

Vişne Meyvesinin Üreaz, Kimotripsin ve Tripsin Enzimleri Üzerine Etkisi *

Effect of Sour Cherry Fruit on Urease, Chymotrypsin and Trypsin Enzymes

Tuğba Aydınⁱ, Tuğba Günbatanⁱⁱ, Alper Gökbulutⁱⁱⁱ

ⁱUzman Dr., Ankara Etlik Şehir Hastanesi, Aile Hekimliği Kliniği, <https://orcid.org/0000-0003-3508-1456>

ⁱⁱDr. Öğr. Üyesi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi A.D., <https://orcid.org/0000-0002-1138-3145>

ⁱⁱⁱDoç. Dr., Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi A.D., <https://orcid.org/0000-0001-8657-6016>

Öz

Amaç: Bu çalışmada vişne meyvesinin (*Prunus cerasus* L.) üreaz, kimotripsin ve tripsin inhibe edici aktivitesinin tespiti amaçlanmıştır. **Yöntem:** 2024 yılı Temmuz ve 2025 Ocak ayları arasında gerçekleştirilen bu çalışmada Ankara'nın Çubuk ilçesinden toplanan vişne meyvelerinden %80 etanol ekstresi hazırlanmış ve hazırlanan ekstre sırasıyla *n*-hekzan, kloroform, etil asetat ve *n*-bütanol ile fraksiyonlanmıştır. Daha sonra elde edilen ekstre ve fraksiyonların in vitro üreaz, kimotripsin ve tripsin inhibe edici aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca etanol ekstresi ve en kuvvetli aktivitenin gözlemlendiği etil asetat fraksiyonunun fenolik içeriği YPSK (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Etil asetat, *n*-bütanol ve kalan su fraksiyonları tripsin enzimini %95'ten yüksek oranlarda inhibe etmiştir. Yine benzer şekilde en kuvvetli kimotripsin ve üreaz inhibe edici aktivite etil asetat fraksiyonunda gözlemlenmiştir (sırasıyla %84,07 ve %42,36 inhibisyon). YPSK analizi ile etanol ekstresinin sırasıyla %0,1082 ve %0,0512 oranlarında; etilasetat fraksiyonunun ise sırasıyla %0,165 ve %0,079 oranında klorojenik asit ve rutin içerdiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Vişne meyvesinden elde edilen %80 etanol ekstresi ve farklı fraksiyonların üreaz, kimotripsin ve tripsin enzimlerine karşı inhibitör etkileri ilk kez değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, özellikle etil asetat fraksiyonunun bu enzimler üzerinde yüksek inhibe edici aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. YPSK analizi hem etanol ekstresinde hem de etil asetat fraksiyonunda klorojenik asit ve rutin gibi fenolik bileşiklerin bulunduğunu ve bu bileşiklerin inhibisyon aktivitesine katkı sağlayabileceğini göstermiştir. Bu doğrultuda, vişne meyvesinin ülser, obezite ve pankreatit gibi inflamatuvar hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde kullanılabilecek doğal üreaz ve serin proteaz inhibitörü adayları arasında değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kimotripsin, Klorojenik asit, *Prunus cerasus*, Rutin, Tripsin, Üreaz

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to determine urease, chymotrypsin, and trypsin inhibitory activity of sour cherry.

Method: In this study, which was conducted between July 2024 and January 2025, 80% ethanol extract was prepared from sour cherry fruits collected from Çubuk district (Ankara), and fractionated with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol. Then, urease, chymotrypsin, and trypsin inhibitory activities of extracts and fractions were determined. Additionally, phenolic content of ethanol extract and ethyl acetate fraction, the strongest activity was observed, were analyzed by HPLC.

Results: Ethyl acetate, *n*-butanol, and remaining water fractions inhibited trypsin enzyme by more than 95%. Similarly, the strongest chymotrypsin and urease inhibitory activity was observed in ethyl acetate fraction (%84,07 and 42,36% inhibition, respectively). HPLC analysis revealed that ethanol extract contained 0,1082% and 0,0512% chlorogenic acid and rutin, respectively, while ethyl acetate fraction contained 0,165% and 0,079% chlorogenic acid and rutin, respectively.

Conclusion: The inhibitory effects of ethanol extract and different fractions obtained from sour cherry fruit against urease, chymotrypsin, and trypsin were evaluated for the first time. The findings revealed that especially ethyl acetate fraction showed high inhibitory activity on these enzymes. HPLC analysis shows that chlorogenic acid and rutin are present in ethanol extract and ethyl acetate fraction, and these compounds may contribute to inhibitory activity. Accordingly, it was thought that sour cherry fruit could be evaluated among natural urease and serine protease inhibitor candidates that can be used in prevention or treatment of ulcers, obesity, and inflammatory diseases such as pancreatitis.

Keywords: Chlorogenic acid, Chymotrypsin, *Prunus cerasus*, Rutin, Trypsin, Urease

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi 2025;15(3):1010-1020

DOI: 10.31020/mutfd.1655052

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 11.03.2025; Kabul Tarihi- Accepted: 18.07.2025

İletişim- Correspondence Author: Tuğba Günbatan <tugbagunbatan@gazi.edu.tr>



Bu derginin içeriği Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License kapsamında lisanslanmıştır.

Giriş

Vişne meyvesi (*Prunus cerasus* L., Rosaceae) polifenol bakımından oldukça zengindir. Antosiyaninler, flavan-3-oller [(+)-kateşin, (-)-epikateşin] ve hidroksisinnamik asitler vişne meyvesinde bulunan üç ana fenolik gruptur. Kirazdan daha yüksek oranda prosiyanidin, flavonol glikozit ve flavanol içermektedir. Esas olarak siyanidin-3-glukozilrutinozit bulunmakla birlikte siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinosit, siyanidin-3-soforozit, peonidin-3-glikozit, malvinidin-3-glikozit, delfinidin-3-glikozit, pelargonidin-3-glikozit, siyanidin-3-arabinozilrutinozit, siyanidin-3-gentiobiozit ve peonidin-3-rutinozit vişnede bulunan diğer antosiyaninlerdir. Rutin, kersetin-3-glukozit-diramnozit, kersetin-3-galaktozit, isoramnetin-3-O-rutinozit-7-ramnozit, kersetin-3-glukozit, kersetin-3-rutinozit, kemferol-3-rutinozit ve izoramnetin-3-rutinozit büyük oranda bulunan flavonollerdir; hidroksisinnamik asit türevleri olarak neoklorojenik asit, klorojenik asit, kafeoilkinik asit ve *p*-kumaroilkinik asit taşımaktadır. Polifenolik bileşiklerin yanı sıra, selüloz, pektin ve lignin gibi karbonhidratlar, C vitamini ve potasyum açısından da zengin bir içeriğe sahip olması, vişne meyvesini besin değeri açısından da önemli kılmaktadır.¹

