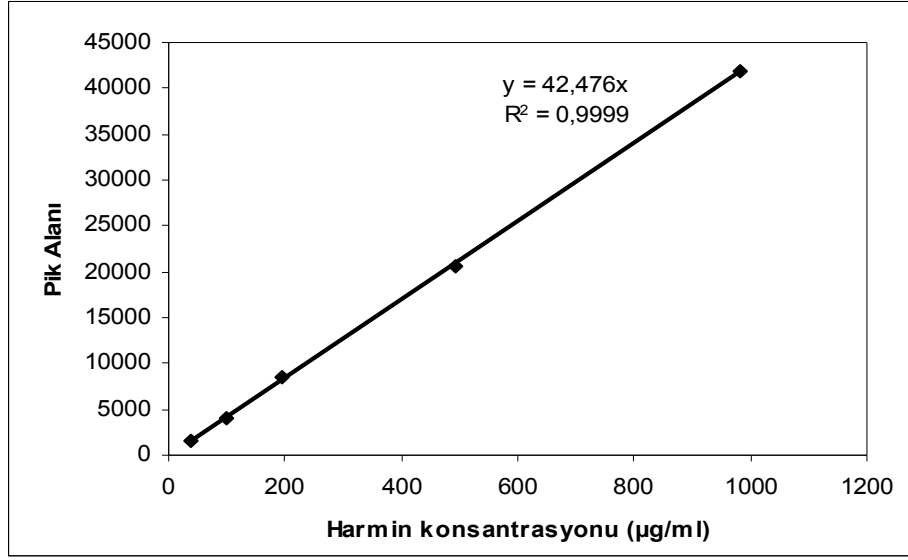
Üzerlik bitkisi tohumundan elde edilen özüt içerisinde harmol, harmalol, harmin ve harmalin alkaloidleri bulunduğu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) analizleri sonucu tespit edilmiştir. Bu alkaloidlerin kantifikasyonlarını belirlemek amacıyla standartları ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Her bir standart alkaloidin kalibrasyonu için bölüm 5.1.1.-Tablo 5-3’de verilen konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlarda yapılan YPSK analizleri sonucu elde edilen kromatogramlardaki pik alanları konsantrasyonun doğrusal bir fonksiyonu olarak modellenmiştir.



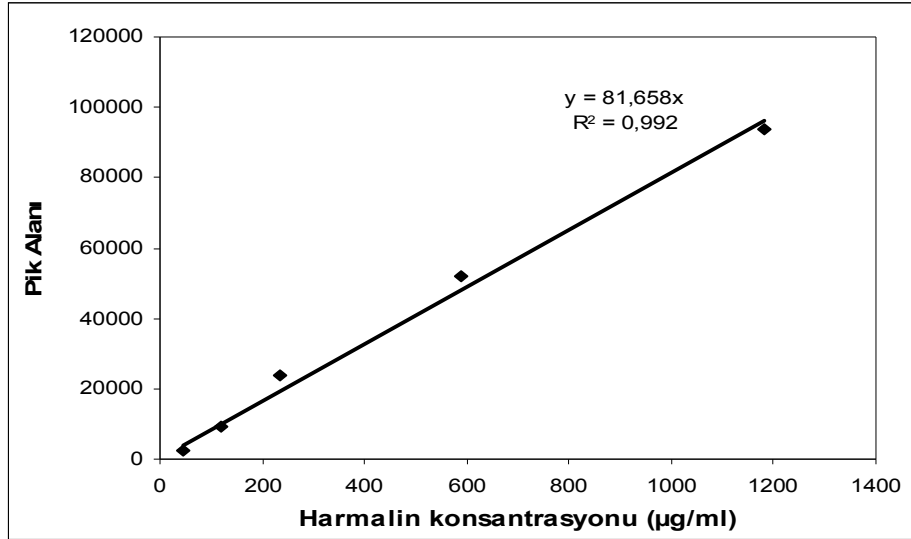
Şekil A1. Harmol kalibrasyon eğrisi



Şekil A2. Harmalol kalibrasyon eğrisi



Şekil A3. Harmin kalibrasyon eğrisi



Şekil A4. Harmalin kalibrasyon eğrisi

Bölüm 5.1.1. Şekil 5-1’de belli oranda seyreltilmiş (7 kat) özüt için yapılan YPSK analizi sonucu elde edilen kromatogram verilmiştir. Buna göre alkaloidler için kuantifikasyon hesaplaması yapılmış ve ekstraksiyon verimi, özüt içerisindeki alkaloid miktarları gibi parametreler bu hesaplamalar sonucunda belirlenmiştir.

