



**OLİVETOL'UN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Parham TASLİMİ

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
2017**

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**OLİVETOL'UN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE
İNİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Parham TASLİMİ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**OLİVETOL'UN ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI
METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Parham TASLİMİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet DOĞRU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN


İmza :

Üye : Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 26/10/2017 tarih ve 42/15 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

OLİVETOL'UN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Parham TASLİMİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu çalışmada fenolik bir madde olan Olivetol'un, asetilkolinesteraz (AChE), bütirilkolinesteraz (BChE), α -glukozidaz, α -amilaz, glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri ile insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri (hCA I ve II) üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı. Öncelikle hCA I ve II izoenzimleri Sefarose-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi tekniği ile sırasıyla 273,11; 734,93 kat ve %26,75; %15,74 verimle saflaştırıldı. GST ve GR enzimleri ise sırasıyla Glutatyon agaroz ve 2',5'-ADP-Sefarose-4B-Afinite kromatografisi teknikleri ile 176,30; 185,0 kat ve %40,45; %16,31 verimle saflaştırıldı. Enzimlerin saflığını belirlemek için sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve her bir enzim için tek bant gözlemlendi. Sonrasında Olivetol'un hCA I ve hCA II, GST, GR, AChE, BChE, α -glukozidaz ve α -amilaz üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Olivetolün her bir enzim için %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonu (IC_{50}) sırasıyla 90,87 nM; 118,66 nM; 9,90 μ M; 77,02 μ M; 5,13 nM; 6,01 nM; 45,47 nM; 204,24 nM olarak hesaplandı. İnhibisyon sabitleri (K_i) ise 88,05 \pm 11,15 nM; 178,27 \pm 35,94 nM; 6,02 \pm 1,15 μ M; 97 \pm 22,77 μ M; 3,40 \pm 0,34 nM; 2,73 \pm 0,18 nM; 41,85 \pm 9,38 nM olarak bulundu. Çalışmanın son kısmında Olivetol'un antioksidan ve radikal giderme kapasitesini değerlendirmek için, ferröz iyonları (Fe^{2+}) indirgeme, kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme, FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{3+}) indirgeme, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikalini (DPPH \cdot) giderme, 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikalini (ABTS $^{+}$) giderme, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikalini (DMPD $^{+}$) giderme ve süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme ile metal şelatlama aktivitesi çalışıldı.

2017, 143 sayfa

Anahtar Kelimeler: Olivetol, Antioksidan aktivite, Karbonik Anhidraz, Glutatyon S-transferaz, Glutatyon Redüktaz, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, α -Glukozidaz, α -Amilaz

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITIES OF OLIVETOL AND INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS ON SOME METABOLIC ENZYMES

Parham TASLİMİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In this study, *in vitro* inhibitory effect of olivetol against acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase, α -glycosidase, α -amilase, glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes I and II isoenzymes (hCA I and hCA II) was studied. Firstly, hCA I and II isoenzymes were purified by Sepharose-4B-L-Tyrosine affinity chromatography with 273.11 and 734.93 purification folds and %26.75 and %15.74 yields, respectively. Also, GST and GR enzymes were purified by Glutathione agarose and 2',5'-ADP-Sepharose-4B affinity chromatography techniques with 176.30, 185 purification folds and a yield of %40.45; %16,31, respectively. For purities of the enzymes, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was done and a single band observed for each enzyme. Then, IC_{50} and K_i values of hCA I, hCA II, GST, GR, AChE and BChE, α -glycosidase and α -amilase enzymes were calculated as 90.87 nM; 118.66 nM; 9.90 μ M; 77.02 μ M; 5.13 nM; 6.01 nM; 45.47 nM; 204.24 nM, respectively. At the same manner, K_i values were determined as 88.05 ± 11.15 nM; 178.27 ± 35.94 nM; 6.02 ± 1.15 μ M; 97 ± 22.77 μ M; 3.40 ± 0.34 nM; 2.73 ± 0.18 nM; 41.85 ± 9.38 , respectively. In the last part of this study, for evaluation of antioxidant and radical scavenging capacity of olivetol, ferrous ions (Fe^{2+}) reducing capacity, cupric ions (Cu^{2+}) reduction capacity by Cuprac method, FRAP reducing capacity, DPPH free radical scavenging, ABTS radical scavenging, DMPD radical scavenging, superoxide anion radical ($O_2^{\bullet -}$) scavenging and, metal chelating activities were performed.

2017, 143 pages

Keywords: Olivetol, Antioxidant activity, Carbonic Anhydrase, Glutathione S-transferase, Glutathione Reductase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, α -Glycosidase, α -Amilase

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Türkiye Bilimler Akademisi assosiyeye üyesi değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışma arkadaşlarım doktora öğrencisi Yeliz DEMİR, ve Gümüşhane Üniversitesinde öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL, ve Ağrı İbrahim een Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışanı bütün arkadaşlarıma,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen dedeme, eşim Nastaran SADEGHIAN'a, kızım Rümeyya'ya, anneme, babama ve bütün aileme çok teşekkür ederim.

Parham TASLİMİ

Ekim, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.1.1. Enzimatik kataliz mekanizmaları.....	1
1.1.1.a. Asit-baz katalizi.....	2
1.1.1.b. Kovalent kataliz.....	2
1.1.1.c. Metal iyon katalizi.....	2
1.1.1.d. Elektrostatik kataliz.....	2
1.1.1.e. Yakınlık ve düzenlenme etkisi.....	3
1.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri.....	3
1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması.....	4
1.1.4. Enzimlerin biyolojik işlevleri.....	5
1.1.5. Enzimlerin endüstriyel kullanımları.....	6
1.1.6. Enzim Kinetiği.....	6
1.1.7. İmmobilize enzimler.....	7
1.2. Afinite Kromatografisi.....	8
1.2.1. Matriks.....	10
1.2.2. Ligand.....	10
1.2.3. Uzantı kolu.....	11
1.2.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi.....	11
1.3. Karbonik Anhidraz.....	12
1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE, E.C. 3.1.1.7).....	15
1.5. Bütirikolinesteraz Enzimi.....	20
1.6. Glutasyon S-Transferaz.....	21

1.7. Glutasyon Redüktaz	23
1.8. α -Glikozidazlar	25
1.9. α -Amilazlar	28
1.10. Serbest Radikaller	29
1.11. Antioksidanlar	30
1.12. Sentetik Antioksidanlar	32
1.13. Doğal Antioksidanlar	32
1.14. Antioksidanların Etkisi	33
1.15. Yaygın Olarak Kullanılan Antioksidan Metotlar	34
1.16. Fenolik Bileşikler	34
1.17. Olivetol	35
1.18. Çalışmanın Amacı ve Önemi	36
2. KAYNAK ÖZETLERİ	38
3. MATERYAL ve METOT	47
3.1. Materyal	47
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	47
3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar	47
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	48
3.2. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enziminin Saflaştırılması İçin Kullanılacak Kanın Temini	56
3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enzim Saflaştırma Çalışmaları	56
3.3.1. Karbonik anhidraz enzim hemolizatının hazırlanması	56
3.3.2. CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	57
3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini	59
3.4.1. Hidrataz aktivitesi	59
3.4.2. Esteraz aktivitesi	59
3.5. Protein Tayini	61
3.5.1. Kalitatif protein tayini	61
3.5.2. Kantitatif protein tayini	61
3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	62
3.7. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine Olivetol'un Etkisinin Belirlenmesi	62

3.8. İnsan Eritrositlerinden Glutasyon S-transferaz Enzim Saflaştırma	
Çalışmaları	62
3.8.1. Glutasyon S-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	62
3.8.2. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini.....	63
3.8.3. Olivetol'un glutasyon redüktaz, glutasyon s-transferaz, α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerin üzerine inhibisyon etkisi	64
3.9. İnsan Eritrositlerinden Glutasyon Redüktaz Enziminin Saflaştırmasıyla ilgili	
Çalışmalar	65
3.9.1. Kan temini ve hemolizat hazırlanması	65
3.9.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	65
3.9.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve insan eritrosit GR enziminin saflaştırılması	66
3.9.4. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması, insan eritrosit GR enziminin saflaştırılması	67
3.9.5. Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini	68
3.10. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	70
3.11. α -Amilaz Enziminin Aktivite Tayini.....	70
3.12. Antioksidan Çalışmaları	71
3.12.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi	71
3.12.2. Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu).....	71
3.12.3. FRAP indirgeme aktivitesi	71
3.12.4. Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi.....	72
3.12.5. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi.....	72
3.12.6. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi ...	73
3.12.7. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi	73
3.12.8. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi	73
3.13. Olivetol'un Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine inhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	74
3.14. Olivetol'un Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine inhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	75

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	77
4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	77
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	77
4.1.2. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	78
4.1.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	79
4.1.4. hCA I ve II izoenzimleri esteraz aktiviteleri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları.....	80
4.1.4.a. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde olivetol ve asetazolamid inhibisyon etkisi ile ilgili sonuçlar.....	80
4.1.4.b. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde olivetol ve asetazolamid inhibisyon etkisi ile ilgili sonuçlar.....	82
4.2. Glutasyon S-transferaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	85
4.2.1. Glutasyon S-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	85
4.2.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	86
4.2.3. GST enziminin aktivitesi üzerinde Olivetolun inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar.....	87
4.3. Glutasyon redüktaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	88
4.3.1. Glutasyon redüktaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	88
4.3.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	89
4.3.3. GR enziminin aktivitesi üzerinde olivetolun inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar.....	90
4.4. AChE ve BChE Enzim Aktiviteleri Üzerine Olivetolün Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları	91
4.4.1. AChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin ile ilgili sonuçlar	91
4.4.2. BChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin ile ilgili sonuçlar	93
4.5. α -Glikozidaz Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Olivetol İle İlgili Sonuçlar	96

4.6. α -Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Olivetol İle İlgili IC ₅₀ Sonucu.....	97
4.7. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	98
4.7.1. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme kuvveti bulguları	98
4.7.2. Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular.....	99
4.7.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları	100
4.7.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	102
4.7.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları	104
4.7.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları	106
4.7.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları.....	107
4.7.8. Ferrozin reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi bulguları.....	108
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	110
KAYNAKÇA.....	131
ÖZGEÇMİŞ	144

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ⁺	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)radikali
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
BChE	Bütirilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ⁺	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit)
E.C.	Enzim komisyon numarası
EÜ	Enzim Ünitesi
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
I ₅₀	Enzim maksimum hızını yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IC ₅₀	Mevcut konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrant konsntrasyonu
LOO•	Lipit peroksit radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PER	Amonyum persülfat
ROS	Serbest oksijen radikali
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit

TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi (1)'de ligand matrikse kovalent bağlanması, (2)'de numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elde edilir.	9
Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü	11
Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enzimin inhibitörlerinin yaptığı sorun	13
Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enzimini katalik ve inhibisyon mekanizması.....	15
Şekil 1.5. AChE enziminin asetilkolinle etkileşimi	16
Şekil 1.6. AChE enziminin X-Ray görüntüsü (RCSB Protein Data Bank)	17
Şekil 1.7. Asetilkolinesteraz enzimin katalitik mekanizması	17
Şekil 1.8. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı	18
Şekil 1.9. AChE aktivitesinin farklı mekanizmalar tarafından inhibisyonu	19
Şekil 1.10. Yaygın olarak kullanılan takrin, rivastigmin, galantamin ve donepezil gibi AChE inhibitörleri.....	19
Şekil 1.11. İndirgenmiş Glutasyon (γ -Glutamil-sisteinil-glisin).....	21
Şekil 1.12. Glutasyon redüktaz enziminin katalitik reaksiyonları.....	24
Şekil 1.13. Diyabet türleri ve insulinin etki mekanizması.....	26
Şekil 1.14. a. α -Glukozidaz enziminin substrata etki şekli, b. α -Glukozidaz'ın pNPG substratına etki şekli.....	27
Şekil 1.15. α -Glikozidaz enziminin inhibisyon mekanizması	28
Şekil 1.16. α -Glikozidaz ve α -amilaz enzimlerin etki mekanizmaları.....	29
Şekil 1.17. Antioksidanların sınıflandırılması	31
Şekil 1.18. Olivetol'un yapısı	36
Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın enzimatik olarak p-nitrofenole dönüşüm mekanizması..	60
Şekil 3.2. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması.....	63
Şekil 3.3. Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayini	75
Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik.	77

Şekil 4.2. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM Na ₂ HPO ₄ pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH ₃ COO/0,5 M NaClO ₄ pH: 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği ..	78
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı	79
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği.....	80
Şekil 4.5. hCA I izoenzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	81
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği	81
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	82
Şekil 4.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği.....	83
Şekil 4.9. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 4.10. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği	84
Şekil 4.11. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..	84
Şekil 4.12. İnsan eritrositlerinden elde edilen GST enziminin Glutasyon Agaroz afinite kolonundan elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği	85
Şekil 4.13. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Glutasyon S-transferaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	86
Şekil 4.14. GST enziminin farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [olivetol] grafiği	87
Şekil 4.15. GST enzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	87

Şekil 4.16. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GR enziminin Glutasyon Sefaroz-4B afinite kolonundan elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği	88
Şekil 4.17. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Glutasyon redüktaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....	89
Şekil 4.18. GR enziminin farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği	90
Şekil 4.19. GR enzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	90
Şekil 4.20. AChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği	91
Şekil 4.21. AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 4.22. AChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği.....	92
Şekil 4.23. AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	93
Şekil 4.24. BChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği	94
Şekil 4.25. BChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	94
Şekil 4.26. BChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği.....	95
Şekil 4.27. BChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	95
Şekil 4.28. α -Glikozidaz enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği	96
Şekil 4.29. α -Glikozidaz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	97
Şekil 4.30. α -Amilaz enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği	98

Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) olivetol'un ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	99
Şekil 4.32. Olivetol'un farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını (Cu ²⁺) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	100
Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki olivetol'un FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	101
Şekil 4.34. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	102
Şekil 4.35. Olivetol'un farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	103
Şekil 4.36. ABTS ^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS ^{•+} için hazırlanan standart grafik.....	104
Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlardaki olivetol'un (10-30 µg/mL) ABTS ^{•+} giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	105
Şekil 4.38. DMPD ^{•+} giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik	106
Şekil 4.39. Olivetol'un (10-30 µg/mL) konsantrasyonundaki DMPD ^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, troloks ve α-tokoferol ile karşılaştırması.....	107
Şekil 4.40. Olivetol'un çözeltisinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	108
Şekil 4.41. Olivetol farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) ferröz (Fe ²⁺) iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	109
Şekil 5.1. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen neokuprin molekülünün indirgenme reaksiyonu	121
Şekil 5.2. Fe ³⁺ -TPTZ kompleksinin Fe ²⁺ -TPTZ kompleksine indirgenmesi.....	122

Şekil 5.3. Bir antioksidan olan olivetol tarafından DPPH radikalinin giderilmesi.....	124
Şekil 5.4. ABTS radikalinin (ABTS ^{•+}) oluşum mekanizması.....	125
Şekil 5.5. DMPD ^{•+} radikalinin oluşum ve giderilmesi.....	126
Şekil 5.6. Bir metal şelatörü olan Ferrozin'in açık kimyasal yapısı	129
Şekil 5.7. Olivetolün Fe ²⁺ iyonu ile bağlanarak oluşturabileceği muhtemel kompleks yapısı	129



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.....	4
Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar	10
Çizelge 1.3. Çeşitli kaynaklardan izole edilen GST enzimlerinin bazı yapısal özellikleri	23
Çizelge 3.1. Karbonik Anhidraz esteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği..	60
Çizelge 3.2. GST enziminin aktivite ölçümünde kullanılan kuvvet içeriği.....	64
Çizelge 3.3. Asetilkolinesteraz aktivite tayininde kuvvet içeriği	75
Çizelge 3.4. Bütirikolinesteraz aktivite tayininde kuvvet içeriği.....	76
Çizelge 4.1. Afinite kolonu ile insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	79
Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değerleri ve inhibisyon türleri	82
Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetol'un ve Asetazolamid'in K_i değerleri ve inhibisyon türleri.....	85
Çizelge 4.4. Afinite kolonu ile insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan GST enziminin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	86
Çizelge 4.5. GST enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un K_i değeri ve inhibisyon türü	88
Çizelge 4.6. Afinite kolonu ile insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan GR enziminin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	89
Çizelge 4.7. GR enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un K_i değeri ve inhibisyon türü	91
Çizelge 4.8. AChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve Takrin K_i değerleri ve inhibisyon türleri	93

Çizelge 4.9. BChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin K_i değerleri ve inhibisyon türleri.....	96
Çizelge 4.10. α -Glikozidaz enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri.....	97
Çizelge 4.11. α -Amilaz enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un IC_{50} ve K_i değeri	98
Çizelge 4.12. 30 μ g/mL konsantrasyonunda olivetol'un çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları	101
Çizelge 4.13. Olivetol çözeltilerinin DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^{+\cdot}$, DMPD $^{+\cdot}$ ve $O_2^{\cdot-}$ radikali giderme ve ferrozin metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	109
Çizelge 5.1. Olivetol hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisine ait ortalama IC_{50} ve K_i değerleri.....	113
Çizelge 5.3. GR enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un K_i değeri ve inhibisyon türü	116
Çizelge 5.4. AChE ve BChE enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetol ve takrin'in IC_{50} ve K_i değerleri	118
Çizelge 5.4. 30 μ g/mL konsantrasyonunda olivetol'un çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları	123
Çizelge 5.5. Olivetol çözeltilerinin DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^{+\cdot}$, DMPD $^{+\cdot}$ ve $O_2^{\cdot-}$ radikali giderme ve ferrozin metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	128

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan biyolojik katalizörlerdir. Biyokimya tarihinin çoğu, enzim araştırmalarının tarihinden oluşmaktadır. Biyolojik kataliz, ilk olarak midenin salgılarıyla etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedilmiştir. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirilmiştir (Berg *et al.* 2013). 1850'lerde Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin fermentler tarafından katalizlendiği sonucuna varmış, 1897'de Eduard Buchner yine maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da fermantasyonun hücreden uzaklaştırıldığında işlevine devam eden moleküller tarafından gerçekleştirildiğini keşfetmiştir (Lehninger 1993; Berg *et al.* 2013). Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırmış, böylece enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılmaya başlanması ile biyokimya biliminin yeni bir alanı, enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimoloji ortaya çıkmıştır (Gözükara 1989). Enzimolojinin keşfedilmesi ile birlikte 1930'larda J.B.S Haldane Enzimler başlığı altında bilimsel bir eser yazmıştır. Haldane, enzimlerin moleküler yapıları henüz tam olarak anlaşılmamış olunmasına karşın enzim substrat arasındaki zayıf bağı etkileşimlerin substratın değişmesiyle sonuçlandığını ve bu mekanizmanın bir tepkimenin katalizlenmesi ile gerçekleşiyor olabileceği önerisinde bulunmuş ve enzimatik katalizin temelini oluşturmuştur (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

1.1.1. Enzimatik kataliz mekanizmaları

Reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimeyi hızlandıran ve reaksiyondaki geçiş halinin kararlılığını arttıran moleküller olan enzimlerin kataliz mekanizmaları beş

alt başlıkta incelenebilir (Lehninger 1993).

1.1.1.a. Asit-baz katalizi

Asit katalizinde reaksiyonun geçiş halinin serbest enerjisinin düşürülmesi proton vericisi olan Brønsted asidi'nden kısmi proton transferi ile gerçekleştirilir. Enzim katalizli reaksiyonlarda asit-baz katalizi birbirine eşlik etmektedir. Enzim moleküllerinin aktif bölgelerinde yer alan aminoasit kalıntıları (Arg, Asp, Cys, Glu, His, Lys, Tyr) proton alıcısı veya proton sağlayıcısı olarak görev yapmaktadırlar (Lehninger 1993).

1.1.1.b. Kovalent kataliz

Kovalent kataliz nükleofilik ve elektrofilik adımların her ikisini de içermektedir. Kataliz mekanizması katalizör ile substrat arasındaki nükleofilik reaksiyon ile başlayıp elektrofilik katalizörün elektronları reaksiyon merkezinden çekmesiyle devam etmekte, reaksiyonun birinci basamağa tekrar geri dönmesi ile de sonlanmaktadır (Lehninger 1993).

1.1.1.c. Metal iyon katalizi

Enzimlerin üçte birlik kısmı katalitik aktivite gösterebilmeleri için metal iyonu varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun yanı sıra metal iyonları katalitik prosese, substrata bağlanıp reaksiyon için substratın yeniden düzenlenmesini sağlayarak, yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarında arabuluculuk görevi üstlenerek, elektrostatik kararlılığı veya negatif yüklerin kaymasını sağlayarak katılabilirler (Lehninger 1993).

1.1.1.d. Elektrostatik kataliz

Elektrostatik katalizde substrat, enzim molekülünün aktif bölgesine bağlanmaktadır. Bu

aktif cepte yerleşmiş olan yüklü gruplar substrat molekülü üzerindeki hidrofobik yan zincirler ile yeniden düzenlenmektedir (Lehninger 1993).

1.1.1.e. Yakınlık ve düzenlenme etkisi

İntramoleküler reaksiyonlar intermoleküler reaksiyonlara göre daha kolay gerçekleşmektedirler. Substrat ve enzim arasındaki katalitik reaksiyonda, ES kompleksinin oluştuğu kritik adımda da enzim ve substrat molekülleri birbirlerine çok yakındırlar. Bu sebeple reaksiyon intramoleküler reaksiyonlar da olduğu gibi hızlı bir biçimde gerçekleşir. Düzenlenme etkisi ise, enzimin asıl substratının yokluğunda aktif merkezinin kendi substrat analoguna karşı yeniden düzenlenebilme yeteneğidir (Lehninger 1993).