Rawling ve arkadaşları tarafından tasarlanan MEROPS peptidaz veri tabanına göre proteazlar katalitik mekanizmaya dayalı olarak klanlara ve ortak ataya dayalı ailelere ayrılmaktadır.² Bilinen tüm proteolitik enzimlerin üçte birinden fazlası, 13 klan ve 40 aile altında toplanan serin proteazlardır (EC 3.4.21). Bu enzim ailesinin adı, bir açıl-enzim ara maddesi oluşturmak üzere substrat peptit bağının karbonil kısmına nükleofilik atak yapan enzim aktif bölgesindeki serin amino asidinden kaynaklanmaktadır. Serin proteazlar birçok viral genom dahil olmak üzere hücrel yaşamın tüm alemlerinde bulunur.³ Bu proteaz sınıfı, sindirim enzimlerini (tripsin ve kimotripsin), lökosit proteazları, pıhtılaşma, fibrinoliz ve kompleman aktivasyonunda rol oynayan birçok enzimi içermektedir. Fonksiyonları çok geniştir ve bunlardan bazıları protein metabolizması, sindirim, kan pıhtılaşması, apoptoz, gelişim ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, döllenme gibi oldukça önemlidir.⁴ Serin proteazlar (nötrofil elastaz, proteinaz 3, ve katepsin G gibi) aktive edilmiş lökositlerden ve mast hücrelerinden salınma veya pıhtılaşma kaskadı yoluyla oluşturulmaları nedeniyle inflammatuar yanıtın önemli bir bileşenidir. Sitokin ve kemokin üretimini düzenleyerek bağışıklık sisteminin modülatörleri olarak görev yaparlar. IL (interlökin)-32'nin proinflammatuar aktivitesini indükler, T hücrelerinde IFN (interferon)- γ üretimini ve antijene spesifik humoral tepkileri uyarırlar. Ek olarak, membrana bağlanmış olan TNF (tümör nekroze edici faktör)- α 'yı ayırarak bu sitokinin aktivite seviyesinin artmasına yol açarlar. Ayrıca, IL-1 ve IL-18 zimojenlerini aktif formlarına dönüştürürler. Monositlerden IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınmasını indükleyip IL-33'ün olgun formunu üretir ve aktivitesini düzenlerler.⁵ Aynı zamanda vasküler homeostazis ve doku yenilenmesi üzerinde de rolleri bulunmaktadır.⁶ Bu nedenle, serin proteazların aktivitesinin inhibisyonu veya modülasyonu, inflammatuar hastalıkların tedavisi için potansiyel bir strateji olarak kabul edilebilmektedir. Öte yandan, serin proteazlar (kimotripsin, tripsin, nötrofil elastaz gibi) protein sindiriminde de anahtar rol oynamaları nedeniyle inhibisyonları, diyabet, obezite gibi metabolik hastalıkların tedavisinde de faydalı sonuçlar verebilmektedir. Yapılan araştırmalar serin proteazın tip 2 diyabette önemli bir rol oynayabileceğini ve tip 2 diyabetin klinik olarak önlenmesi için serin proteazı hedef alan terapötik bir stratejinin geliştirileceğini göstermiştir.⁷ Farklı hayvan modellerinde serin proteazlardan biri olan tripsinin inhibisyonu yoluyla tokluktan bağımsız kilo kaybının sağlanabildiğini gösteren çalışmalar da vardır.⁸ Serin proteazların, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, akut akciğer hasarı, pulmoner fibrozis, Wegener granülomatozu ve kistik fibrozis dahil olmak üzere çeşitli akut ve kronik akciğer hastalıkları, pankreatit, pankreas/kolorektal kanserler, Alzheimer gibi önemli hastalıkların patogeneze katkıda bulunduğu da düşünülmektedir.⁹ Önemli serin proteazlardan olan tripsin ve kimotripsin inhibitörleri klinik kullanıma da sahiptir. İnsan idrarından saflaştırılan Ulinastatin® spesifik olmayan ve kunitz tipi üriner proteaz inhibitörüdür ve kimotripsin, tripsin, plazmin, nötrofil elastaz gibi çeşitli serin proteazları baskılayabilmektedir. İnflamatuar faktörlerin salınmasını engellemede, radikalleri ortadan kaldırmada, mikro dolaşımı ve doku perfüzyonunu iyileştirmede ve endotel yaralanmaları

hafifletmede etkinliği gösterilmiştir. Ulinastatin klinik olarak akut pankreatit, akut dolaşım yetmezliği ve iskemi-reperfüzyon hasarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak yan etkileri olabilen ve intravenöz yoldan uygulanabilen bir üründür. Bu nedenle daha ucuz, yan etkisi olmayan veya çok daha az olan, oral yoldan kullanılabilecek tripsin/kimotripsin inhibitörlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Çeşitli mikroorganizma ve bitkilerde bulunabilen üreaz enzimi üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalamaktadır.¹⁰ Bu enzim gastrit, peptik ülser ile ilişkili olduğu bilinen ve tip-1 kanserojen olarak ilan edilen *Helicobacter pylori*'nin (*H. Pylori*) mide dokusunda yaşaması ve kolonizasyonu için hayati bir role sahiptir.¹¹ Günümüzde tedavide çeşitli antibiyotik kombinasyonları kullanılarak eradike edilmeye çalışsa da bakterinin bu antibiyotiklere geliştirdiği direnç önemli bir sorun teşkil etmektedir. Dolayısıyla üreaz inhibisyonu *H. pylori*'nin neden olduğu peptik ülserlerin tedavisine yönelik yeni ilaç adayı bileşiklerin keşfi için araştırılan etki mekanizmalarından bir tanesi olmuştur. Bununla birlikte üreaz *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus saprophyticus* gibi bazı patojen bakteri suşları tarafından da üretilen bir enzimdir.¹² Fosfordiamidatlar, hidroksamik asit türevleri ve imidazoller gibi mevcut üreaz inhibitörleri bulunmakla birlikte henüz klinik kullanıma geçen sadece bir bileşik (asetohidroksamik asit) vardır.¹³ Asetohidroksamik asit özellikle üreaz enzimine sahip bakterilerin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Anlaşılabileceği üzere ucuz ve yan etkisi olmayan üreaz inhibitörlerinin keşfi idrar yolu enfeksiyonu, idrar yolunda meydana gelen taşların tedavisi ve yeni antiülserojenik ilaçların araştırılmasında son derece önemlidir.

