

## Morin'in Karbonik Anhidraz, Asetilkolinesteraz ve $\alpha$ -glikozidaz Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkileri

Cüneyt ÇAĞLAYAN<sup>1\*</sup>

**ÖZET:** Biyoaktif flavonoidler, insan için birçok biyolojik faydalar sağlayan gıdadaki en önemli fitokimyasallar olarak kabul edilir. Antioksidan, anti-bakteriyel, anti-kolinergik, anti-diyabetik, anti-mutajenik ve anti-enflamatuar özellikler gibi birçok farmakolojik aktiviteye sahiptirler. Flavonoidlerin bir üyesi olan morin, nükleik asitler, enzimler ve proteinler ile etkileşime girerek birçok terapötik özellik sergiler. Bu çalışmada, doğal fenolik bir bileşik olarak morin, insan karbonik anhidraz (CA) izoformları I ve II (CA I ve II), asetilkolinesteraz (AChE) ve  $\alpha$ -glikozidaz enzimlerine karşı inhibe edici etkiler göstermiştir. Bu fenolik bileşik, CA I, CA II, AChE ve  $\alpha$ -glikozidaz enzimlerinin inhibisyonu için test edildi ve sırasıyla CA I için  $31.89 \pm 9.07$  nM, CA II için  $49.25 \pm 12.85$  nM, AChE için  $184.67 \pm 30.37$  nM ve  $\alpha$ -glikozidaz için  $16.99 \pm 4.40$  nM Ki değerleri ile etkili inhibisyon profilleri gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Karbonik anhidraz, asetilkolin esteraz,  $\alpha$ -glikozidaz, morin, enzim inhibisyonu

### Inhibition Effects of Morin on Carbonic Anhydrase, Acetylcholinesterase and $\alpha$ -glycosidase Enzymes

**ABSTRACT:** Bioactive flavonoids are considered to be the most important phytochemicals in food that provide many biological benefits for human beings. They have many pharmacological activities that include antioxidant, anti-bacterial, anti-cholinergic, anti-diabetic, anti-mutagenic and anti-inflammatory properties. Morin, a member of flavonoids, exhibit many therapeutic properties by interacting with nucleic acids, enzymes and protein. In this study, morin as natural a phenolic compound showed inhibitory effects against human carbonic anhydrase (CA) isoforms I and II (CA I and II), acetylcholinesterase (AChE) and  $\alpha$ -glycosidase enzymes. This phenolic compound was tested for the inhibition of CA I, CA II, AChE, and  $\alpha$ -glycosidase enzymes and demonstrated efficient inhibition profiles with Ki value of  $31.89 \pm 9.07$  nM for CA I,  $49.25 \pm 12.85$  nM for CA II,  $184.67 \pm 30.37$  nM for AChE, and  $16.99 \pm 4.40$  nM for  $\alpha$ -glycosidase, respectively.

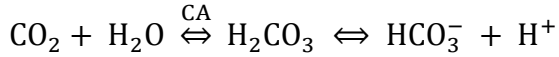
**Key words:** Carbonic anhydrase, acetylcholine esterase,  $\alpha$ -glycosidase, morin, enzyme inhibition

<sup>1</sup>Cüneyt ÇAĞLAYAN (Orcid ID: 0000-0001-5608-554X), Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bingöl, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Cüneyt ÇAĞLAYAN, e-mail: ccaglayan@bingol.edu.tr

## GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda bulunan ve çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. CA enzimi karbondioksit ( $CO_2$ ) ve suyun ( $H_2O$ ) geri dönüşümlü hidrasyonunu, bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) ve bir protona ( $H^+$ ) katalizler (Çağlayan ve Gulcin, 2018; Taslimi ve ark., 2019).



CA enzimi karboksilasyon tepkimeleri dışında pH düzenleme, kemik gelişimi, vücut sıvısının dengelenmesi, kalsifikasyon, lipogenez, üre döngüsü, bikarbonat sentezi ve diğer pek çok fizyolojik olaylarda önemli roller oynamaktadır (Taslimi ve ark., 2018a; Türkan ve ark., 2018a). CA izoenzimleri  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -, n- ve  $\theta$ -CAs olmak üzere bağımsız yedi farklı gen ailesi tarafından kodlanır (Taslimi ve ark., 2017).  $\alpha$ -CA izoformları lokalizasyonlarında ve doku dağılımlarında önemli ölçüde farklılık gösterir. Omurgalılarda, protozoalarda, alglerde, yeşil bitkilerin sitoplazmasında ve bazı bakterilerde bulunurlar.  $\alpha$ -CA enziminin beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV) ve üç tanesi nonkatalitik (VIII, X, XI) olmak üzere 16 tane izoenzimi vardır (Gulçin ve ark., 2017; Taslimi ve ark., 2018b). Özellikle, son 60 yıldır CA inhibitörleri antiglokoma, diüretik ve anti-epileptik tedavileri için klinik olarak kullanılmaktadır (Çağlayan ve ark., 2018a).