1.1.2. Enzimlerin yapısal özellikleri

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç, bütün enzimler proteindirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarına bağlıdır; bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa veya aminoasit komponentlerine yıkılırsa, katalitik aktivitesi kaybolur. Enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır. Bazı enzimler aktivite için protein yapıyı oluşturan aminoasit kalıntılarında başka kimyasal yan gruplara ihtiyaç duymazlar. Bazıları ise kofaktör diye adlandırılan ek kimyasal gruplara gereksinim duyarlar (Nelson and Cox 2004). Kofaktörler, ya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi inorganik iyonlar ya da koenzim denen organik veya metalloorganik kompleks moleküllerdir (Nelson and Cox 2004). Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılır; holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmına apoenzim veya apoprotein denmektedir. Prostetik gruplar, holoenzimlerin kofaktör kısımlarına kovalent olarak bağlı olan gruplardır. Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenlerine ise kosubstrat denmektedir (Nelson and Cox 2004).

1.1.3. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması

Enzimlerin çoğu substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna -az son eki eklenerek adlandırılmaktadır. Bu adlandırma şekline ürenin hidrolizini katalize eden “ürez” örnek olarak gösterilebilir. Bunun yanında, substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan genel bir tanıma uymayan enzim isimleri de (pepsin, tripsin) mevcuttur (Nelson and Cox 2004). Karışık isimlendirmeler sebebiyle bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanıldığı olmuştur, bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle problemler ve keşfedilen enzim sayısının sürekli ve hızlı artması sebebiyle uluslararası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem oluşturulmuştur. Enzimler salgılanma şekillerine göre hücre içi enzimler ve hücre dışı enzimler olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Hücre dışı enzimler besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanırlar. Enzimler Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri temel alınarak altı ana sınıfa ayrılmışlardır. Her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır (Taslimi *et al.* 2017a).

Çizelge 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması

No	Sınıf	Katalizlenen Tepkime Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin harcanmasıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Sistemik adlandırma sisteminde, her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından verilen dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistemik bir ad verilmiştir (Taslimi *et al.* 2017b).

1.1.4. Enzimlerin biyolojik işlevleri

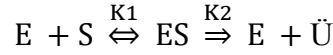
Enzimlerin canlılardaki rolü çok büyüktür. Hareket esnasında ATP hidrolizinin katalizinde görev alarak kasların kasılmasını sağlayan miyozin, hücrede sinyal iletimindeki işlevleriyle kinaz ve fosforilazlar enzimlerin insan metabolizmasındaki rollerine örnek olarak verilebilirler (Taslimi *et al.* 2017c). Nişasta, protein gibi bağırsaktan emilimlerinin mümkün olmadığı büyük moleküllerin bağırsaktan absorpsiyonlarının uygun hale getirilmesi için hidrolizlerini katalizleyen amilaz, proteaz benzeri enzimler de yine insan metabolizmasındaki enzimlerdendir (Taslimi *et al.* 2017c). Ateş böceklerinde ışık üretiminden sorumlu olan lüsiferazlar, otobur hayvanların bağırsaklarındaki mikroorganizmaların, selülozlu hücre duvarlarını sindirmeleri için ürettikleri selülaz, virüslerde ise, hücreleri enfekte etmede veya hücrelerinden virüslerin salınmasında iş gören entegraz, ters transkriptaz veya nöraminidazlar ise enzimlerin diğer canlılardaki görevlerine örnek olarak verilebilir. Birçok enzim beraberce çalışarak metabolik ortak yollar meydana getirirler (Demain and Solomon 1981). Metabolik bir yolda, bir enzimin ürünü, bir diğeri tarafından substrat olarak kullanılır. Bazen birden çok enzim türü aynı tepkimeyi paralel olarak yürütebilir, böylece daha karmaşık düzenlemeler mümkün olur; bir enzim düşük seviyeli ve sabit bir etkinlik sağlarken, diğeri tetiklenebilen (indüklenebilen) yüksek seviyeli bir etkinlik sağlar. Enzimlerin hastalıklardaki rolleri de oldukça büyüktür (Taslimi *et al.* 2017c). Örnek olarak fenilalanin yıkımının ilk adımını katalizleyen fenilalanin hidroksilaz enziminin mutasyonunun, fenilalanin ve ilişkili ürünlerin vücutta birikimine sebep olması ve tedavi edilmediğinde zekâ geriliğine sebep olması ve DNA tamir enzimlerinin mutasyonları ile oluşan kanser sendromları verilebilir (Taslimi *et al.* 2017b).

1.1.5. Enzimlerin endüstriyel kullanımları

Hücrelerde önemli metabolik görevlere sahip olan enzimler, çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata da girmişlerdir. Enzimler; alkollü içecekler, ekmek, bebek gıdaları üretimi, peynir, temizlik malzemelerinde, meyve suyu ve süt üretiminde ve tıpta teşhis ile tedavi işlemlerinde yoğun miktarlarda kullanılmaktadırlar (Taslimi 2013). Ayrıca nişasta, kimya, kâğıt, biyoyakıt, fotoğraf ve kauçuk endüstrisinde, kontakt lens temizleyicilerinden, ziraatta, biyolojik savaşta kullanıma kadar çok geniş alanlarda da kullanılmaktadır. Enzimlerin bu nedenlerle çok alanlarda kullanılmaktadırlar; çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmaları, maliyet bakımından ucuz olmaları, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamaları ve yüksek katalitik etkinlikleri bunlardan birkaçıdır. Enzimler sadece reaksiyonlara değil substratlara karşı da spesifite göstermektedir. Bu özellikleri ile istenilen tek bir son ürün oluşabildiğinden maliyetin düşmesi de sağlanabilmektedir. Ayrıca çalışma şartlarının kimyasal katalizörlere kıyasla daha ılımlı olması enerji sarfiyatını ve dolayısıyla işletme maliyetini düşürmektedir (Taslimi *et al.* 2013). Tüm bu özelliklerinden dolayı 1960'lardan bu yana enzimlerin endüstriyel kataliz olarak kullanımları artan bir ivmeyle yaygınlaşmaktadır. Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 1,6 milyar doları aşmaktadır. Endüstriyel enzimler arasında ise %60'lık pazar payı ile en büyük grubu proteazlar oluşturmaktadır. Bunu %28 ile karbohidrazlar, %2 ile lipazlar ve %10 ile diğer enzim grupları izlemektedir. Günümüzde proteazlar gibi birçok mikrobiyal enzim, önemli araştırma konusu haline gelmiş, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır (Taslimi *et al.* 2013).

1.1.6. Enzim Kinetiği

Enzimler çoğunlukla Michaelis-Menten kinetiği ile gösterilirler. Michaelis-Menten, enzim katalizli reaksiyonların özelliklerinin genelini kapsayan bir model öne sürmüştür. Bu modelde, enzim substratına geri dönüşümlü olarak bağlanıp bir enzim-substrat kompleksi meydana getirir (Segel 1968). Daha sonra oluşan kompleks ürüne dönüşür.



Burada S; substrat, E; enzim, ES; enzim-substrat kompleksi k1 ve k2 hız sabitleridir. Bir enzimatik reaksiyonun hızı, substrat ve enzim konsantrasyonuna bağlıdır. Michaelis-Menten denklemi, reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Enzimatik reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilirse hiperbolik bir eğri meydana gelir. Leonor Michaelis ve Maud Menten bu hiperbolik eğri eşitliğini enzim kinetiğine uygulayarak, Michaelis-Menten denilen aşağıdaki eşitliği elde etmişlerdir (Segel 1968).

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Michaelis-Menten eşitliğinde;

V_0 =ilk hız, V_{\max} : Maksimum hız, $[S]$: Substrat derişimi, K_m : Micheales sabitini göstermektedir. K_m enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_m 'nin sayısal değeri, reaksiyon hızının yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonudur. Enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Sayısal olarak küçük K_m , enzimin substrata ilgisinin yüksek olduğunu gösterirken, sayısal olarak yüksek K_m ise enzimin substrata olan ilgisinin düşük olduğunu gösterir (Segel 1968). K_m ve V_{\max} değerlerini daha kolay hesaplayabilmek için Michealis-Menten bağıntısı yeniden düzenlenebilir. Eğer $1/V_0$, $1/[S]$ 'ye karşı grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir. Bu grafiğe Lineweaver-Burk grafiği (çift resiprok eğrisi) denir (Lineweaver and Burk 1934).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

1.1.7. İmmobilize enzimler

Enzimler, suda çözünebilir biyokatalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların büyük

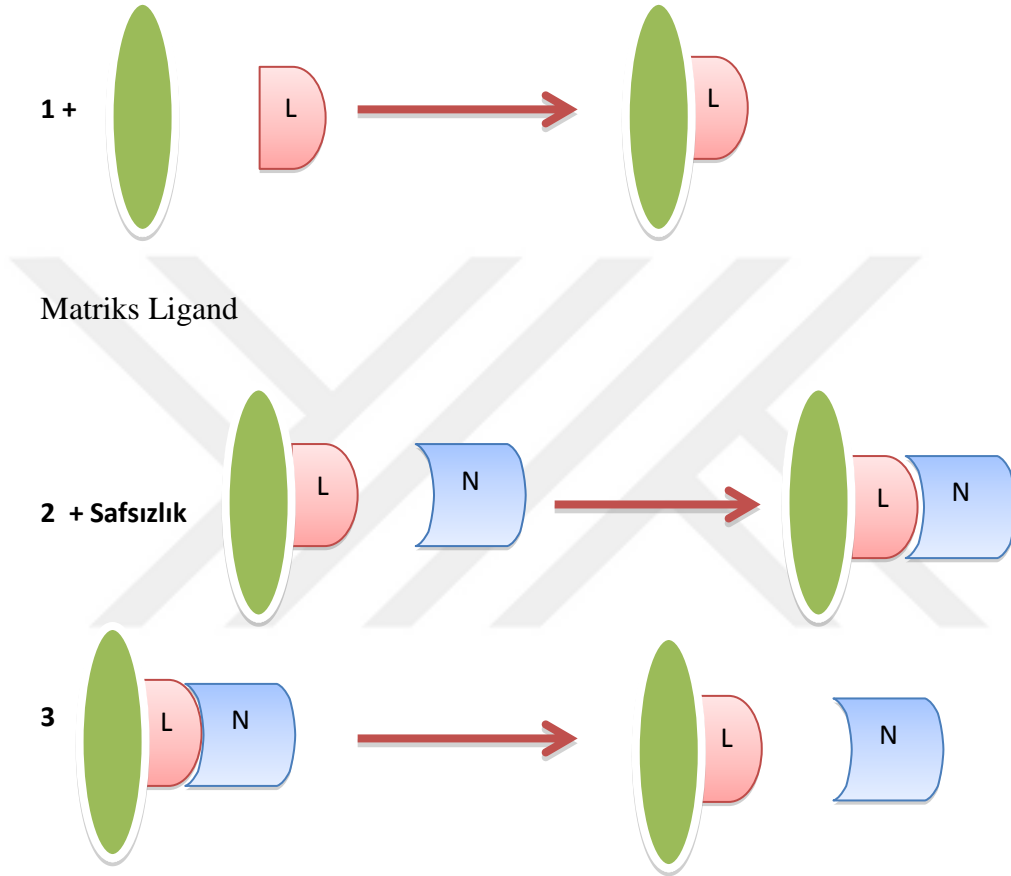
çoğunluğu çözelti ortamında gerçekleştiği için, biyokatalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması imkansızdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenildiği zaman uzaklaştırılmadığı için, reaksiyonun kontrolü çok zordur. Reaksiyonun istenilen zamanda durdurabilmesi için ortama inhibitör katılması gerekir (Taslimi *et al.* 2013). Aynı zamanda inhibitör ilavesi reaksiyon ortamında kirliliğe neden olur. Bu da reaksiyon ortamında kirlenen ürünün saflaştırılması maliyetini artırır. Bu sorunları çözebilmek ve enzimleri endüstriyel uygulamalarda daha uygun hale getirmek için immobilize enzimler kullanılır. Endüstriyel uygulamalarda adsorpsiyon, tutuklama, iyonik bağlama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi yaygın olarak kullanılan enzim immobilizasyon yöntemleri bulunmaktadır (Taslimi *et al.* 2013).