Örnek Hesaplama: Toplam 165,76 mg ekstre 20 ml mobil fazda çözülmüş ve 7 kat seyreltilmiştir. Seyreltik örnek filtre edildikten sonra 20 µl enjeksiyon hacmi ile YPSK sistemine enjekte edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda;

Harmin pikinin kromatogram üzerinde yarattığı alan 20829 olarak bulunmuştur. Şekil A3'te verilen kalibrasyon eğrisi eşitliği $y=42,476x$ kullanılarak x değeri (konsantrasyon, µg/ml) hesaplanmıştır.

$$x = \frac{20829}{42,476} = 490,4 \text{ µg/ml'dir. Bu değer, toplam hacim*seyreltme faktörü ile}$$

çarpılıp harmin alkaloidinin özüt içerisindeki miktarı µg cinsinden hesaplanmıştır.

Harmin içeriği (mg harmin/165,76 mg özüt) = $\frac{490,4 * 20 * 7}{1000} = 68,7$ mg harmin. Bu hesaplama sonucunda özütün yaklaşık % 41 oranında harmin içerdiği hesaplanmıştır.

Harmalin, harmol ve harmalol alkaloidlerinin özüt içerisindeki miktarları da yine aynı hesaplama yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre, özüt içerisindeki harmol ve harmalol alkaloidlerinin kromatogram üzerinde yarattıkları alan dedeksiyon limitlerinin altında kaldığından dolayı hesaplanamamıştır. Harmalin içeriği ise 97,1 mg olarak bulunmuştur. Yüzde olarak ham alkaloid özütünün harmalin içeriği yaklaşık % 58 olarak bulunmuştur. Geri kalan kısımlarını ise harmol, harmalol ve tanımlanamayan diğer alkaloid türevi olduğu düşünülmektedir.

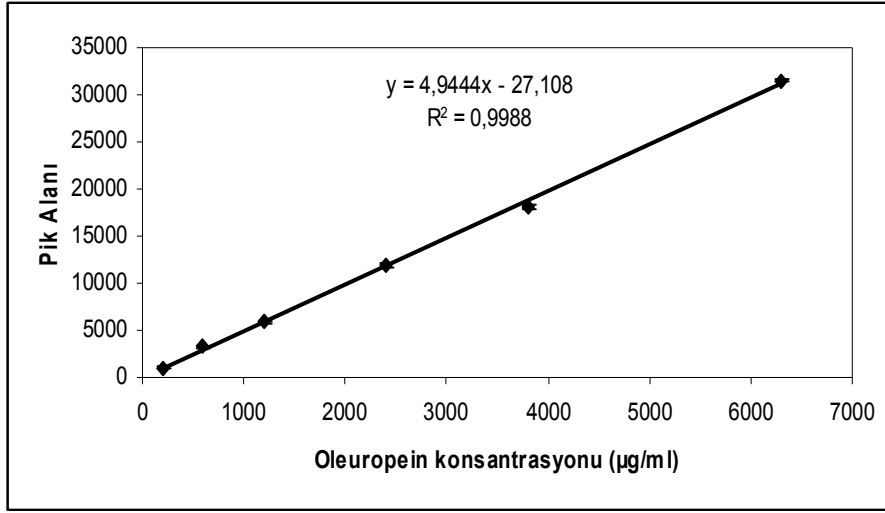
Bu ekstraksiyon metodunda başlangıçta 2500 mg toz hale getirilmiş üzerlik tohumu kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonucunda 165,76 mg ham alkaloid özütü elde edilmiştir. Buna göre;

$$\text{Ekstraksiyon verimi, mg alkaloid/mg tohum (\%)} = \frac{165,76 * 100}{2500} = \% 6.63 \text{ olarak}$$