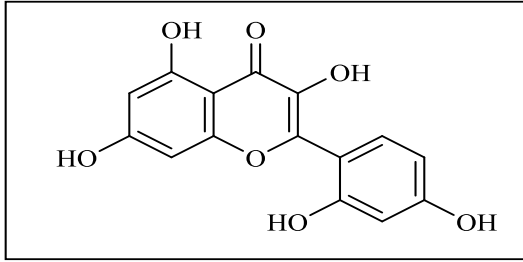
Alzheimer, nörodejeneratif bir hastalık olup özellikle yaşlı insanlarda sık görülen demansın nedenidir. Alzheimer hastalarında bilişsel yeteneklerde iyileşmenin olabilmesi için, asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin inhibitör bileşiklerle bloke edilmesi gerekir (Gulçin ve ark., 2017). Asetilkolin, bilişsel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynayan en önemli nörotransmitter maddelerden biridir.

Asetilkolinesteraz (AChE; E.C.3.1.1.7) enzimi, beyin dokusunda asetilkolinin kolin ve asetat haline biyotransformasyonunu gerçekleştirir (Kuzu ve ark., 2018). Kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan ilaçlardır, çünkü kolinesterazların inhibe edilmesiyle, nörotransmitterlerin sinaptik seviyesinin artmasına neden olurlar. Bu yüzden doğal bitki kaynaklarından izole edilen antioksidan bileşiklerin kolinesterazları inhibe etmesi büyük önem arz etmektedir (Türkan ve ark., 2018b).

Bağırsak hücrelerinin fırçamsı yüzeyinde bulunan  $\alpha$ -glikozidaz (E.C.3.2.1.20) enzimi karbonhidrat sindirimini kilit bir enzimdir. Bu enzim tip 2 diabetes mellitus hastalığında meydana gelen postprandiyal hipergliseminin modülasyonu için terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir (Xu ve ark., 2014). Akarboz ve vogliboz gibi ticari  $\alpha$ -glikozidaz inhibitörleri, diyabetin tedavisi için kullanılmaktadır, ancak bağırsakta sindirilmemiş karbonhidrat birikimine, şişkinlik ve karın ağrısı gibi olumsuz yan etkilere neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2011). Özellikle, bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin  $\alpha$ -glikozidazın inhibisyonunda rol oynadığı tespit edilmiştir (McDougall ve ark., 2005).

Biyolojik sistemlerdeki antioksidanlar olarak rol oynayan flavonoidler, birçok meyve, sebze ve baharat türlerinde bulunan doğal fenolik bileşiklerdir (Kandemir ve ark., 2017a; Köksal ve ark., 2017). Bazı epidemiyolojik çalışmalar, flavonoidlerin antioksidan (Eldutar ve ark., 2017), anti-enflamatuar (Benzer ve ark., 2018), anti-diyabetik (Kandemir ve ark., 2017b), anti-otofajik (Çağlayan ve ark., 2018b) ve anti-apoptotik (Kaygusuzoglu ve ark., 2018) özellikler gösterdiğini kanıtlamıştır. Morin (3,5,7,2', 4'-pentahidroksiflavon), ilk olarak beyaz dut (*Morus alba L*) dallarından izole edilen bir biyoflavonoiddir. Bu sarı kristal polifenolik bileşik, badem, incir, çay, kırmızı şarap, çeşitli meyve ve sebzelerde bulunur

(Olonode ve ark., 2019). Morin'in en önemli avantajı, yüksek doz kullanımlarında bile toksisitesinin çok az olmasıdır. Yapılan bazı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda morin'in antioksidan, antienflamatuar, antidiyabetik, antiapoptotik, ve anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Gopal, 2013; Kim ve ark., 2010; Kuzu ve ark., 2018).