Yaptığımız literatür taramasında vişne meyvelerinin mide ağrısı gibi sindirim sorunlarında kullanıldığı görülmüş ve daha önce üreaz, tripsin, kimotripsin enzimlerini inhibe edici etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunamamıştır.¹⁴ Dolayısıyla bu çalışma ile vişne meyvelerinin yukarıda sağlık açısından önemleri vurgulanan enzimler üzerindeki etkisinin incelenmesi ve halk arasındaki kullanımlarında bu enzimler üzerindeki etkisinin rolü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem

Kimyasallar

n-Bütanol (Fluka), kloroform (İsolab), etanol (96% Tekkim), etilasetat (Carlo Erba), *n*-hekzan (Lab-Scan), Jack bean üreaz (Tip-III toz, 15.000-50.000 ünite/g katı, Sigma-Aldrich), üre (ACS, Reag. Ph Eur., Merck), EDTA (susuz, kristal BioReagent, hücre kültürü için uygun, Sigma-Aldrich), lityum klorit (ACS reagent ≥99%, Sigma-Aldrich), fenol (ACS Reag. Ph Eur, GR for analysis, Merck), sodyum nitroprussit dihidrat (purrum p.a. ≥98,0%, Fluka), sodyum hipoklorit (%6-14 aktif klorit, Merck), tiyöüre (Reagent Plus® ≥ 99,0%, Sigma-Aldrich), kimotripsin (Tip II, sığır pankreası kaynaklı, Sigma-Aldrich), tripsin (Tip-I, Sığır pankreası kaynaklı, Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Sigma-Aldrich), *N*-süksinil fenilalanin-*p*-nitroanilit (Sigma-Aldrich), fenilmetansülfonil florit (Sigma-Aldrich), HCl (Merck), α -*N*-benzoil-D,L-arjinin-*p*-nitroanilit (Bostonchem), klorojenik asit (C3878, SigmaAldrich), kafeik asit (C0625, Sigma-Aldrich), ferulik asit (PHR1791, Sigma-Aldrich), rosmarinik asit (536954, Sigma-Aldrich), luteolin (L9283, Sigma-Aldrich), luteolin-7-glukozit (49968, Sigma-Aldrich), kemferol (K0133, Sigma-Aldrich), apigenin (10798, Sigma-Aldrich), rutin (R5143, Sigma-Aldrich) ve kersetin (Q0125, Sigma-Aldrich).

Bitki Materyali

Vişne meyveleri Ankara'nın Çubuk İlçesinden [Yukarı Çavundur Mahallesi, 40° 23' 53,5" N/ 33° 05' 29,8" E] 6.7.2024 tarihinde toplanmış ve kullanıma kadar -80°C'de saklanmıştır (Ocak 2025). Aynı zamanda meyvelerin toplandığı ağaçtan da herbaryum örneği hazırlanmış, Dr. Tuğba GÜNBATAN tarafından tayin edildikten sonra Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaldırılmıştır (GUEF 3932).

Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama

-80°C'de saklanan meyvelerin buzu 2-8°C'de bir gece bekletilerek çözülmüştür. 320 g çekirdekleri ayıklanan meyve mutfak robotunda püre haline getirilmiş ve üzerine 500 mL %80 etanol eklenmiştir. 48 saat sonunda hazırlanan ekstre süzölmüş ve 45°C'yi geçmeyen sıcaklıkta evapore edilerek kurutulmuştur.

Yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan ekstreden 1,5 g alınmış ve 20 mL %90'lık metanolde çözüldükten sonra 20 mL *n*-hekzan ile ayırma hunisinde 5 kez ekstre edilmiştir. *n*-Hekzan ile ekstraksiyon sonrasında metanol fazı uçurulmuş ve bakiye 20 mL distile suda çözülmüştür. Sulu çözelti sırasıyla kloroform (20 mL, 5 kez), etil asetat (20 mL, 5 kez) ve *n*-bütanol (20 mL, 10 kez) ile ekstre edilmiştir. Her fraksiyon düşük basınç altında kurutulmuştur, kalan sulu faz ise liyofilize edilmiştir.

Üreaz İnhibe Edici Aktivite Tayini

Üreaz aktivitesi, indofenol yöntemi kullanılarak amonyak üretiminin ölçülmesi ile tespit edilmiştir.¹⁵ Referans inhibitör olarak tiyoüre kullanılmıştır. Deneyler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Kimotripsin İnhibe Edici Aktivite Tayini

α -Kimotripsin inhibe edici aktivite Siddiqui ve ark. (2017) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir.¹⁵⁻¹⁷ Referans inhibitör olarak fenilmetansülfonil florit (FMSF) kullanılmıştır. Deneyler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Tripsin İnhibe Edici Aktivite Tayini

Tripsin inhibe edici aktivite Yoshii ve ark. (2018) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir.^{17,18} Referans inhibitör olarak FMSF kullanılmıştır. Deneyler üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Analizleri

Vişne meyvelerinden hazırlanan %80 etanol ekstresi ve etilasetat fraksiyonunun içeriği belirli fenolik asitler (klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit ve rosmarinik asit) ve flavonoidler (luteolin, luteolin-7-glukozit, kemferol, apigenin, rutin ve kersetin) açısından Agilent 1260 Serisi YPSK sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Tanımlanan bileşiklerin miktarları da belirlenmiştir. Analizde ACE 5 μ C18 (150x4,60 mm) kolon ve fotodiyot dizisi dedektör (PDA) UV/VIS (200-400 nm) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 μ L; akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Analiz esnasında A ve B çözücülerinden (HPLC grade, %99,9, Sigma-Aldrich) oluşan mobil fazlar, Tablo 1'de belirtildiği gibi bir gradyan sistem ile uygulanmıştır: çözücü A: %0,1 trifloroasetik asit:su, çözücü B: %0,1 trifloroasetik asit: asetonitril.¹⁹

Tablo 1. YPSK analizinde uygulanan gradyan sistemi

Süre (dakika)	Çözücü A (%)	Çözücü B (%)
0	85	15
20	80	20
30	75	25
38	70	30
40	85	15

Bulgular

Vişne meyvelerinden elde edilen %80 etanol ekstresinin ve etanol ekstresinden hareketle hazırlanan fraksiyonların miktarları ve yüzde verimleri aşağıda Tablo 2’de verilmiştir. Hazırlanan ekstre ve fraksiyonların in vitro üreaz, kimotripsin ve tripsin inhibe edici aktiviteleri belirlenmiş ve aşağıda Tablo 3’de sunulmuştur. Tablo 3’den de anlaşılacağı sadece etil asetat fraksiyonunda önemli derecede üreaz inhibe edici aktivite (%42,36 inhibisyon) gözlenmiştir. Yine benzer şekilde etil asetat fraksiyonu kuvvetli kimotripsin inhibe edici aktivite göstermiş (%84,07 inhibisyon), onu %35,05’lik inhibe edici aktivite ile *n*-hekzan fraksiyonu takip etmiştir. Tripsin inhibe edici aktivite test sonuçlarına bakıldığında ise etil asetat, *n*-bütanol ve kalan su fraksiyonlarının %95’den yüksek oranlarda inhibisyon sağladığı anlaşılmaktadır.