1.2. Afinite Kromatografisi

Kromatografi tekniği, bir karışımda mevcut olan bileşiklerin ya maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı ve aşamalı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. İlk defa Rus botanikçesi olan Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilen bir metottur. Tsvett bu metodu bitki pigmentlerinin renkli bileşiklerini ayırma için kullanmıştır. Dolayısıyla kullandığı kolonda renkli bandlar gördüğünde, bu ayırma metoduna kromatografi ismini vermiştir (Wilchek and Chaiken 2000).

Biyomoleküllerin pH, iyonik kuvvet, sıcaklık, tuz, çözücü veya polimerler ile çöktürülerek ayrılmasına dayanan önceki yöntemler zaman geçtikçe yerini biyolojik özelliklere dayalı ayırma yöntemlerine vermiştir. Bunun için afinite kromatografisi, proteinlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin yerine biyolojik kullanımlarına göre ayrılmalarını gerçekleştiren bir metottur (Wilchek and Chaiken 2000; Zou *et al.* 2001). Bu yöntemde biyoafinite, immunoafinite, DNA afinitesi, lektin afinitesi, biyomimetik afinite, boronat afinitesi ve metal iyonu afinitesi gibi farklı gruplara ayrılmaktadır. Bu yöntemler karbonhidrat, protein, enzim, vitamin gibi fazla bileşiklerin ayrılmasında, antijen ve antikör saflaştırmalarında kullanılabilir. Bu yöntemin çok önemli

avantajı; uygun şartlarda hedef proteinin tek bir adımda veya aşamada saflaştırılabilmesidir. Afinite koromatografisinin genel çalışma prensibi Şekil 1.1'de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi (1)'de ligand matrikse kovalent bağlanması, (2)'de numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elde edilir.

Afinite metodu, önemli olan biyomolekülün, çözünme yapmayan bir destek maddesi (matriks) üzerine bir immobilize olan ve belirlediğimiz molekülü tamamlayıcı bağlanma uçları içeren ligandlar tarafından dönüşümlü olan ve özel olarak adsorbe edilmesine dayalı bir metottür (Wilchek and Chaiken 2000).

Çizelge 1.2. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar (Axen and Ernback 1971)

No	Safılaştırılacak Madde	Ligand
1	Antikor	Virüs, Antijen, hücre
2	Enzim	Kofaktör, substrat, inhibitör,
3	Lektin	Glikoprotein, polisakkarit, hücre, hücreyüzey reseptörü
4	Hücre	Lektin, hücre yüzeyi spesifik proteini,
5	Nükleik asit	Histon, komplementer baz dizisi, Nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
6	Vitamin, Hormon	Reseptör taşıyıcı protein

1.2.1. Matriks

Afinite kromatografi tekniğinde matriks maddesi olarak; Sephadex ve Sepharose Bio-gel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bu metotta en çok kullanılan Sepharose, inci formunda dizilmiş bir agaroz jel türüdür. Agaroz jeli, biyolojik aktif olan bileşiklerin immobilizasyonu çalışma yöntemlerinde düzgün bir matriks için gerekli olan tüm özelliklere sahiptir. Sepharose kullanarak hazırlanan adsorbanlar: Düşük ve yüksek pH, deterjanlar, disosiye yapan bileşikler gibi negatif şartlara dirençlidir. Hatta organik çözücülerin, pek çok sıcaklıkların, guanidin hidroklorür, gibi parçalayıcı moleküllerin gerektiği şartlarda, kovalent halde çapraz formunda bağlanmış jel olan Sepharose-CL en uygun ortamdır. Örnek olarak; protein A-Sepharose-CL-4B Sepharose-CL ve Blue Sepharose-CL-6B adsorbanları kullanarak hazırlanmaktadır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

1.2.2. Ligand

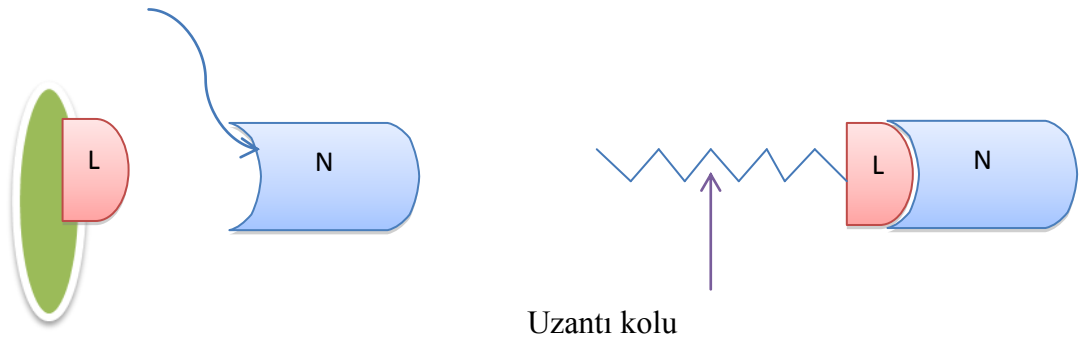
Afinite kromatografi tekniğinde seçilecek olan ligand, iki faktör tarafından etkilenmektedir. Birincisi, ligand protein saflaştırması için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama afinitesinide sıkıntı çıkmadan matriks maddesine tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır.

Bu metotta ligandın maddeye bağlama kapasitesinin serbest çözeltide 10^{-4} - 10^{-8} M arasında olması uygundur. 10^{-4} M'dan daha fazla ayrışma sabitlerini içeren etkileşmeler (bir enzim arasındaki ilişki gibi ve mesela zayıf bir inhibitör), düzgün afinite koromatografisi için uygun değildir. Ayrıca 10^{-8} M'dan daha az ayrışma sabitlerini içeren bileşiklerden (mesela bir reseptör ve hormon arasındaki ilişki gibi) oluşan afinite koromatografisinde ise, bağlı olan maddenin inaktive olmadan elüsyonu zor olacaktır (Cuatrecasas *et al.* 1968).

1.2.3. Uzantı kolu

Canlı organizma hücrelerinde enzimin aktif bölgesi normalde bileşiğin iç ortamına yerleşmiştir. Küçük ligandları (enzim kofaktörleri gibi) doğrudan matriks kısmına bağlandıktan sonra hazırlanan adsorbanlar, matriks ile ligand bağlanan moleküler arasında sterik engellemeler için az ayırma kapasitesi göstermektedirler. Ayrıca bu şartlarda uzantı kolu etkili bağlanmayı sağlamak için ligand ile matriks arasına yerleşir.

Aktif bölge



Şekil 1.2. Uzantı kolunun afinite koromatografisindeki rolü

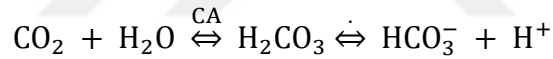
1.2.4. Ligandı bağlayacak jelin seçimi

Matriks ile ligandın kovalent bağıyla bağlanması, normal bağlanma işindeki engeli en az seviyeye azaltmak için, molekülün etkinliğini en az gösteren kısmına yapılmalıdır. Mesela azot atomları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matriks bölgesinde azot atomları

vasıtasıyla bağlanabilir; yani inhibitörün enzimle özel ve spesifik bağlanma potansiyeli korunmuş olur (Taslimi *et al.* 2017a).

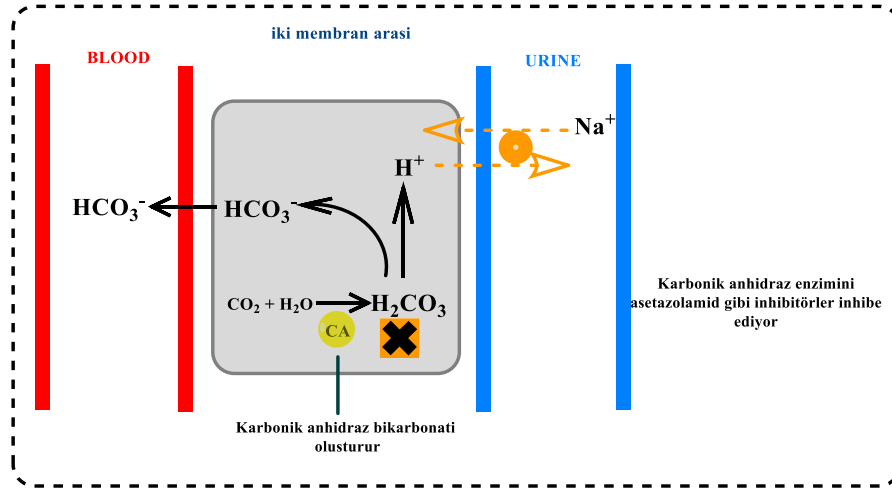
1.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (hCA; E.C.4.2.1.1) genel olarak metabolik CO₂ transportunun sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda, H⁺ ve HCO₃⁻'in birikiminde de rol almaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO₂'i H₂CO₃'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H₂CO₃'i CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır (Topal 2009; Şehitoğlu 2012).



Karbonik anhidrazın bulunduğu canlı dokuların da bilinen veya muhtemel olan fizyolojik rolleri Maren ve Carter tarafından geniş bir şekilde anlatılmıştır. Son olarak, karbonik anhidrazın CO₂, HCO₃⁻ ve H₂O arasındaki dönüşümleri gerçekleştirmesi ile birçok dokularında hayati öneme sahip olduğunu söylemek mümkündür (Aksu *et al.* 2015; Yıldırım *et al.* 2015).

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında, önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Karbonik anhidraz, CO₂ ve H₂CO₃ veya ortamın pH'sına göre HCO₃⁻ ve CO₃ iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO₂'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H₂CO₃'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır (Boztaş *et al.* 2015; Scozzafava *et al.* 2015).