Şekil 1. Morin'in kimyasal yapısı

Bu çalışmada, doğal fenolik bir bileşik olan morin'in CA-I, CA-II, AChE ve  $\alpha$ -glikozidaz enzim aktiviteleri üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkileri incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar

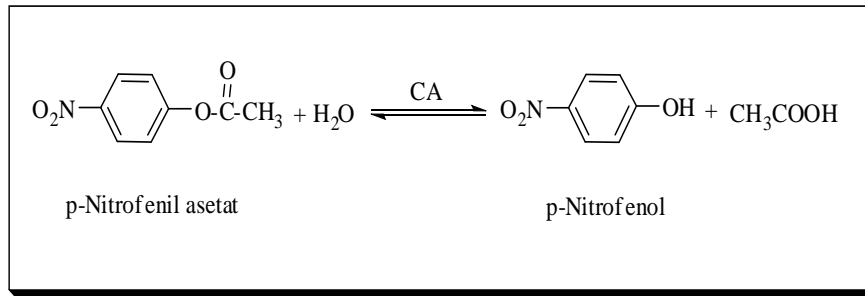
Deneyde kullanılan AChE,  $\alpha$ -glikozidaz, morin hidrat, *p*-nitrofenilasetat, asetilkolin iyodit, 5,5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic), *p*-nitrofenil-D-glikopiranosid ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich (St Louis, MO) şirketinden temin edildi. Tüm kinetik çalışmalar UV-1800 Shimadzu marka spektrofotometre ile (Kyoto, Japan) gerçekleştirilmiştir.

### CA izoenzim saflaştırma ve inhibisyon çalışması

Bu bölümde, sefaro-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile insan kanından CA-I ve CA-II izoenzimleri saflaştırılarak elde edildi. Deneyde kullanılan insan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi, Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Alınan kan örneklerinin eritrosit hücreleri kullanıldı. Elde edilen eritrositler, hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildikten sonra 4°C'de

13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımda kalan süpernatant kullanılmak üzere alındı ve katı Tris ile pH 8.7'ye ayarlanarak sefaro-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografi kolonuna tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl /22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Bu şekilde CA enzimi kolona tutunması sağlanıp diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Sonra 1 M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6.3) tamponu tatbik edilerek CA-I enzimi daha sonra 0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH:5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA-II enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa yardımıyla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Absorbans değerlerinin yüksek olduğu tüpler toplanarak diyaliz torbası içinde yaklaşık 3-4 saat 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH:7.4) tamponuyla yıkandı (Huyut ve ark., 2017). Yıkama işlemi bittikten sonra enzim saflığının kontrolü için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği kullanıldıktan sonra CA izoenzimleri deney için kullanıldı (Laemmli, 1970).

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA-I ve CA-II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine morin'in inhibisyon etkileri *in vitro* şartlarda esteraz metodu ile belirlendi. Bu metodun prensibi CA enzim varlığında substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatın 348 nm'de *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz olması esasına dayanır (Verpoorte ve ark., 1967). İnhibisyon çalışması için sabit substrat konsantrasyonunda morin'in beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) değerleri % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi. Daha sonra CA-I ve CA-II izoenzimleri için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda V-[S] değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı 1/V-[1/S] değerleri hesaplanıp, Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Ki değerleri ve inhibisyon tipleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

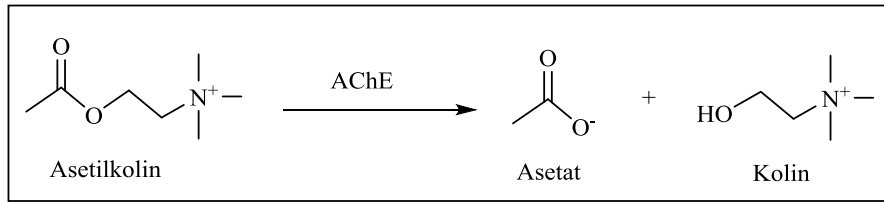


Şekil 2. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyon

### AChE enzim aktivitesi tayini ve inhibisyon çalışması

AChE, asetiltiyokolinin asetat ve tiyokoline parçalanması reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir. AChE aktivitesi, tiyokolin ile 5,5'-dithio-bis(2-nitro-benzoic)

DTNB arasındaki reaksiyonun sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin verdiği sarı rengin yoğunluğunun, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülmesi esasına dayanır. AChE enzim aktivitesi Ellman metoduna göre ölçüldü (Ellman ve ark., 1961).