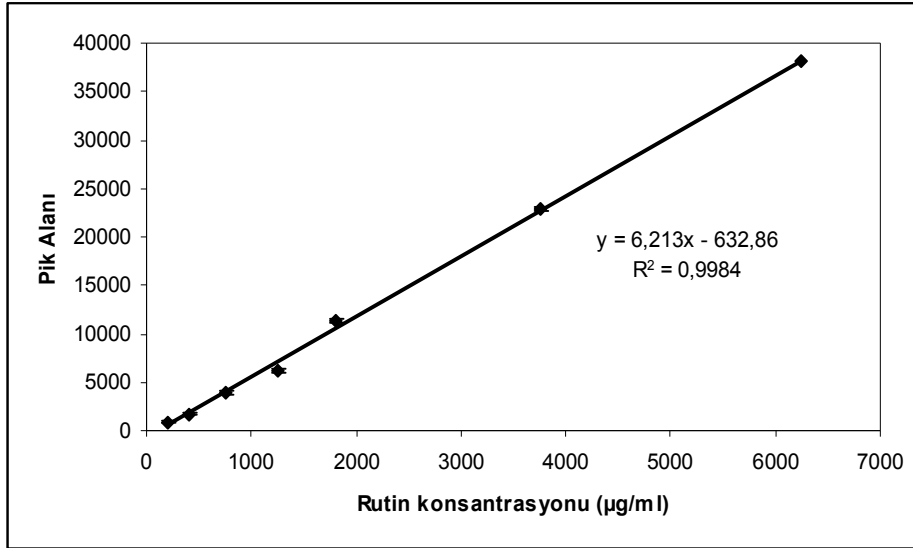
hesaplanmıştır.

EK-B Oleuropein ve Rutine Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Örnek Hesaplama

Alkaloit özütündeki alkaloitlerin miktarlarını belirlerken olduğu gibi, zeytin yaprağı özütü içerisindeki oleuropein ve rutin miktarları YPSK analizi sonuçlarından elde edilmiş pik alanı değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil B1. Oleuropein kalibrasyon eğrisi



Şekil B2. Rutin kalibrasyon eğrisi

Örnek Hesaplama:

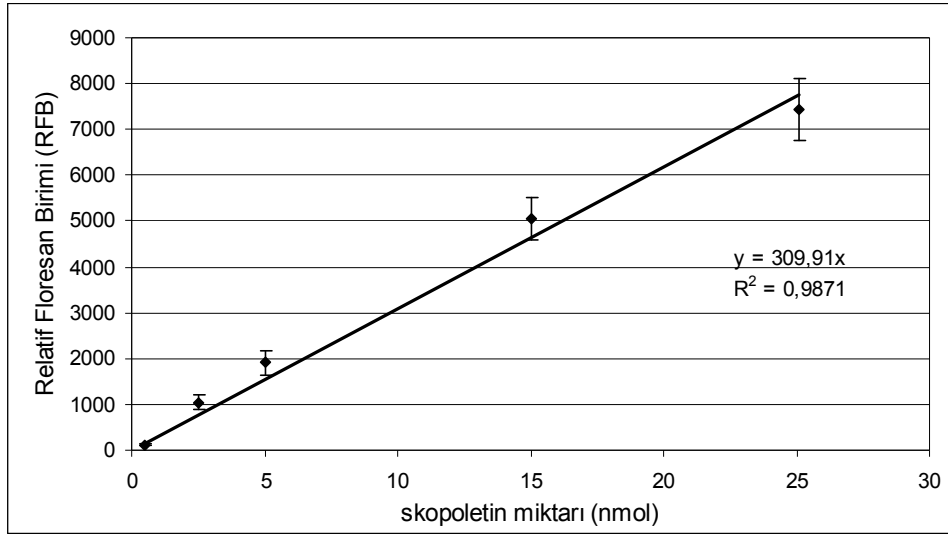
Bir gram zeytin yaprağı tozu 1/20 katı-sıvı oranında ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ham özütün YPSK analizi sonucuna göre, oleuropein pik alanı 22815 olarak hesaplanmıştır. Şekil B1 'de verilen kalibrasyon eğrisi eşitliği $y=4,9444x-27,108$ kullanılarak x değeri (konsantrasyon, $\mu\text{g/ml}$) hesaplanmıştır.

$$x = \frac{22815 + 27,108}{4,9444} = 4624 \mu\text{g/ml}'\text{dir. Bu değer, toplam ekstraksiyon hacmi (20 ml)}$$

ile çarpılıp mg cinsinden bir gram zeytin yaprağı içerisindeki oleuropein miktarı hesaplanmıştır. Buna göre, bir gram zeytin yaprağının 92,5 mg oleuropein ve benzer şekilde rutin için yapılan hesaplamalar sonucu 9,12 mg rutin içerdiği hesaplanmıştır.

EK-C Skopoletine Ait Kalibrasyon Eğrisi ve Örnek Hesaplama

Florometrik enzim aktivite tayini metoduna göre KOMT tarafından katalizlenen *O*-metillenme reaksiyonu sonucunda eskuletin skopoletine dönüşmektedir. Kendi başına da floresan özelliği bulunan skopoletin reaksiyon sonucundaki oluşma miktarı 355 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. Reaksiyon ortamına farklı miktarlardaki skopoletin eklenmesi ile floresan değerlerinde artış sağlanmış ve bu sayede kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil C1).