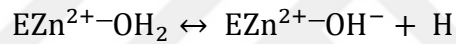
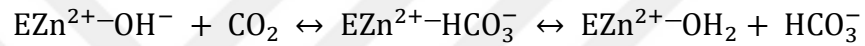
Şekil 1.3. Karbonik anhidraz enzimin inhibitörlerinin yaptığı sorun

Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, II ve III kristallendirilmiş ve bu izoenzimlerinin yapıları hakkında çok detaylı bilgiler tespit edilmiştir. Bu üç önemli izoenzim de hücrelerin sitoplazmasında çözülmüş halde bulunmaktadır. Molekül ağırlıkları ise 28 kilo dalton olup, 259 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zincirine sahiptir (Alterio *et al.* 2012). Bu enzimlerin aktif bölgesinde, yaklaşık olarak tetrahedral geometriye sahipken, üç molekül histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{2+} iyonu içermektedir. Zn^{2+} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanmamaktadır. Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede sistein taşırlar (Çoban *et al.* 2007).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin, CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki dönüşüm reaksiyonlarının katalizlemesinin yanı sıra, elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, bazı reaksiyonları da katalizlediği bilinmektedir. Bu reaksiyonlar, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidrasyonu, ayrıca piruvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizini içeren dönüşümlerdir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir.

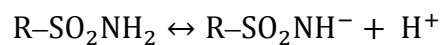
Ayrıca tavşan CA III izoenziminin ise hem asit hem de alkalin fosfataz etkisi olduğu bildirilmiştir (Taslimi *et al.* 2017a).

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde ca enziminin özellikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, metabolizma için son derece önemli olmasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere de sahiptir. Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur. İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir (Taslimi *et al.* 2017b).



Katalizdek hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA II, IV, V, VII ve IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir (Taslimi *et al.* 2017c). Enzimin CO₂'i hidrasyonu bikarbonatın dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.

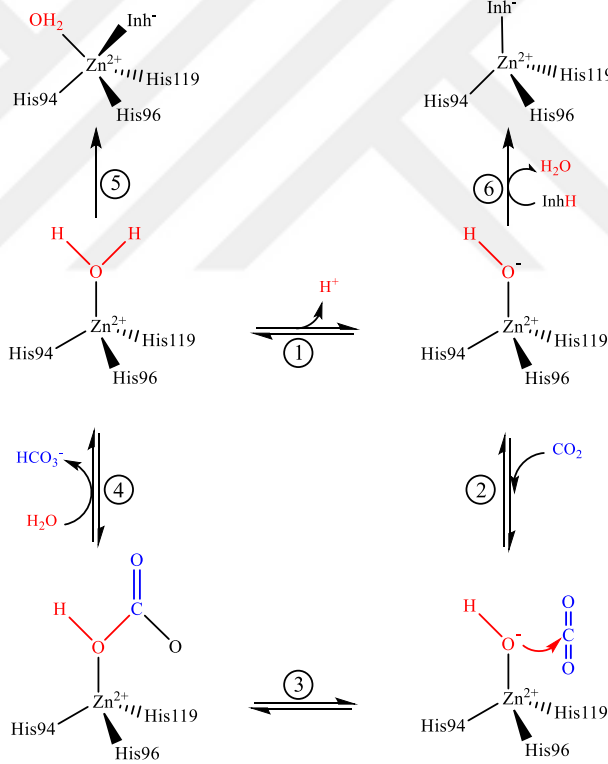
Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir. Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir (Taslimi *et al.* 2017d). Ayrıca sülfonamid ligand olarak kullanılmaktadır.



Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO₂NH₂ grubu veya bir SO₂NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir (Taslimi *et al.* 2017a). Sülfonamid grubunun azot atomu

aracılığıyla ilk olarak;

Enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde ($R-SO_2NH^-$ veya $R-SO_2N-OH^-$) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Karbonik anhidraz inhibitörlerini yapılarına ve etki mekanizmalarına göre ayırmak mümkündür. Sülfonamidlerden elde edilen bu ilaçlar sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri olarak iki sınıfta incelenir (Gülçin *et al.* 2017).

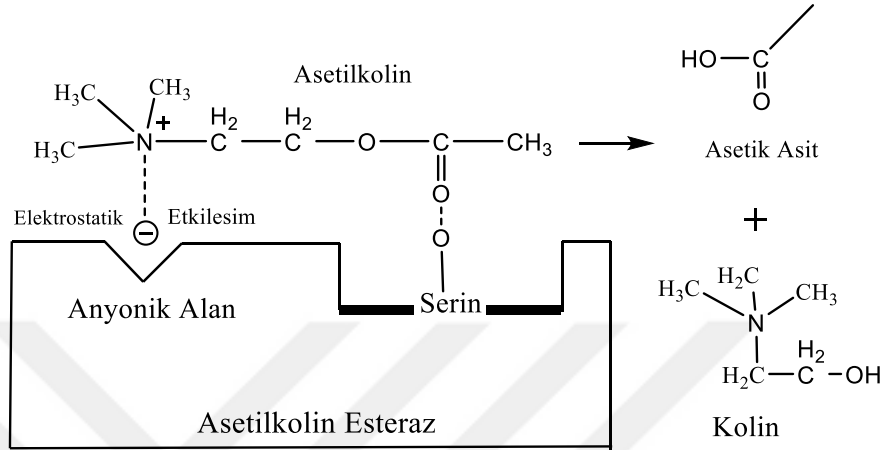


Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enzimini katalik ve inhibisyon mekanizması

1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE, E.C. 3.1.1.7)

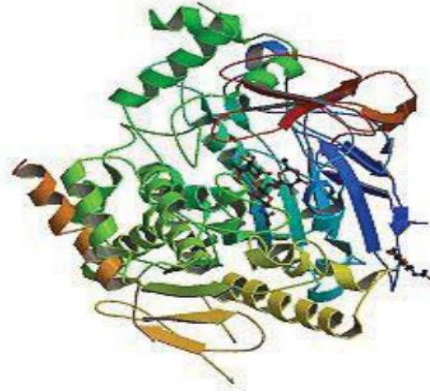
Asetilkolin esteraz enzimi (E.C. 3.1.1.7), vücutta merkezi ve periferel, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda bulunmaktadır.

Asetilkolin esteraz enzimi sinaptik boşluklardaki asetilkolini asetat ve koline parçalayarak inaktive eden enzimdir. Enzim reaksiyonu Şekil 1.4’de gösterilmektedir.



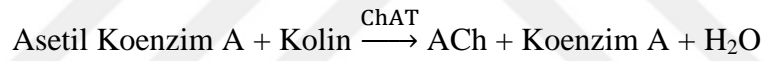
Şekil 1.5. AChE enziminin asetilkolinle etkileşimi

Eğer sinaptik ortamlardaki asetilkolin molekülü çok fazla inaktive olursa sinir iletimi bloke olur ve insanda Alzheimer hastalığı ortaya çıkar (Melanson *et al.* 1985). Şuan günlük kullanılan böcek ilaçları içerisinde karbamatlar ve organofosfatlar önemlidir. Organofosfatlı insektisitler özellikle sinir sisteminde asetilkolin ilgili enzim üzerinde tasirlerini gösterirler. Asetilkolin maddesi sinir impulslarının sinapslar ortamından geçmesini kolaylaştıran bir nörotransmitter moleküldür (Taslimi *et al.* 2017c). Bu enzim böceklerdeki merkezi sinir sisteminin kolinerjik sinapsisinde nörotransmitter olan asetilkolini hidrolizler. Asetilkolin, Asetilkolin esteraz enzimi tarafından asetik asit ve koline dönüştürülür. Karbamatlar ve organofosfatlar ACh’in analogu olarak işlerini yaparlar (benzer yapısal formüle sahiptirler ve böylece reseptör ile aynı yerlerden bağ yapabilirler). Fakat asetilkolin hidroliz olmasına rağmen, insektisitler, enzim-substrat kompleksi olarak sabit kalırlar. Bu insektisidler asetilkolinesteraz inhibisyonuyla sinir impulslarının transmiyonunu bloke eder ve asetilkolin reseptörlerinin uyuşmasına neden olurlar. Sinapsislerdeki asetilkolinin artan konsantrasyonundaki bu sonuçlar ve daha fazla uyarılmış merkezi sinir sistemi ölüme yol açabilir (Melanson *et al.* 1985).

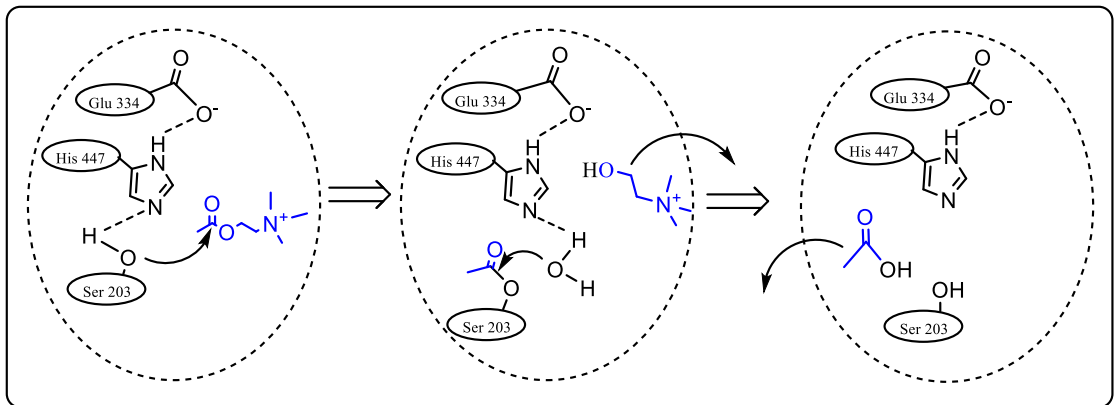


Şekil 1.6. AChE enziminin X-Ray görüntüsü (RCSB Protein Data Bank)

Asetilkolin, balıkların sinir ve nöromuskular sistemlerindeki başlıca nörotransmitterdir (Kirby *et al.* 2000). ACh'nin depolanması, yıkımı ve sentezi bütün kolinerjik nöronlarda benzerdir. Asetil koenzim A ile kolinden, kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda tek bir adımda sentezlenir.

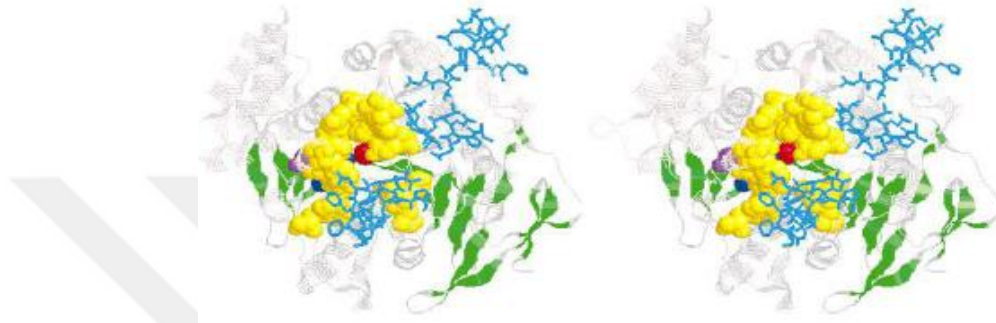


Kolinesterazlar; ACh, bütirikolin ve asetiltiyokolinyodid gibi çeşitli kolin türlerinin ayrıştırılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. AChE ve bütirikolinesteraz (BchE; E.C 3.1.1.8) en bilinen kolinesteraz enzimleridir. Bir adet AChE enzim molekülü dakikada 4×10^5 adet ACh molekülünü hidrolize eder ve 150 ms'lik turnover süresi, onu en etkin hidrolitik enzim yapar (Chang and Strichartz 2005).