Tablo 2. Vişne meyvesinden hazırlanan ekstre ve fraksiyonların miktarları ve yüzde verimleri

Ekstre/ fraksiyon	Ekstre/fraksiyon miktarı (mg)	Yüzde verim
%80 etanol ekstresi	43650,2	13,64*
<i>n</i> -Hekzan fraksiyonu	24,0	1,6 **
Kloroform fraksiyonu	37,4	2,49 **
Etilasetat fraksiyonu	46,8	3,12**
<i>n</i> -Bütanol fraksiyonu	523,3	34,88**
Kalan su fraksiyonu	853,1	56,87**

* g ekstre/g drog

** g fraksiyon/g kuru ekstre

Tablo 3. Vişne meyvesinden hazırlanan ekstre ve fraksiyonların in vitro enzim inhibe edici aktivitesi

Ekstre/fraksiyon	Üreaz ^a	Kimotripsin ^a	Tripsin ^a
%80 etanol ekstresi	-	19,79 ± 0,88	10,32 ± 0,21
<i>n</i> -Hekzan fraksiyonu	2,22 ± 1,28	35,05 ± 0,62	3,55 ± 0,70
Kloroform fraksiyonu	2,35 ± 0,31	25,37 ± 1,02	16,12 ± 0,36
Etilasetat fraksiyonu	42,36 ± 0,99	84,07 ± 0,66 (IC ₅₀ : 40,52 ± 0,57 µg/mL)	99,36 ± 0,47 (IC ₅₀ : 14,91 ± 0,37 µg/mL)
<i>n</i> -Bütanol fraksiyonu	6,77 ± 0,64	26,43 ± 0,49	98,17 ± 0,23 (IC ₅₀ : 123,4 ± 1,05 µg/mL)
Kalan su fraksiyonu	15,54 ± 0,86	4,70 ± 0,94	97,16 ± 0,31 (IC ₅₀ : 128,06 ± 0,45 µg/mL)
Tiyüüre	89,92 ± 0,46 ^b (IC ₅₀ : 136,09 ± 1,74 µM)	-	-
FMSF	-	99,69 ± 0,15 ^c (IC ₅₀ : 10,84 ± 0,29 µM)	99,55 ± 0,19 ^d (IC ₅₀ : 143,11 ± 0,68 µM)

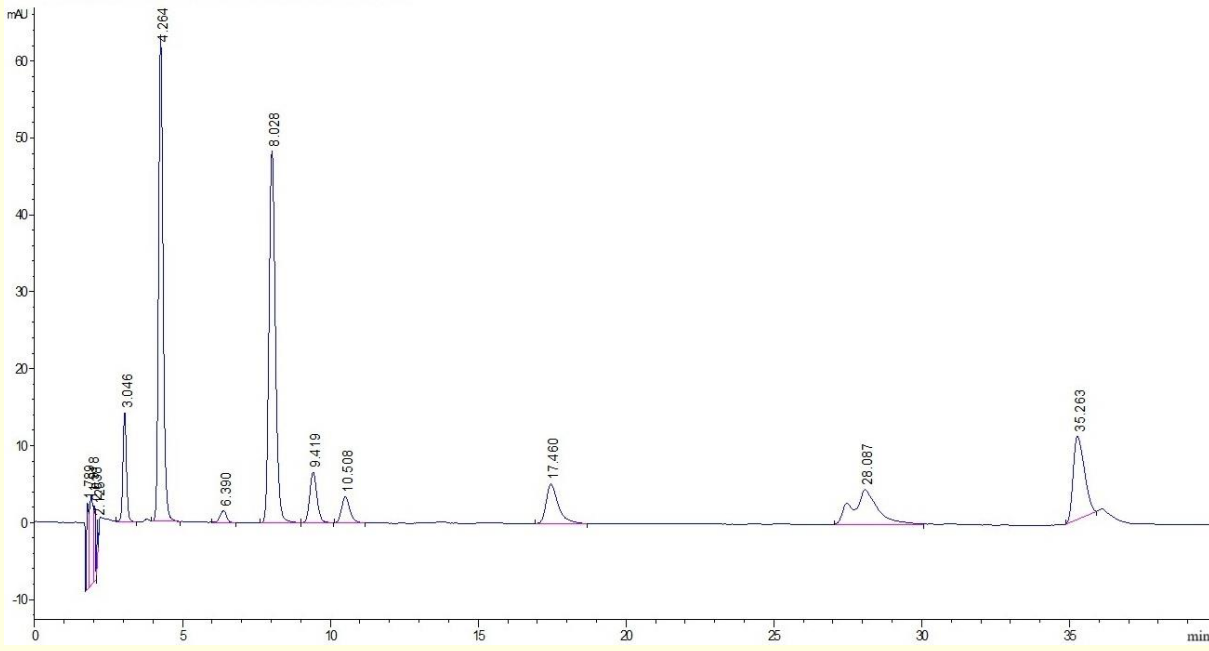
^a200 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon ± ortalamanın standart hatası (n=3).

^b50 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon ± ortalamanın standart hatası (n=3).