Şekil 3. Asetilkolinin asetat ve koline dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyon

### $\alpha$ -glukozidaz enzim aktivitesi tayini ve inhibisyon çalışması

Substrat olarak p-nitrofenil-D-glikopiranosid kullanılan  $\alpha$ -glukozidaz enzim aktivitesi Tao ve arkadaşlarının prosedürüne göre spektrofotometrik yöntemle 405 nm'de gerçekleştirildi (Tao ve ark., 2013). CA-I ve CA-II izoenzimleri ve AChE enzimi için kullanılan inhibisyon çalışmaları  $\alpha$ -glukozidaz enzimi içinde kullanıldı.

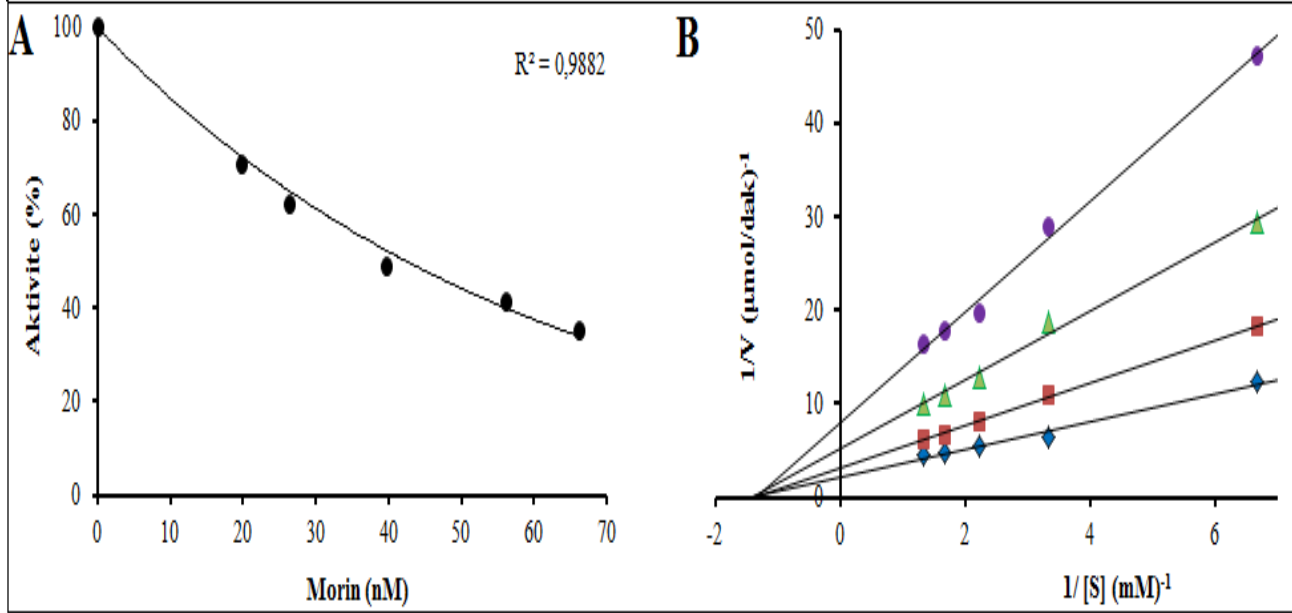
### BULGULAR VE TARTIŞMA

CA izoenzimleri glokoma, epilepsi ve bazı tümör çeşitleri gibi birtakım rahatsızlıkların tedavisi veya önlenmesi için tasarlanan farmakolojik ajanların ilginç hedeflerdir. Bu nedenle doğal ve vücuda herhangi bir yan etkisi olmayan doğal fenolik bileşiklerin CA enzim