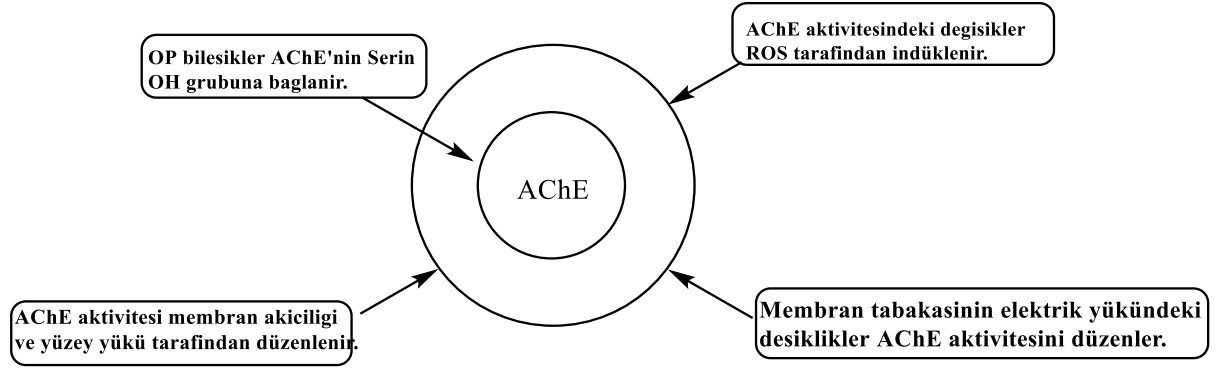
Şekil 1.7. Asetilkolinesteraz enzimin katalitik mekanizması

Kemikli balıklarda, beyinde AChE'nin birden beşe kadar farklı moleküler formları bulunur ve tüm formlar, diğer kolin analogları içerisinde sadece ACh molekülüne özeldir. AChE, ACh'nin hidrolizinde görev alan aktif bölgesinde serin hidroksil grubu içerir ve bu bölge türler arasında farklı konfigürasyonlara sahiptir (Taslimi *et al.* 2017d).



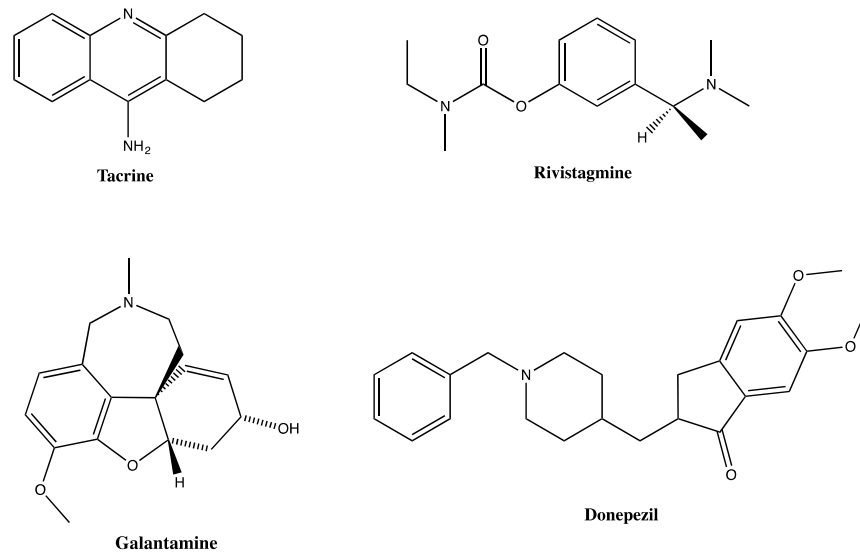
Şekil 1.8. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı (Oakeshott *et al.* 1999)

Enzimin çeşitli inhibitörlere olan afinitesini de sağlayan aktif bölgedeki farklar, aynı bileşiğin teleost türleri arasındaki toksisite farklılığına neden olmaktadır (Carr and Chambers 2001). Organofosfat bileşikler, canlılarda toksisite mekanizmalarını, ilk olarak, AChE'yi inhibisyona uğratarak indüklemektedir. İnhibisyon enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsü ile OP insektisid arasında kurulan kovalent bağ sonucunda nörotansmitterin doğal katabolizmasının engellenmesiyle gerçekleşir (Klaassen 2001; Barr and Needham 2002). İnhibisyona bağlı olarak sinapslarda aşırı ACh birikimi sonucunda, nikotinik ve muskarinik reseptörlerin aktivasyonları artar ve kolinerjik sistem sürekli uyarılır (Hazarika *et al.* 2003). AChE aktivitesindeki inhibitör etki, pestisitlerin aynı zamanda, sinir hücrelerindeki enerji metabolizması gibi önemli yaşamsal süreçleri de etkilediğini göstermektedir (Nath and Kumar 1999). Karbamatlı pestisidlerle gerçekleşen AChE inhibisyonu dönüşümlü olduğu halde; OP pestisidlerle gerçekleşen inhibisyon dönüşümsüzdür. AChE enziminin inhibisyonunun ölçülmesi, OP bileşikleriyle etkilenmenin belirlenmesinde kullanılan yararlı bir biyomarkırdır (Adams 2002).



Şekil 1.9. AChE aktivitesinin farklı mekanizmalar tarafından inhibisyonu (Bukowska and Hutnik 2006)

Genellikle; serum, barsak, cilt ve sinir uçlarında bol bulunan BChE; ACh ve bütirilkolin için aktivite gösterebilmekle beraber bütirilkolin için daha spesifiktir (Lang *et al.* 1997). BChE'nin rolü henüz tam olarak belirlenememiştir, bununla birlikte görevinin dokularda AChE tarafından temizlenemeyen ACh'i uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir ve *C. carpio*'da beyin dokusunda BChE aktivitesi bulunmamaktadır (Chuiko *et al.* 2003; Taslimi *et al.* 2017a).



Şekil 1.10. Yaygın olarak kullanılan takrin, rivastigmin, galantamin ve donepezil gibi AChE inhibitörleri

1.5. Bütirilkolinesteraz Enzimi

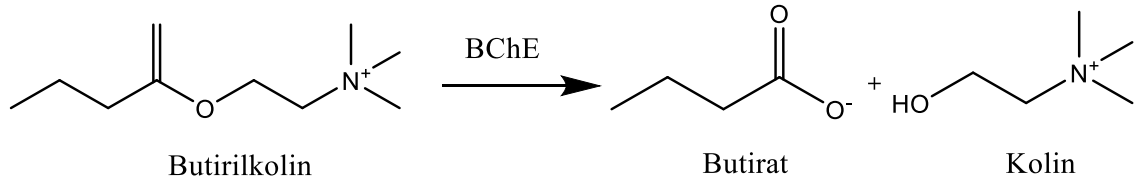
Bütirilkolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) diğerk bir kolinesteraz türüdür. BChE karaciğerde sentezlenir ve kana salınır (Chatonnet and Lockridge 1989). Ayrıca bu enzim yağ dokusu, ince barsak, akciğerk ve beyin ak maddesi gibi pekçok dokuda da bulunur (Dave *et al.* 2000). Beyinde ve plazmada çözünmüş olarak bulunur (Darvesh *et al.* 2003). Bunun yanında bazı balıklarda ve kas dokusunda da önemli boyutta BChE aktivitesi olduğu saptanmıştır (Fulton and Key 2001). BChE ise metabolizmada bütirilkolini (BCh), bütirat ve koline hidrolizleyerek katalizler.

BChE, memelilerde bilinen biyolojik substratı olmayan bir enzimdir (Kutty *et al.* 1989). Ama bütiriltiyokolin, BCh, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin ve farmakolojik açıdan önemli bir yeri olan süksinilkolin gibi kolin esterlerini hidroliz eder (Kutty and Payne 1994). BChE yaklaşık olarak 342 KDa ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir (Barta *et al.* 2001).

AChE'in asıl fizyolojik fonksiyonu sinir impulslarının iletimi sırasında kolinerjik sinapslarda aracılık eden ACh'nin yıkılmasıdır. BChE'nin rolü henüz tam olarak bilinmese de, görevinin AChE tarafından temizlenemeyen ACh'i dokulardan uzaklaştırmak olduğu düşünölmektedir. Fazla miktarda ACh, AChE'inn inhibisyonuna neden olmakta ve BChE aktivitesini arttırmaktadır. Bu nedenle dokuda ACh miktarı fazla olduğunda BChE aktivitesi ACh'nin yıkılmasında etkili olduğu görölmüştür (Chuiko *et al.* 2003).

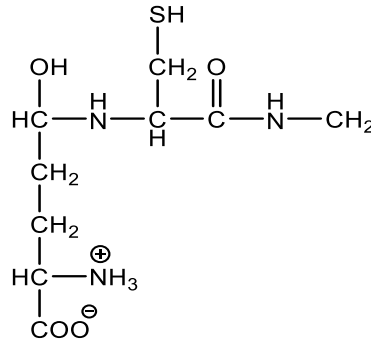
Günümüzde savaş silahlarını yapımında organofosfat veya karbamat yapısındaki sinir gazları ve insektisit gibi benzer yapılı kimyasallar tarafından meydana gelen zehirlenmelerde, BChE profilaktik madde olarak kullanılmaktadır (Ashani *et al.* 1991). Kolinesteraz inhibitörleri, sadece savaşlardaki kimyasal terör silahı değil, Alzheimer, myastenia gravis veya glokom gibi hastalıkların tedavisi için ilaç yapımında da işlev görmektedir (Giacobini 2000; Kawaguchi 2004). Ancak her iki kolinesteraza aynı inhibisyon etkisi gösteren maddelerin ilaç yapımı için kullanımı uygun değildir. AChE

ve BChE'nin benzer yapısı, özgül inhibitörlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Ama tasarlanan özgül kolinesteraz inhibitörleri ilaç yapımında çok önemli bir yere sahiptir (Bodur ve Çokuğraş 2006).



1.6. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon-s-transferazlar; GSTs (EC. 2.5.1.18) birçok farklı eksojen ve endojen bileşiğin detoksifikasyonunu sağlayan multifonksiyonel enzimlerdir ve glutasyonun (GSH) (Şekil 1.9) tiyol grubunun ikinci bir substratın elektrofilik bölgesine konjugasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Oluşan glutasyon konjugatı daha az toksiktir ve çözünebilir formda vücuttan atılırlar (Özaslan 2014).