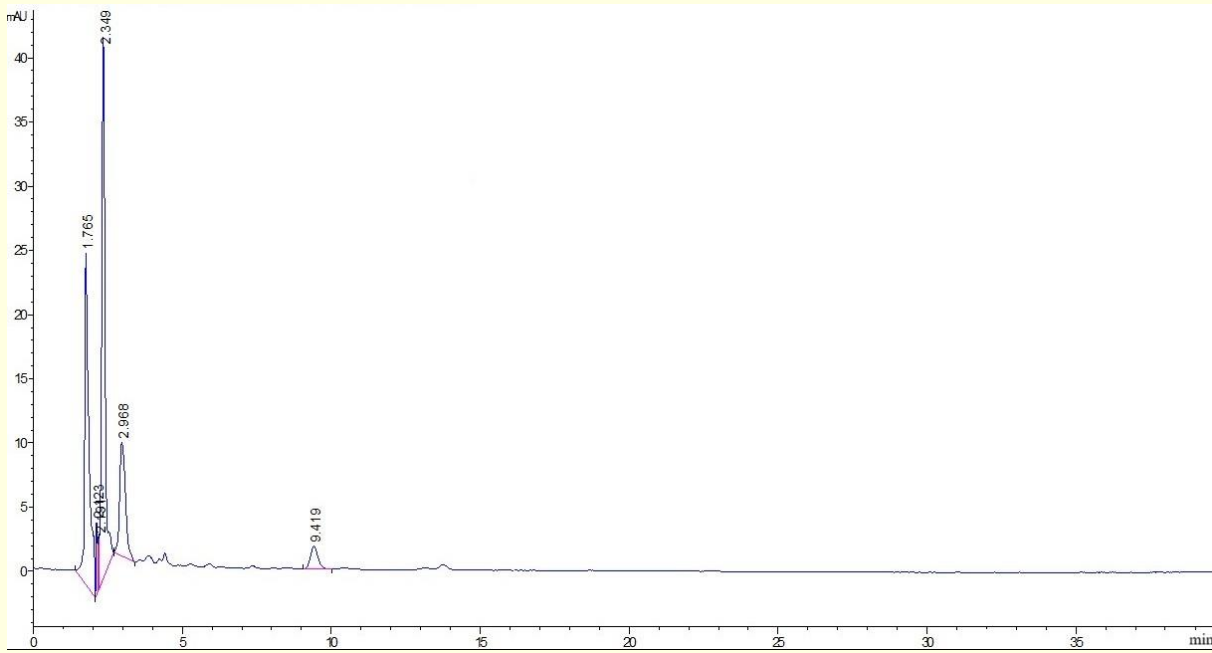
^c40 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon ± ortalamanın standart hatası (n=3).

^d160 µg/mL konsantrasyondaki % inhibisyon ± ortalamanın standart hatası (n=3).

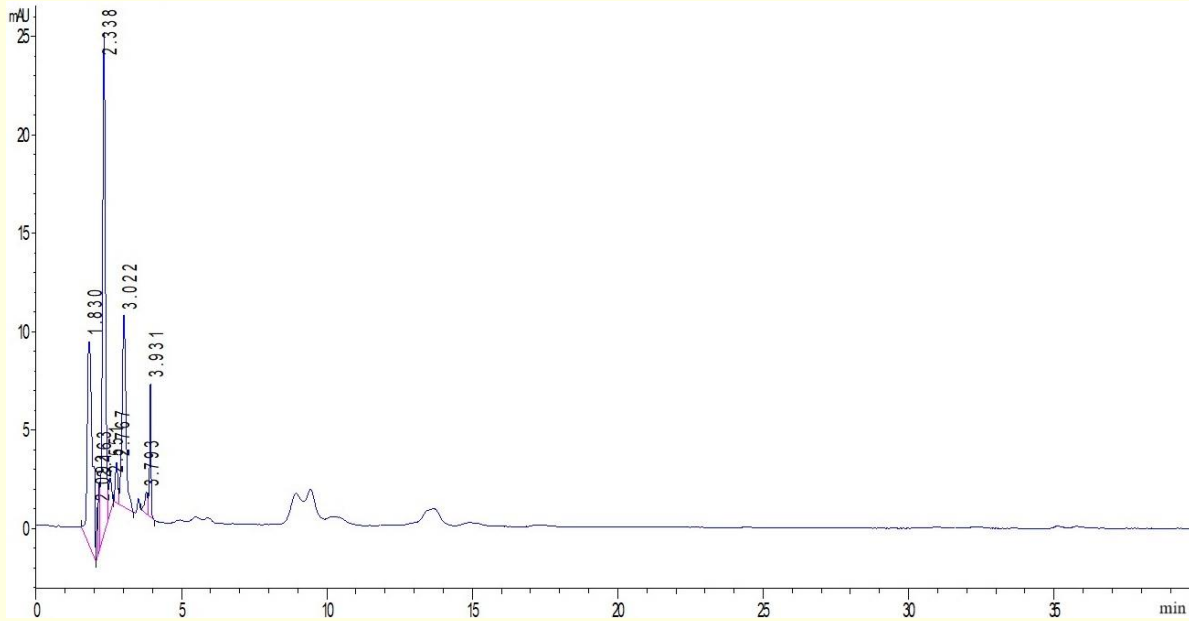
Etanol ekstresinin ve her üç enzimde de kuvvetli aktivite gösteren etilasetat fraksiyonunun fenolik asit ve flavonoid içeriğini belirlemek için YPSK analizi yapılmıştır. Öncelikle, standart fenolik asit ve flavonoid karışımının YPSK kromatogramı elde edilmiştir (**Şekil 1**). Standartların ardından etanol ekstresinin ve etilasetat fraksiyonunun YPSK kromatogramı alınmıştır. Kromatogramlar, hem etanol ekstresinin hem de etilasetat fraksiyonunun klorojenik asit ve rutin içerdiğini ortaya koymuştur (**Şekil 2-3**). Standartlarla hazırlanan kalibrasyon eğrilerinden hareketle ekstre ve fraksiyondaki klorojenik asit ve rutin oranları da belirlenmiştir. Tablo 4’te görülebileceği gibi, etanol ekstresi sırasıyla %0,1082 ve %0,0512 oranlarında klorojenik asit ve rutin içerirken; etilasetat fraksiyonu ise sırasıyla %0,165 ve %0,079 oranında içermektedir.



Şekil 1. Standart karışımın YPSK kromatogramı. alıkonma süreleri (RT): 3,046: Klorojenik asit; 4,264: Kafeik asit; 8,028: Ferulik asit; 9,419: Rutin; 10,508: Luteolin-7-glukozit; 17,460: Rosmarinik asit; 27,85: Kersetin; 28,087: Luteolin; 35,263: Apigenin; 36,02: Kemferol



Şekil 2. Etanol ekstesinin 330 nm'deki YPSK kromatogramı (3,046: Klorojenik asit; 9,419: Rutin)



Şekil 3. Etil asetat fraksiyonunun 330 nm’deki YPSK kromatogramı (3,046: Klorojenik asit; 9,419: Rutin)

Tablo 4. Bileşiklerin ekstre ve fraksiyondaki yüzde miktarları

Bileşik	Etanol ekstresi (%)	Etilasetat fraksiyonu (%)
Klorojenik asit	0,1082	0,165
Rutin	0,0512	0,079