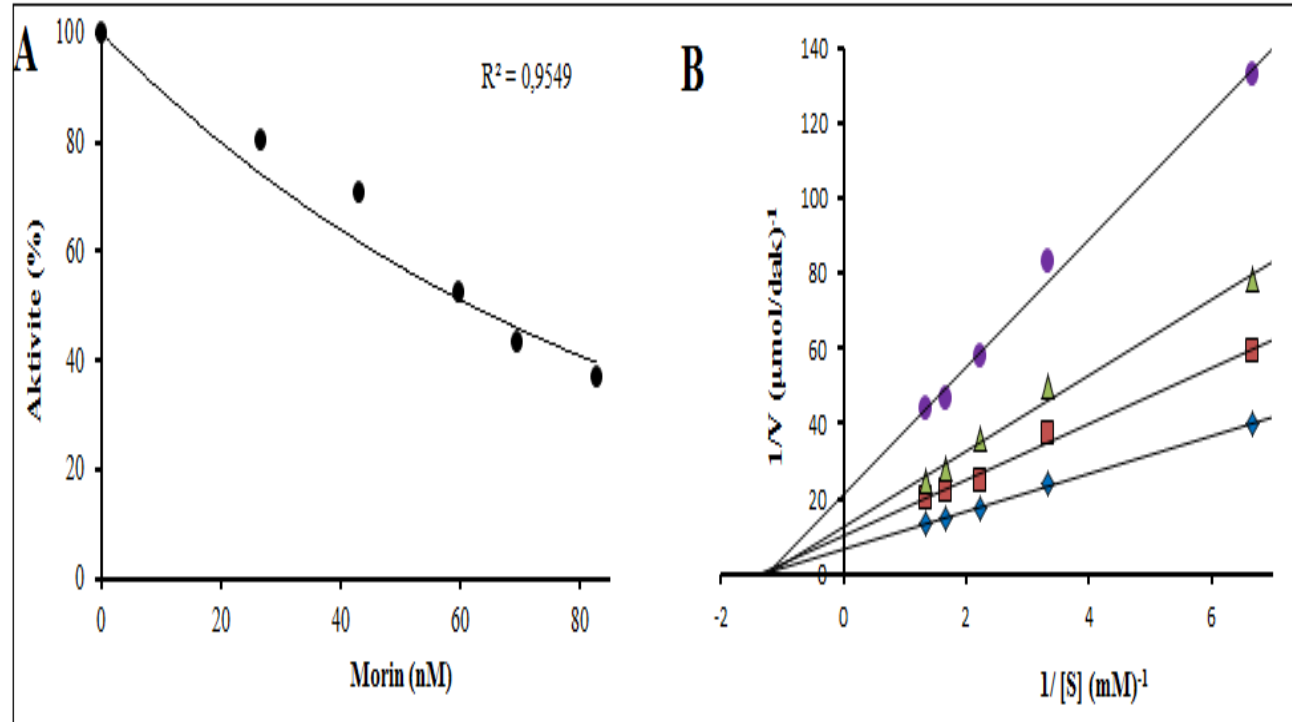
aktivitelerini inhibe etmeleri büyük önem arz etmektedir. Birçok doğal ve sentetik madde, enzim aktivitelerini değiştirerek düşük konsantrasyonlarda bile canlı metabolizmasını etkileyebilir (Gülçin ve ark., 2016). Fenol, katekol, rezorsinol, hidrokinon, pirogallol ve kuersetin gibi bazı antioksidan fenolik ve polifenolik bileşiklerin CA-I ve CA-II izoenzim aktivitelerini inhibe edici özellikleri daha önce incelenmiştir (Topal ve Gülçin, 2014). Ayrıca daha önce yaptığımız bir çalışmada krisin, karvakrol, hesperidin, naringin ve zingeron gibi aktif doğal fenolik bileşiklerin CA-I izoenzim aktivitesi üzerine Ki sabiti değerleri 3.70 nM – 79.66 nM aralığında, CA-II izoenzim aktivitesi üzerine Ki sabiti değerleri 2.98 nM – 84.88 nM aralığında inhibisyon etkisi göstermiştir (Taslimi ve ark., 2017).

Yapılan çalışmada doğal bir fenolik bileşik olan morin'in CA-I ve CA-II izoenzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş olup sonuçlar nM seviyede tespit edilmiştir. Enzimlerin sonuçları ve inhibisyon tipleri şekil 4 ve 5 gösterilmiştir. CA-I izoenziminin  $IC_{50}$

değeri 43.31 nM ve  $K_i$  sabiti  $31.89 \pm 9.07$  nM aralığında iken, CA-II izoenziminin  $IC_{50}$  değeri 63.00 nM ve  $K_i$  sabiti  $49.25 \pm 12.85$  nM aralığında olduğu çizelge 1'de gösterildiği gibi belirlenmiştir.