Şekil 1.11. İndirgenmiş Glutasyon (γ-Glutamil-sisteinil-glisin)

Memeli GST'ları evrimsel sınıflandırmaya göre alfa, mu, pi, teta mikrozomal olmak üzere 5 sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflandırma substrat ve inhibitör spesifikliğı, antikor çapraz reaktifliğı ve primer yapıya göre yapılmıştır. Sitozolik GST'lar, çeşitli genler ve monomer hibridizasyonu nedeniyle hem homodimer hem de heterodimer formlarında bulunmaktadır (Hayes *et al.* 2005). Sınıfın üyeleri, benzer moleküler ağırlıklar (24-28

kDa) gösterirler. Amino asit dizisi özdeşliği %60-80 gibi yüksek derecededir. Mikrozomal GST hariç, büyük bir ihtimalle ortak bir genden evrimleşmişlerdir. Mikrozomal GST'lar, sitozolik enzimlerle açık bir dizi benzerliği göstermezler (Wilce and Parker 1994).

Sitozolik enzimler, biri diğerinden bağımsız davranan, dimer başına iki aktif bölgeye sahiptirler. Aktif bölgelerin her biri en az iki ligand bağlama bölgesi içerir. GSH bağlama bölgesi glutatyon için çok spesifiktir. Fakat elektrofilik substrat için bağlama bölgesi daha az spesifiktir. Katalitik aktivitelerine ilaveten GST ların bilirubin, hem, steroidler, tiroid hormonları ve safra asitleri gibi çeşitli non-substrat hidrofobik bileşiklerin intrasellüler taşınmasında fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Bu bağlanma genellikle enzimin katalitik aktivitesinin inhibisyonu ile sonuçlanır (Hayes *et al.* 2005).

Sitozolik GST'lar insan, fare ve sıçan dokularında bol bulunduğundan, yaygın biçimde çalışılmışlardır. İnsan karaciğerinde toplam sitozolik proteinin %5'ini GST'lar oluşturmaktadır. Farklı izoenzimler farklı doku spesifikliğine sahiptirler. Örneğin alfa sınıfı enzim, insan karaciğer ve böbreğinde en fazla bulunan izoenzimdir. Fakat pi sınıfı enzim, plasenta, eritrositler, göğüs ve prostatta daha baskındır. GST'lar, aerobik organizmalar içerisinde hemen hemen her yerde görülürler. Enzim, bitkiler, balık, böcekler, fungi, maya ve bakterilerden de saflaştırılmaktadır (Gyamfi *et al.* 2004). GST'larla bu kadar çok çalışma yapılmasının sebeplerinden biri, onların alkoller, aril halidler, laktonlar, epoksitler, kinonlar, esterler ve aktiflenmiş alkenler gibi yapısal olarak farklı substratların büyük bir kısmını katalizleme yeteneğine sahip olmalarıdır. GST'ların tanıdığı substratların sayısı fazla olmasına rağmen, substratların ortak özellikleri çoğunun hidrofilik oluşu ve elektrofilik bir merkez taşımalarıdır (Baş 2006).

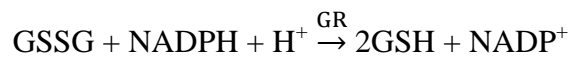
Bugüne kadar çeşitli kaynaklardan izole edilen glutatyon-stransferaz (GST) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara ilişkin bazı deneysel veriler Çizelge 1.3'de verilmiştir (Hayes *at al.* 2005).

Çizelge 1.3. Çeşitli kaynaklardan izole edilen GST enzimlerinin bazı yapısal özellikleri

Enzim	MW(kDa)	Substrat
İnsan karaciğeri Sitosol enzimi Alfa (α) Mu (μ) Pi (π)	51, 53, 53	CDNB, Trans-fenil-3-büten-2-on, Sitiren-7,8-oksit Kumen hidroperoksit
Sıçan testisi GST	52	CDNB, Etakrinik asit, 1,2-dikloro-4-nitrobenzen, Bromosülfofitalein, Trans-4-fenil-3-büten-2-on, p-nitro-benzilklorid, 1,2-epoksi-3-(p-nitrofenoksi) propan.
<i>Xanthomonas</i> <i>Campertris</i> GST	50	CDNB, Etakrinik asit, Kumen hidroperoksit, 4-nitro-quinolin-1-oksit
Şeker kamışı yaprakları GST	50	CDNB, Etakrinik asit, 3,4-Dinitroklorobenzen, 4-nitropiridin-N-oksit Bromosülfofitalein

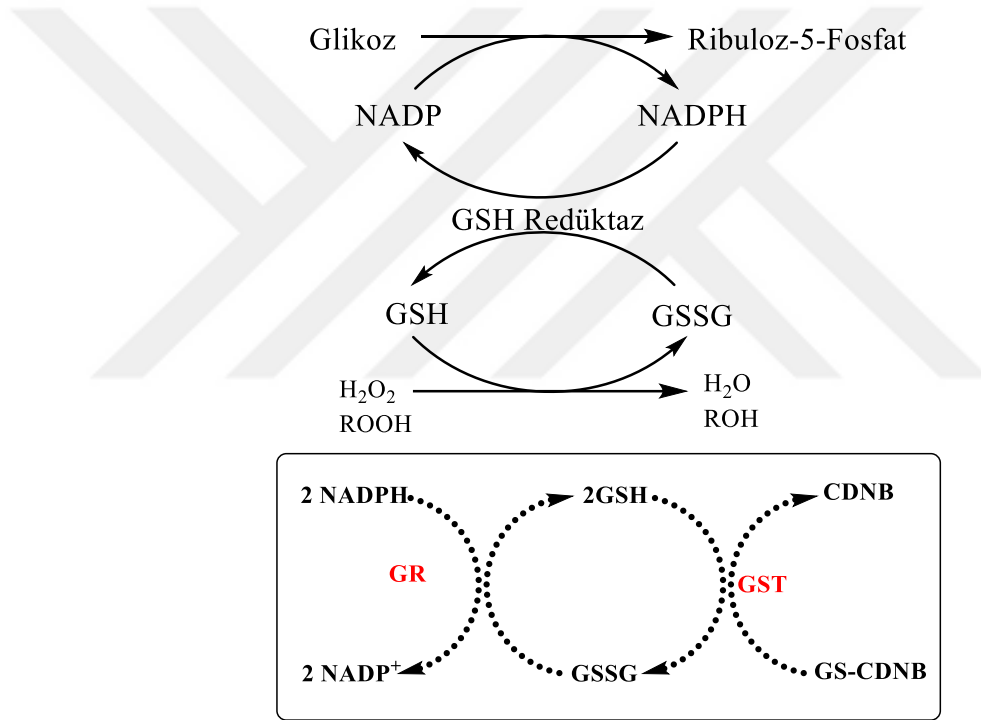
1.7. Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz (E.C.1.8.1.7) enzimi, hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesi sırasında glutatyon peroksidaz enzimi tarafından yükseltgenen glutatyonun indirgenmesi reaksiyonunu katalizler. Böylece organizmada sınırlı miktardaki glutatyon tekrar kullanıma hazır hale gelmiş olur. Fakat bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'a gereksinim duyulmaktadır. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan elde edilir (Akkuş 1995; Keha ve Küfrevioğlu 2004).



Glutatyon redüktaz enzimi daha çok sitozole lokalize olmuş dimer yapıda bir enzimdir. Her bir alt ünitesinde birer FAD bulunmaktadır. NADPH, FAD'ı indirgemekte, FAD'daki elektronlar da okside glutatyondaki (GSSG) disülfür köprüsüne aktarılmaktadır. Normal hücrelerde GSH/GSSG oranı son derece yüksektir. Glutatyon

redüktaz bu oranın yüksek kalmasını sağlamakla görevlidir. Glutasyon redüktaz aktivitesi hücrenin redoks durumu tarafından düzenlenir. Aktivitenin yüksek ya da düşük olması oksidatif stresin şiddetine bağlıdır (Özaslan 2014). Çevresel strese maruz kalma sonucunda özellikle GSH hücre içi antioksidan düzeyinde değişikliklere neden olur. GSH birçok yönden antioksidan gibi iş görebilir, ROS ile kimyasal reaksiyonlara girebilir ve bu nedenle serbest radikal toplayıcısı olarak işlev yapabilir. Aynı zamanda, lipid peroksidasyon reaksiyonları ile oluşturulan peroksitleri kaldırarak zar yapısını stabilize edebilir (Özaslan 2014).



Şekil 1.12. Glutasyon redüktaz enziminin katalitik reaksiyonları

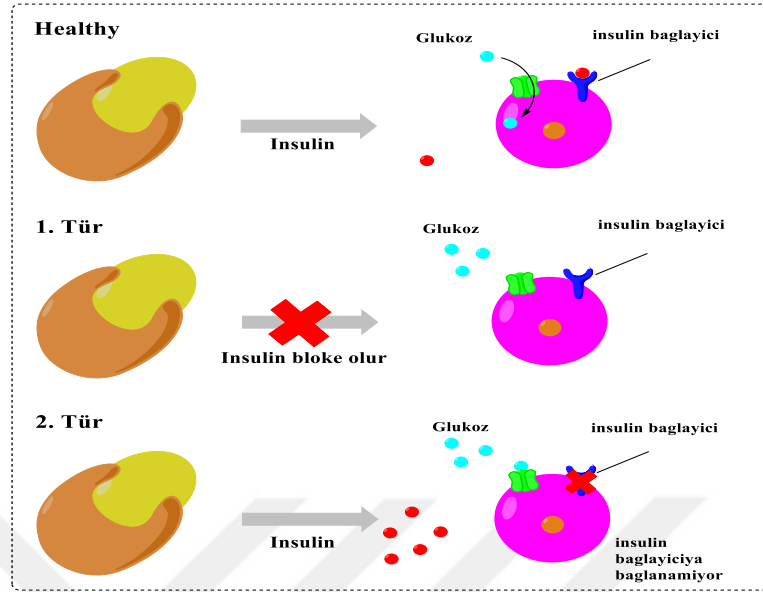
Glutasyon redüktazın katalitik bölgesinde yer alan amino asitlerin ve redoks aktif tiyol grupların indirgeyici özelliği nedeniyle birçok kimyasal, ilaç ve doğal maddelere aşırı duyarlıdır (Özaslan 2014). Yapılan araştırmalarda birçok GR inhibitörü bildirilmiştir.