Şekil C1: Skopoletin kalibrasyon eğrisi

Şekil C1'de verilen kalibrasyon eğrisinin eğimi 309,91 olarak hesaplanmıştır. Bu değer bir nanamol skopoletin 309,91 birim floresana özdeş olduğunu göstermiş ve aktivite hesaplamalarında kullanılmıştır.

Örnek Hesaplama:

Örneğin florometrik metot ile gerçekleştirilen inhibisyon deneylerinde kör çözelti floresan değişimi (Δ_{RFB}) 30 dakikalık reaksiyon süresi için 20,282 olarak bulunmuştur. 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirilen toplam 250 μ l hacimdeki reaksiyon ortamında 2,2 μ g protein bulunmaktadır. Buna göre reaksiyon hızı;

$$v = \frac{\Delta_{RFB}}{(309,91)(30)(0,0022)} = \frac{20,282}{(309,91)(30)(0,0022)} = 0,9916 \text{ nmole skopoletin /dak. mg protein}$$

olarak hesaplanmaktadır.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 107M307
Proje Başlığı: Kateşol-O-Metiltransferaz (KOMT) Enzim Aktivitesinin Bitkilerden Elde Edilen Bazı Alkaloitler ve Fenollerle Engellenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Oğuz Bayraktar
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Gülbahçe Kampüsü Kimya Mühendisliği Bölümü, PK: 35340 Urla, İZMİR.
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Grubu Atatürk Bulvarı No:221, PK: 06100 Kavaklıdere, ANKARA.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Başlangıç: 01/11/2007, Bitiş: 01/11/2009
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada, Parkinson Hastalığı'na neden olduğu bilinen yüksek KOMT enzimi aktivitesinin, antioksidan, antimikrobiyal ve antikarsinojenik özelliklere sahip olan zeytin yaprağı polifenoller ve üzerlik tohumu alkaloitleri ile inhibe edilebilme potansiyelleri araştırılmıştır. Bu amaca uygun olarak, bitkilerden elde edilen özütler ham özüt halinde ve fraksiyonlarına ayrılarak inhibisyon çalışmalarında kullanılmıştır. Doğal inhibitörler ile elde edilen sonuçlar, bilinen en iyi sentetik KOMT inhibitörünün performansı ile kıyaslanmış olup bu inhibitörler için elde edilen inhibisyon sabiti verileri literatüre kazandırılmıştır.
Anahtar Kelimeler: KOMT, İnhibisyon, Alkaloitler, Fenoller, Parkinson Hastalığı
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Science Citation Index (SCI) Yayınlar: YALÇIN D., Bayraktar O., Inhibition of catechol-O-methyltransferase (COMT) by some plant-derived alkaloids and phenolics, <i>Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic</i> , doi no:10.1016/j.molcatb.2009.04.014. Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar: YALÇIN D., Bayraktar O., Screening of Some Plant-Derived Alkaloids and Phenolics for Catechol-O-Methyltransferase Inhibition, <i>International Journal of Natural and Engineering Sciences</i> , 3, 2, 21-25, 2009.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan

Bildiriler:

1) YALCIN D., Bayraktar O., Inhibition of Catechol-O-methyltransferase (COMT) by Some Plant-Derived Alkaloids and Phenolics, International Enzyme Engineering Symposium, Aydın-Türkiye (2008) pp: 40.

2) YALCIN D., Bayraktar O., Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Polyphenols: As a Multifunctional Bioactive Compounds, 5th International Conference on Polyphenol Applications: Malta Polyphenols, St. Julians-Malta (2009) pp: 40-41.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan

Bildiriler:

1) YALÇIN D., Bayraktar O., Kateşol-O-metiltransferaz (KOMT) enzim aktivitesinin bitkilerden elde edilen bazı alkaloid ve fenollerle engellenmesi, XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, Nevşehir-Türkiye, Vol:33, (2008) pp: 82-83.

2) YALÇIN D., Bayraktar O., Bitkilerden Elde Edilen Alkaloid ve Fenollerin Kateşol-O-Metiltransferaz İnhibisyonu Amacıyla Taranması, IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), İzmir-Türkiye (2008) pp: 17-18.

Tez(ler):

YALCIN D., Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Enzyme Activity by Some Plant-Derived Alkaloids and Phenols, (M. Sc.), Izmir Institute of Technology, Urla-Izmir, Turkiye, 2009 (Savunma sunumu yapılacaktır).