Şekil 4. Morin'in CA-I izoenzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi A)  $IC_{50}$  grafiği B)  $K_i$  grafiği



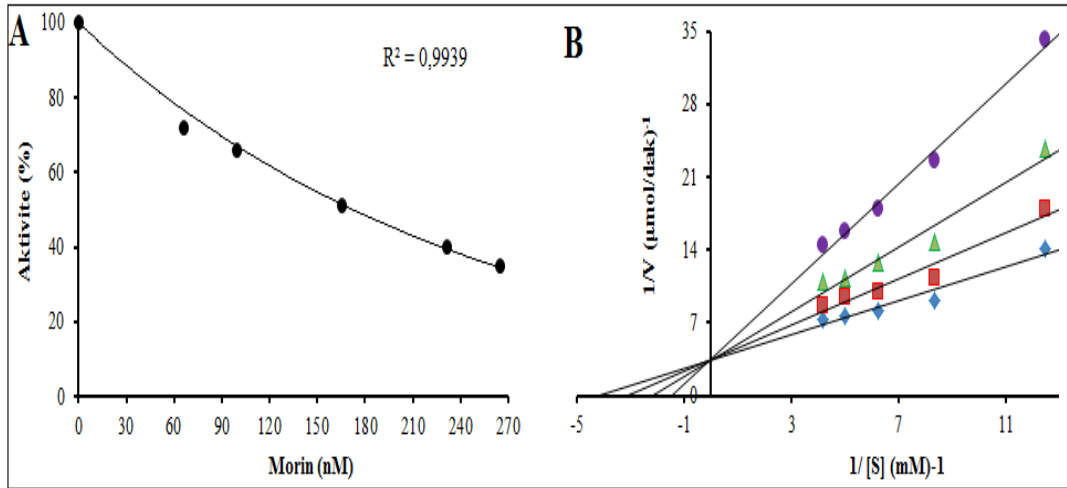
Şekil 5. Morin'in CA-II izoenzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi A)  $IC_{50}$  grafiği B)  $K_i$  grafiği

**Çizelge 1.** Morin'in CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisini gösteren IC<sub>50</sub> değeri ve K<sub>i</sub> sabitleri

Morin'in inhibisyon etkisi	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> (nM)	İnhibisyon tipi
CA-I	43.31	31.89 ± 9.07	Yarışmasız
CA-II	63.00	49.25 ± 12.85	Yarışmasız

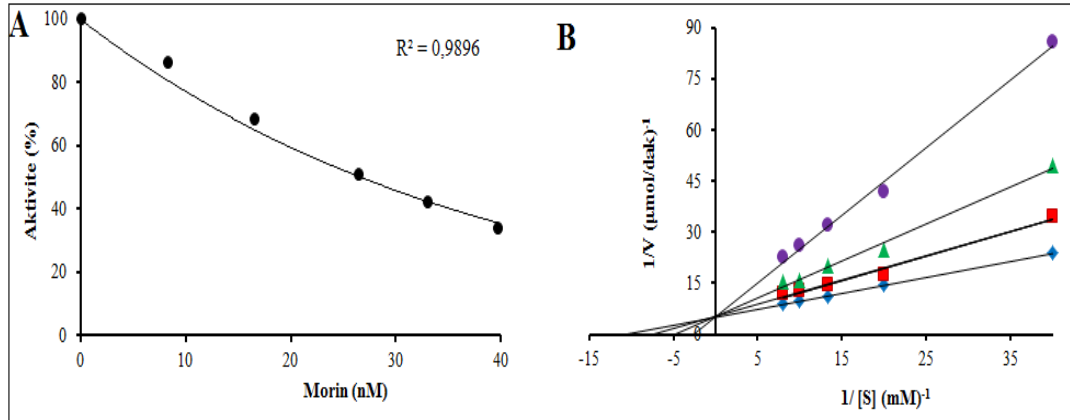
AChE inhibitörleri, hem periferik sinir sisteminde hem de merkezi sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak fonksiyon gören asetilkolinin normal parçalanmasını engelleyen ilaçlar olarak bilinirler (Topal ve ark., 2017). Bu ilaçların en önemli kullanım alanları genelde, Alzheimer hastalarında demans tedavisi içindir. Yapılan bazı çalışmalarda bu inhibitör ilaçların Alzheimer hastalığı olan insanların beyinlerindeki asetilkolin miktarını azalttığı kaydedilmiştir. Özellikle, galantamin ve takrin

gibi doğal bitkilerden izole edilen AChE inhibitörleri Alzheimer hastalığının farmakoterapötik tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Taslami ve ark., 2017). Bu yüzden yapılan çalışmada doğal bir madde olan morin'in AChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve nM seviyede inhibisyon gözlenmiştir. AChE enziminin IC<sub>50</sub> değeri 173.25 nM ve K<sub>i</sub> sabiti 184.67 ± 30.37 nM aralığında olduğu şekil 6 ve çizelge 2'de belirlenmiştir.