Tartışma

Bu çalışmada, vişne meyvesinden hazırlanan %80 etanol ekstresinin ve farklı polariteye sahip çözücüler (*n*-hekzan, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve su) ile elde edilen fraksiyonların, üç farklı enzim (üreaz, tripsin ve kimotripsin) üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmıştır. Bulgular, fraksiyonlamada kullanılan çözücülerin polaritesine bağlı olarak elde edilen fraksiyonların enzim inhibisyon potansiyelinin anlamlı derecede değiştiğini ortaya koymuştur. Elde edilen verilere göre, yalnızca etil asetat fraksiyonu hem üreaz hem de kimotripsin enzimlerini inhibe etmiştir (sırasıyla %42,36 ve %84,07 inhibisyon). Bu durum, orta polariteye sahip etil asetatın, fenolik bileşikler (özellikle flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asit türevleri) gibi biyoaktif metabolitleri etkili biçimde ekstre etmesine bağlanabilir. Bu bileşiklerin enzim aktif bölgeleriyle hidrojen bağları veya π - π etkileşimleri gibi mekanizmalarla bağlanarak inhibisyonu sağladığı bilinmektedir.²⁰⁻²² Öte yandan, tripsin enzimi, etil asetat dışında *n*-bütanol ve su fraksiyonları tarafından da inhibe edilmiştir. Bu bulgu, tripsin enziminin daha polar bileşiklere (örneğin suda çözünür fenolikler ve flavonoid glikozitleri) karşı duyarlılığına işaret etmektedir. Bütanol ve su, yüksek polariteleri sayesinde bu tür hidrofilik bileşikler ekstre etme kapasitesine sahiptir. İlginç biçimde, hekzan ve kloroform fraksiyonları çalışılan enzimler üzerinde belirgin inhibisyon göstermemiştir. Bilindiği üzere bu çözücüler, genellikle lipofilik metabolitleri (örneğin steroller, terpenoidler, bazı yağ asitleri) ekstre ederler. Bu tip bileşiklerin, genellikle protein/enzim etkileşim kapasitelerinin sınırlı olması nedeniyle enzim inhibisyonuna katkılarının düşük olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız literatür taramasında vişne meyvesinin üreaz inhibe edici aktivitesinin incelendiği bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Ancak yakın tarihli bir çalışmada meyvelerinden hazırlanan etilasetat ekstresinin farelerde mide mukozasını HCl/EtOH ile indüklenen mide lezyonlarına karşı önemli ölçüde ($p < 0,05$) koruduğu, karragen ile indüklenen pati ödemi yöntemi ile önemli anti-inflamatuar ve antinosiseptif potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir.²³ Vişne antosiyaninlerinin sıçanlarda iltihap kaynaklı ağrı davranışı üzerindeki etkinliğini karragen ve freund adjuvanı ile indüklenen ödem, radyant ısı ve von Frey problemlerine karşı pati çekme eşiği testleri ile ölçülmüştür. Vişne antosiyaninlerinin inflamasyon kaynaklı termal hiperaljeziyi, mekanik

hiperaljeziyi ve pençe ödemi azalttığı belirlenmiştir. Termal hiperaljezinin baskılanması doza bağımlı olup vişne antosiyaninleri en yüksek dozda (400 mg/kg) indometazine (5 mg/kg) yakın etki sergilemiştir.²⁴ He ve ark. erkek sıçanlarda vişne antosiyaninlerinin Freund adjuvanı ile indüklenen artrit üzerindeki anti-inflamatuar ve anti-oksidatif etkilerini araştırmıştır. 40 mg/kg dozda antosiyanin uygulaması TNF- α , prostaglandin E2 ve malondialdehit seviyelerini önemli ölçüde azaltmış; toplam antioksidan kapasite ve süperoksit dismutaz seviyelerinde ise artışa neden olmuştur.²⁵ Bir klinik araştırmada maraton koşucularına koşudan 5 gün önce, koşu günü ve koşudan sonraki 48 saatte vişne suyu veya plasebo verilmiştir. Kas hasarı belirteçleri (kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz, kas ağrısı ve izometrik güç), inflamasyon belirteçleri (IL-6, C-reaktif protein ve ürik asit), toplam antioksidan durumu ve oksidatif stres (tiyobarbitürik asit reaktif türleri ve protein karbonilleri) yarıştan önce ve sonra incelenmiştir. Vişne suyu grubunda iltihabın azaldığı (IL-6 için $p < 0,001$; C-reaktif protein için $p < 0,01$; ürik asit için $p < 0,05$) görülmüştür. Toplam antioksidan durumu vişne suyu grubunda plasebo grubundan yaklaşık %10 daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 48 saat sonrasında tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin vişne suyu grubunda plasebo grubundan daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).²⁶

Carson çalışmasında; vişnenin nöropatik ağrı üzerindeki etkilerini ağırlı alt ekstremitte periferik nöropatisi olan 12 hasta üzerinde araştırmıştır. Katılımcılara iki hafta boyunca her gün yaklaşık 240 mL %100 vişne suyu verilmiştir. Çalışma sonunda katılımcıların yarısından fazlasında maksimum ağrıda %50 veya daha fazla azalma olduğu belirlenmiştir.²⁷ Biro ve ark. vişne ekstresinin lipopolisakkarit kaynaklı endotelial inflamasyon üzerindeki etkilerini insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde araştırmıştır. Bu araştırmanın sonuçları; vişne ekstresinin, TNF- α , IL-6 ve doku plazminojen aktivatörü seviyelerini azaltıp, sitokin ve kemokin salınımını baskılayarak HUVEC hücrelerindeki inflamasyonu azaltabildiğini göstermiştir. Aynı çalışmada vişne ekstresinin tromboksan A2 ve prostasiklin üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Vişne ekstresi prostasiklin seviyelerini önemli ölçüde azaltmış, ancak tromboksan A2'yi etkilememiştir. Bununla birlikte hidrojen peroksit kaynaklı reaktif oksijen türleri seviyelerini azaltarak ve glutatyon peroksidaz seviyelerini artırarak oksidatif stresi de azaltmıştır.²⁸