**Şekil 6.** Morin'in AChE enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi A) IC<sub>50</sub> grafiği B) K<sub>i</sub> grafiği

İnce bağırsağın fırçamsı kenarlarında bulunan  $\alpha$ -glikozidaz enzimleri, karbonhidrat moleküllerinin katalizinden sorumludur. İnsanlarda  $\alpha$ -glikozidazın inhibe edilmesi, tip-2 diyabette hiperglisemiyi kontrol etmenin etkili bir yolu olabileceği düşünülmektedir (Aksu ve ark., 2018).  $\alpha$ -glikozidaz inhibitörleri karbonhidrat sindirimini geciktirebilir ve genel karbonhidrat sindirim süresini uzatarak yemekten sonra yüksek kan şekeri miktarlarını azaltmaya yardımcı olabilir.  $\alpha$ -glikozidaz inhibitörleri arasında miglitol, vogliboz ve

akarboz klinik çalışmalarda tip-2 diyabetes mellitus için birinci basamak tedaviler olarak bilinirler. Ayrıca,  $\alpha$ -glikozidaz inhibitörleri obezite ve lizozomal depolanma hastalıklarında terapötik potansiyele sahip oldukları rapor edilmiştir (Aktaş ve ark., 2019). Mevcut çalışmada morin'in  $\alpha$ -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri nM seviyede gözlenmiştir.  $\alpha$ -glikozidaz enziminin IC<sub>50</sub> değeri 26.65 nM ve K<sub>i</sub> sabiti 16.99 ± 4.40 nM aralığında olduğu şekil 7 ve çizelge 2'de belirlenmiştir.



Şekil 7. Morin'in  $\alpha$ -glikozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi A)  $IC_{50}$  grafiği B)  $K_i$  grafiği

Çizelge 2. Morin'in AChE ve  $\alpha$ -glikozidaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisini gösteren  $IC_{50}$  değeri ve  $K_i$  sabitleri

Morin'in inhibisyon etkisi	$IC_{50}$ (nM)	$K_i$ (nM)	İnhibisyon tipi
AChE	173.25	$184.67 \pm 30.37$	Yarışmalı
$\alpha$ -glikozidaz	26.65	$16.99 \pm 4.40$	Yarışmalı

## SONUÇ

Doğal fenolik bir bileşik olan morin'in AChE,  $\alpha$ -glikozidaz, CA I ve II enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş olup, bu enzimlere karşı nanomolar inhibisyon olduğunu tespit edilmiştir. Ayrıca, morinin antidiyabetik, antikolinerjik ve antiepileptik özellikler gösterebileceği söyleyebilmek için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yaptıkları katkılardan dolayı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İlhami Gülçin ve Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Mehmet Kandemir'e teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

Aksu K, Akıncıoğlu H, Akıncıoğlu A, Göksu S, Tümer F, Gülçin İ, 2018. Synthesis of novel sulfamides incorporating phenethylamines and determination of their inhibition profiles against some metabolic enzymes. *Archiv der Pharmazie*, 351(9): 1800150.

Aktaş A, Celepci DB, Kaya R, Taslimi P, Gök Y, Aygün M, Gülçin İ, 2019. Novel morpholine liganded Pd-based N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure, antidiabetic and anticholinergic properties. *Polyhedron*, 159: 345-354.

Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comaklı S, Caglayan C, 2018. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(5): 448-457.

Caglayan C, Demir Y, Kucukler S, Taslimi P, Kandemir FM, Gulçin İ, 2018a. The effects of hesperidin on sodium arsenite-induced different organ toxicity in rats on metabolic enzymes as antidiabetic and anticholinergics potentials: A biochemical approach. *Journal of Food Biochemistry*, e12720.

Caglayan C, Gulçin İ, 2018. The toxicological effects of some avermectins on goat liver carbonic anhydrase enzyme. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(1): e22010.