Apc^{Min} farelerde (adenomatöz polipozis koli ilişkili çoklu intestinal neoplazi görülen fareler) vişnenin ve bileşenlerinin kanser riskini azaltmadaki rolünü değerlendirilmiştir. Fareler 5 farklı grup altında değerlendirilmiştir: 1) 200 g/kg dondurularak kurutulmuş çekirdeksiz vişne içeren kontrol diyeti, 2) kontrol diyeti + 800 mg/L antosiyanin, 3) kontrol diyeti + 200 mg/L siyanidin, 4) kontrol diyeti 5) kontrol diyeti+ 200 mg/L sulindak. Bu çalışmanın sonuçları; üç test diyetinden herhangi birine atanan farelerin, kontrol veya sulindak grubundaki farelere göre önemli ölçüde daha az ve daha küçük hacimli çekal tümör taşıdığını, ancak kolon tümörü sayısı ve hacminin tedaviden önemli ölçüde etkilenmediğini ortaya koymuştur. Ayrıca antosiyaninler ve siyanidin kolorektal kanser hücre hatları olan HT 29 (IC₅₀ değerleri sırasıyla sırasıyla 780 μ M ve 63 μ M) ve HCT 116 hücre hatlarının (IC₅₀ değerleri sırasıyla sırasıyla 285 μ M ve 85 μ M) çoğalmasında azaltmıştır.²⁹ Martin ve Wooden (2012) çalışmalarında; farklı konsantrasyondaki vişne suyunun meme adenokarsinomu MCF-7 hücrelerinde apoptozis ve hücre çoğalması üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarında; %10'dan daha yüksek konsantrasyonlarda mitojenez ve hücre çoğalmasının, muhtemelen nekroz nedeniyle azaldığı, %10'dan daha düşük konsantrasyonlarda ise hücre çoğalmasının kontrol grubundan farklı olmadığı belirlenmiştir. Apoptozis %3 ve %10 konsantrasyonlarında sırasıyla %34 ve %44 oranında artmıştır.³⁰ Ogur ve ark. (2014) araştırmalarında; vişne etanol ekstresinin MCF-7 ve fare meme tümörü hücresi (4T1) hatlarında antikanser etkisini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda, vişne ekstresinin 50 μ g/mL konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinde hücre büyümesini %37; 4T1 hücrelerinde ise %48 oranında engellediği tespit edilmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ise her iki hücre hattında da hücre çoğalmasını %50'nin üzerinde engellemiştir.³¹

Randomize, plasebo kontrollü bir klinik araştırmada, kilolu ve obez katılımcılarda vişne suyunun serum ürik asit, inflamasyon belirteçleri ve kardiyovasküler hastalık risk faktörleri üzerindeki etkisi test edilmiştir. On

katılımcıya 4 hafta boyunca günde yaklaşık 240 mL %100 vişne suyu veya plasebo verilmiştir (iki içecek kullanımı arasında iki hafta ara verilmiştir). Normourisemik olmalarına rağmen katılımcıların %70'inde vişne suyu tüketiminden sonra serum ürik asit seviyelerinde azalma gözlemlenmiş; %20'sinde hafif artış gözlenirken %10'unda ise değişmeden kalmıştır. Kronik inflamasyonun bir göstergesi olan eritrosit sedimentasyon hızı vişne suyu uygulamasıyla plaseboya kıyasla önemli ölçüde ($p<0,05$) azalmıştır. Ayrıca, inflamasyon belirteçleri olan TNF- α ve monosit kemotaktik protein seviyelerinde de belirgin azalmalar gözlemlenmiştir.³²

Vişnenin kan basıncı üzerindeki etkileri de bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Örneğin, diyabetli kadınlarla yapılan bir çalışmada, 40 g/günlük vişne konsantresi (720 mg/gün antosiyanin) ile 6 haftalık takviyenin hem sistolik hem de diyastolik basıncı önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.³³ Bir diğer çalışmada ise erken hipertansiyonu olan on beş erkeğe (sistolik kan basıncı ≥ 130 mm Hg ve/veya diyastolik kan basıncı ≥ 80 mm Hg) 60 mL konsantre vişne suyu veya plasebo verilmiştir. Başlangıçtaki ve vişne suyu tüketimden 1, 2, 3, 5 ve 8 saat sonraki mikrovasküler reaktivite, arteriyel sertlik, kan basıncı değerlendirilmiştir. Vişne suyu tüketiminden sonraki 3 saatlik süreçte sistolik kan basıncının önemli ölçüde azaldığı ($p<0,05$) gözlemlenmiştir.³⁴

Yaptığımız YPSK analizlerinde, vişne meyvelerinden hazırlanan hem etanol ekstresi hem de etilasetat fraksiyonunun klorojenik asit içerdiği görülmüştür. Nabil-Adam ve ark., moleküler modelleme çalışmalarında klorojenik asidin tripsini önemli ölçüde inhibe ettiğini tespit etmiştir.²⁰ Karaçelik ise, klorojenik asidin üreaz enzimine -7,3 kcal/mol'lük bir bağlanma afinitesi gösterdiğini belirtmiştir.³⁵ Başka bir moleküler modelleme çalışmasında ise üreazla -6,7 kcal/mol'lük bağlanma enerjisi ile etkileştiği belirlenmiştir.²¹ Bir in vitro çalışmada ise *H. pylori* üreazını 12,89 $\mu\text{g/mL}$ IC₅₀ değeri ile inhibe ettiği anlaşılmıştır.³⁶

Çalışılan ekstre ve fraksiyon tespit edilen bir diğer bileşik olan rutin de daha önce tripsin inhibe edici aktivitesi değerlendirilmiştir. Raza ve Shahwar araştırmalarında; rutin tripsini 0,016 mM IC₅₀ değeriyle non-kompetitif şekilde inhibe ettiği sonucuna varmıştır.³⁷ Bileşiğin üreaz enzimi üzerindeki aktivitesi de daha önceki bir çalışmada incelenmiş ve 0,61 μM IC₅₀ değeri ile potent inhibe edici aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.²² Ancak Dong ve ark. (2024) ise *H. pylori* üreazını 66,08 $\mu\text{g/mL}$ IC₅₀ değeri ile inhibe ettiğini belirtmiştir.³⁶ Farklı moleküler modelle çalışmasında ise rutin üreaz enzimine -6,2 ve -7,6 kcal/mol'lük bağlanma afinitesi gösterdiği tespit edilmiştir.^{21,35} YPSK ve enzim inhibe edici aktivite test sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, klorojenik asit ve rutin miktarı ile üreaz ve tripsin inhibe edici aktivitesi arasında bir paralellik gözlemlenmektedir. Dolayısıyla klorojenik asit ve rutin gözlenen tripsin ve üreaz inhibe edici aktivitesinden sorumlu bileşiklerden biri olabileceği akla gelmektedir.

Çalışmamızda özellikle etil asetat fraksiyonu ile gözlenen kuvvetli kimotripsin ve tripsin inhibe edici aktivite ele alındığında, vişnenin yukarıda bahsedilen antiinflamatuvar, sitotoksik ve antihipertansif etkilerine kimotripsin/tripsin inhibe edici aktivitesinin katkı sağlayabileceği akla gelmektedir. Dolayısıyla yapılacak daha ileri biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama, yapı-aktivite, moleküler modelleme, in vivo ve klinik deneylerle inflamasyon, kanser, yüksek tansiyon ve obezite gibi durumlarda kullanılabilecek ilaç aday aday moleküllerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca daha önceki bir araştırmada belirlenen gastroprotektif aktivite ve bu çalışmada tespit ettiğimiz önemli derecedeki üreaz inhibe edici aktivite değerlendirildiğinde bitkinin *H. pylori* pozitif ülser tedavisinde de umut vaat edici olduğu düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacı Katkı Oranı Beyanı

Tuğba Aydın: Fikir, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı

Tuğba Günbatan: Fikir, tasarım, danışmanlık, veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, kaynak taraması, makale yazımı, eleştirel inceleme, kaynak sağlama

Alper Gökbulut: Veri toplama ve işleme, analiz ve yorum, makale yazımı, eleştirel inceleme

Kaynaklar

1. Yılmaz FM, et al. Sour cherry by-products: compositions, functional properties and recovery potentials – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019;59(22):3549-63.
2. Rawlings ND. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie* 2010;92:1463-83.
3. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 2002;102:4501-24.
4. Patel SA. Critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. *Aller Immunopathol* 2017;45(6):579-91.
5. Safavi F, Rostami A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experiment Mol Pathol* 2012;93(3):428-33.
6. Sharony R, et al. Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. *J Inflamm* 2010;30(7):45.
7. Kuo CS, et al. Inhibition of serine protease activity protects against high fat diet-induced inflammation and insulin resistance. *Sci Rep* 2020;10:1725.
8. Albarazani K, et al. Intestinal serine protease inhibition increases FGF21 and improves metabolism in obese mice. *Am J Physiol-Gastro Liver Physiol* 2019;316(5):G653-G67.
9. Owen CA. Serine proteinases. In: Laurent GJ, Shapiro SD, editors. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Academic Press; 2006. pp:1-10.
10. Amtul Z, et al. Cysteine based novel noncompetitive inhibitors of urease(s)-distinctive inhibition susceptibility of microbial and plant ureases. *Bioorg Med Chem* 2006;14:6737-44.
11. Yılmaz Ö, Okcu N. Helicobacter pylori ve gastrointestinal sistemle ilişkili Hastalıklar. *The Eurasian J Med* 2006;38:13-7.
12. Rego YF, et al. A review on the development of urease inhibitors as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. *J Adv Res* 2018;13:69-100.
13. Modolo LV, et al. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review. *J Adv Res* 2015;6:35-44.
14. Gürbüz İ, et al. Folk medicine in Düzce province (Turkey). *Turk J Bot* 2019;43(6):769-84.
15. Gunbatan T, et al. In vitro antioxidant, enzyme inhibitory and antimicrobial evaluation of Sideritis caesarea H. Duman, Aytac & Baser extracts. *Nat Prod Commun* 2023;18(4):1-11.
16. Siddiqui SZ, et al. Synthetic N-[(substitutedsulfamoyl) phenyl] acetamides as moderate chymotrypsin inhibitors. *Pakistan J Pharm Sci* 2017;30(3):675-81.
17. Günbatan T, et al. Chymotrypsin and trypsin inhibitory activity of some medicinal plants collected from Rize (Türkiye). *Chem Biodivers* 2024;21(3):e202301879.
18. Yoshii K, et al. Activating effects on trypsin, α -chymotrypsin, and lipase and inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase as provided by low-molecularweight compounds in the water extract of the earthworm Eisenia fetida. *Enzyme Microb Tech* 2018;118:20-9.
19. Gökbulut A, et al. Phenolic compounds characterization, carbohydrate digestive enzyme inhibitory and antioxidant activities of Hieracium pannosum Boiss. *S Afr J Bot* 2017;108:387-92.
20. Nabil-Adam A, et al. Interaction of Jania rubens polyphenolic extract as an antidiabetic agent with α -amylase, lipase, and trypsin: In vitro evaluations and in silico studies. *Catalysts* 2023;13:443.
21. Lekmine S, et al. Bioactive phenolics of Hyoscyamus muticus L. subsp. falezlez: A molecular and biochemical approach to antioxidant and urease inhibitory activities. *Int J Mol Sci* 2025;26:370.
22. Shoukry SM, et al. Unraveling putative antiulcer phytoconstituents against Helicobacter pylori urease and human H⁺/K⁺-ATPase from Jacaranda mimosifolia using UPLC-MS/MS coupled to chemometrics and molecular docking. *Microchem J* 2023;189:10855.
23. Raafat K, et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of Prunus cerasus phytochemicals and their possible mechanisms of action. *J Tradit Comp Med* 2020;10(4):345-53.
24. Tall JM, et al. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. *Behav Brain Res* 2004;153(1):181-8.
25. He Y, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of cherries on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Scandinavian J Rheumatol* 2006;35(5):356-8.
26. Howatson G, et al. Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. *Scandinavian J Med Sci Sports* 2010;20(6):843-52.
27. Carson CA. Tart cherry juice as a treatment for peripheral neuropathy. *Integ Med* 2015;14(1):48-9.
28. Biro A, et al. Anthocyanin-rich sour cherry extract attenuates the lipopolysaccharide-induced endothelial inflammatory response. *Molecules* 2019;24:3427.
29. Kang SY, et al. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2003;194(1):13-9.

30. Martin KR, Wooden A. Tart cherry juice induces differential dose-dependent effects on apoptosis, but not cellular proliferation, in MCF-7 human breast cancer cells. *J Med Food* 2012;15:945-54.
31. Oğur R, et al. Report: investigation of anti-cancer effects of cherry in vitro. *Pakistan J Pharm Sci* 2014;27:587-92.
32. Martin KR, et al. The effect of 100% tart cherry juice on serum uric acid levels, biomarkers of inflammation and cardiovascular disease risk factors. *FASEB J* 2011;25:339.2
33. Ataie-Jafari A, et al. Effects of sour cherry juice on blood glucose and some cardiovascular risk factors improvements in diabetic women. *Nutr Food Sci* 2008;38:355-60.
34. Keane KM, et al. Effects of Montmorency tart cherry (*Prunus Cerasus L.*) consumption on vascular function in men with early hypertension. *The Am J Clin Nutr* 2016;103(6):1531-9.
35. Karaçelik AA. Phytochemical profiling, antioxidant activities and in vitro/in silico enzyme inhibitory potentials of apricot cultivars grown in Iğdır/Turkey. *S Afr J Bot* 2023;156:257-67.
36. Dong H, et al. Potentialities of Dandelion (*Taraxacum Mongolicum* Hand.-Mazz.) Flower extracts on gastric protection against helicobacter pylori and characterization of its bioactive constituents. *Chem Biodivers* 2024;21:e202400140.
37. Raza MA, Shahwar D. Trypsin inhibitory potential and microbial transformation of rutin isolated from *Citrus sinensis*. *Med Chem Res* 2013;22:3698-702.