- Caglayan C, Temel Y, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, 2018b. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(21): 20968-20984.
- Eldutar E, Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, 2017. Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31: e21960.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JV, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2): 88-95.
- Gopal JV, 2013. Morin hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. *Pharmacognosy Journal*, 5: 123-126.
- Gülçin İ, Abbasova M, Taslimi P, Huyut Z, Safarova L, Sujayev A, Farzaliyev V, Beydemir Ş, Alwasel SH, Supuran CT, 2017. Synthesis and biological evaluation of aminomethyl and alkoxymethyl derivatives as carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32: 1174-1182.
- Gülçin İ, Scozzafava A, Supuran CT, Koksal Z, Turkan F, Çetinkaya S, Bingöl Z, Huyut Z, Alwasel SH, 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31: 1698-1702.
- Huyut Z, Beydemir Ş, Gülçin İ, 2017. Inhibition properties of some flavonoids on carbonic anhydrase I and II isoenzymes purified from human erythrocytes. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31: e21930.
- Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, Caglayan C, Gülçin I, 2017a. Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: A Multi-biomarker approach. *Scientia pharmaceutica*, 85(1): 4.
- Kandemir FM, Ozkaraca M, Küçükler S, Caglayan C, Hanedan B, 2017b. Preventive effects of hesperidin on diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating TGF- $\beta$ 1 and oxidative DNA damage. *Toxin reviews*, 37(4): 287-293.
- Kaygusuzoglu E, Caglayan C, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Kılınc MA, Saglam YS, 2018. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102: 517-530.
- Kim JM, Lee EK, Park G, Kim MK, Yokozawa T, Yu BP, Chung HY, 2010. Morin modulates the oxidative stress-induced NF- $\kappa$ B pathway through its anti-oxidant activity. *Free radical research*, 44(4): 454-461.
- Köksal E, Bursal E, Gülçin İ, Korkmaz M, Çağlayan C, Gören AC, Alwasel SH, 2017. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3): 514-525.
- Kuzu M, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S, Caglayan C, Turk E, 2018. Morin attenuates doxorubicin-induced heart and brain damage by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106: 443-453.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3): 658-666.



- McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D, 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7): 2760-2766.
- Olonode ET, Aderibigbe AO, Adeoluwa OA, Eduviere AT, Ben-Azu B, 2019. Morin hydrate mitigates rapid eye movement sleep deprivation-induced neurobehavioural impairments and loss of viable neurons in the hippocampus of mice. *Behavioural brain research*, 356: 518-525.
- Tao Y, Zhang Y, Cheng Y, Wang Y, 2013. Rapid screening and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, 27(2): 148-155.
- Taslimi P, Caglayan C, Gulcin İ, 2017. The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and  $\alpha$ -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31: e21995.
- Taslimi P, Caglayan C, Farzaliyev V, Nabiyev O, Sujayev A, Turkan F, Kaya R, Gulcin İ. 2018a. Synthesis and discovery of potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and  $\alpha$ -glycosidase enzymes inhibitors: The novel N, N'-bis-cyanomethylamine and alkoxyethylamine derivatives. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32: e22042.
- Taslimi P, Osmanova S, Caglayan C, Turkan F, Sardarova S, Farzaliyev V, Sujayev A, Sadeghian N, Gulcin İ, 2018b. Novel amides of 1, 1-bis-(carboxymethylthio)-1-arylethanes: Synthesis, characterization, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibitory properties. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32: e22191.
- Taslimi P, Kandemir FM, Demir Y, İleritürk M, Temel Y, Caglayan C, Gulcin, İ. 2019. The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide-induced multiple organ toxicity in rats: Pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e22313.
- Topal F, Gulcin I, Dastan A, Guney M, 2017. Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecular*, 94: 845-851.
- Topal M, Gulcin İ, 2014. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turkish journal of chemistry*, 38: 894-902.
- Türkan F, Huyut Z, Taslimi P, Gulcin İ, 2018a. The in vivo effects of cefazolin, cefuroxime, and cefoperazon on the carbonic anhydrase in different rat tissues. *J Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32: e22041.
- Türkan F, Huyut Z, Taslimi P, Gulcin İ, 2018b. The effects of some antibiotics from cephalosporin groups on the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes activities in different tissues of rats. *Archives of physiology and biochemistry*, 1-7.
- Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT, 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18): 4221-4229.
- Xu P, Wu J, Zhang Y, Chen H, Wang Y, 2014. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and  $\alpha$ -glycosidase inhibition. *Journal of Functional Foods*, 6: 545-554.
- Zhang L, Hogan S, Li J, Sun S, Canning C, Zheng SJ, Zhou K, 2011. Grape skin extract inhibits mammalian intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice. *Food Chemistry*. 126: 466-471.