- ✚ Glutasyon redüktaz üzerinde inhibitör etkisi olan bileşikler
- ✓ 4-Hidroksinonenal

- ✓ N,N-bis(2-kloroetil)-N nitrozüre (BCNU)
- ✓ 1-(2-Kloroetil)-3-(2-hidrosetil)- 1-nitrozüre
- ✓ 6-Hidroksi-3-okso-3H-ksanten-9-propiyonikasit
- ✓ 10-Arilizoalloksazin
- ✓ Flavin analogları
- ✓ Metilen mavisi
- ✓ Hidroksilamin ve türevleri
- ✓ Dinitrozil- demir-ditiyolat kompleksi
- ✓ 4-Naftokinon alkanolik asit ve türevleri
- ✓ Sisteinin isosiyanat konjugatları
- ✓ Kuersetin
- ✓ Altın-fosfol inhibitörü

1.8. α -Glikozidazlar

Diabetes Mellitus (DM) insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan, kronik hiperglisemik, bir grup metabolizma hastalığıdır. Diyabet hem diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperozmalar koma gibi akut komplikasyonlar hem de kronik makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar nedeniyle sakatlık ve ölümlere yol açabilir (Taslimi and Gülçin 2017). İnsüline bağımlı diyabet ve insüline bağımlı olmayan diyabet tanımlaması tedaviye dayalı bir sınıflamayı yansıttığı ve karışıklığa yol açtığı için kullanılmamaktadır. Yerine Tip 1 ve Tip 2 diyabet tanımları kullanılmaktadır. Tip 1 ketoasidoza eğilimli, idiyopatik ya da otoimmün kaynaklı betahücre hasarı sonucu gelişen diyabet vakalarını kapsar. Tip 2 daha yaygın olan, insülin sekresyon defekti ile insülin rezistansının birarada etkili olduğu diyabet formlarının dahil olduğu diyabet grubudur.



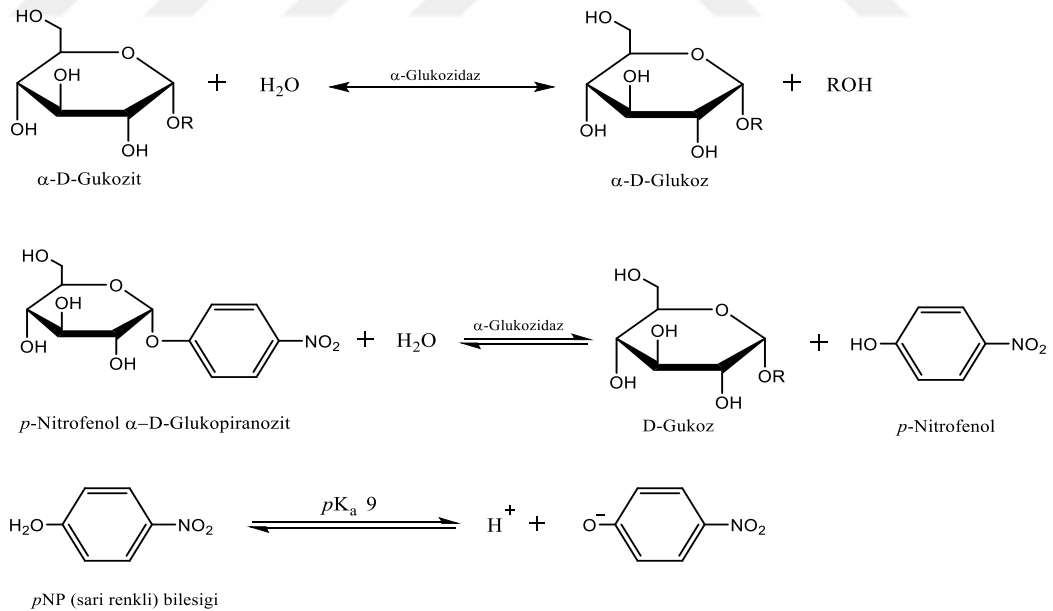
Şekil 1.13. Diyabet türleri ve insulinin etki mekanizması

α -Glukozidazlar (E.C.3.2.1.20, α -D-glukozit glukohidrolaz, ekzo- α -1,4-glukozidaz) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda karbohidrat metabolizma sırasında anahtar rol oynarlar (Taslimi and Gülçin 2017). Mikroorganizma hücrelerinde oldukça yaygın olup çeşitli maya, bakteri ve küflerden hücre içi, hücre dışı, veya hücreye bağlı şekilleri saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Mikroorganizmalar tarafından nişasta molekülün parçalanmasının son aşaması α -glukozidaz enzimler ile gerçekleştirilir (Apostolidis and Lee 2010). Amiloglukozidaz (E.C.3.2.1.3), α -amilaz (E.C.3.2.1.1), ile pullunaz (E.C.3.2.1. 41) gibi nişasta molekülüne etki eden başka glukozil hidrolaz enzimlerinin katalizi ile gerçekleşen kısa zincirli maltooligosakkaritlerdeki α -1,4-glukozidik bağları spesifik olarak parçalayıp α -D-glukoz monomerlerini oluştururlar. Dolayısıyla α -glukozidaz enzimler çoğunlukla transglukozilasyon aktivitesine sahip olup reaksiyonları ise geri dönüşümlüdür. Oligosakkarit molekülleri polisakkarit moleküllere oranla daha hızlı hidroliz ederler. Bu sebeple α -glukozidazlar, oligosakkarit ve α -Dglukozitleri de içeren düşük molekül ağırlıklı substratların terminal, redükleyici olmayan, α -1,4-glukopiranoz birimlerini ve aynı zamanda çözünür nişasta ve glukojen gibi α -glukanları da hidrolize edebilme yeteneğine sahiptirler. Glukozil hidrolazların 13. ve 31. familyalarına dahil olan α -glukozidazlar, substrat spesifikliğine, etki mekanizmasına, substrata etki şekline ve amino asit dizisinin benzerliğine göre sınıflandırılırlar (Taslimi

and Gülçin 2017).

Yapılan çalışmalarda farklı *Bacillus* türlerine ait α -glukozidaz enzimleri *E. coli*'de klonlanarak üretimi artırılmış ve protein mühendisliği yolu ile katalitik olarak daha aktif ve stabil hale getirilebilmiştir. Bu amaçlarla enzim üreticisi ekstremofilik mikroorganizmaların taranması sonucu yeni termostabil enzimlerin bulunuşuyla, gelecekte yeni endüstriyel ve biyoteknolojik uygulama alanlarının açılması mümkün olacaktır (Taslimi and Gülçin 2017).

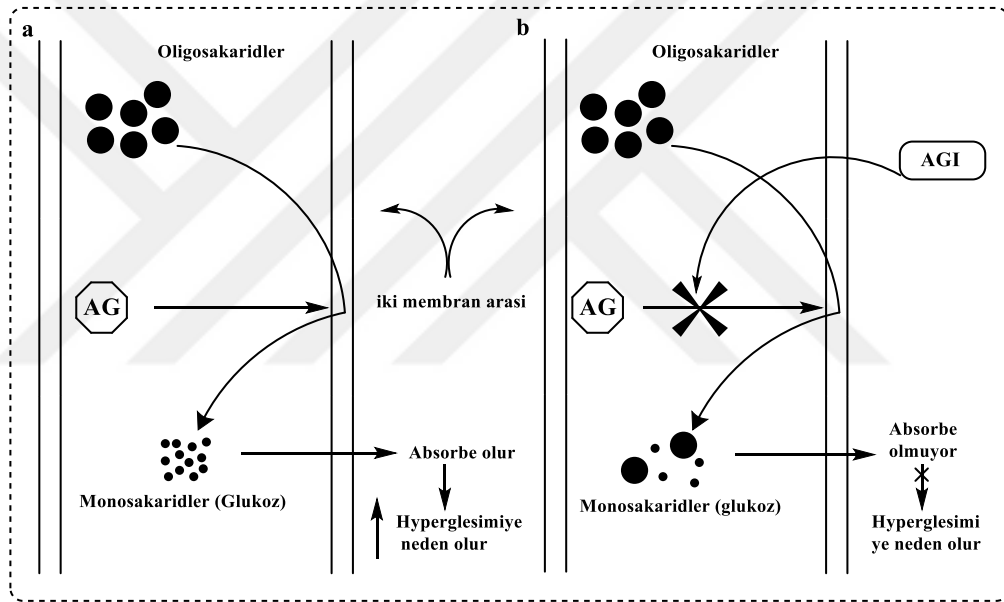
α -Glukozidazlar spesifik olarak ekzo tipi hidroliz reaksiyonu ile substratın redükleyici olmayan terminal ucundan her seferinde bir D-glukoz molekülünü serbest bırakırlar. Şekil 1.11. a, b'de de görüldüğü gibi enzim spesifik olarak α -glukozidik bağa etki edip oluşturduğu ürünün anomerik konfigürasyonu da α -D-glukoz tipindedir (Taslimi and Gülçin 2017).



Şekil 1.14. a. α -Glukozidaz enziminin substrata etki şekli, **b.** α -Glukozidaz'ın pNPG substratına etki şekli

DM'yi tedavi etmek için kullanılan terapötik yollardan biri, polisakaridemolekülleri hidrolize edebilen ve bunları monosakarite veya basit şeker birimlerine dönüştürebilen

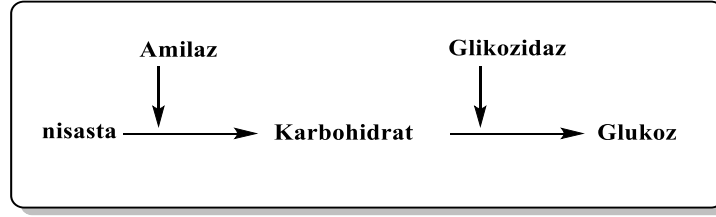
enzimlerin inhibisyonunu içerir. Bu tür bir enzim, örneğin α -glikosidaz, disakkarit moleküllerini hidrolize ederek glukozu etki eder. Öte yandan, α -amilaz enzim, nişasta gibi glu-kose polimerlerinin α -1-4-D-glikosidik greftinin hidrolizini katalize eder. Her iki enzim inhibitörü, glikoz absorpsiyon seviyesini düşürebilir ve sindirim cihazında glikoz emilimini bozarak karbonhidrat sindirim süresini uzatabilir. Bir sonuç olarak, pozisyondaki kan şekeri miktarı azaltılır. Bu amaçla, hem enzim inhibisyon testleri, bitki özleri, kimyasal maddeler ve ilaçlardan elde edilen doğal bileşikler için yaygın şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 1.15. α -Glikozidaz enziminin inhibisyon mekanizması (Taslimi and Gülçin 2017)

1.9. α -Amilazlar

α -Amilazlar nişasta bileşiminde bulunan α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çeşitli organizmalardan ve kaynaklardan elde edilebilirler. Yaşayan tüm organizmalarda bulunmakla birlikte, özgüllük, aktivite ve gereklilik, dokudan dokuya hatta türden türe bile değişkenlik gösterir. Çiğ nişasta molekülünü parçalayan amilaz enzimler insandan hayvana, mikroorganizmadan mayaya ve mantara kadar geniş çeşitlilikte organizma tarafından üretilirler (Taslimi and Gülçin 2017).



Şekil 1.16. α -Glikozidaz ve α -amilaz enzimlerin etki mekanizmaları

Bir karbonhidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Radley 1976). Bakteriyel α -amilazlar sıcaklığa fungal α -amilazlardan daha çok stabil olduğundan üzerinde en fazla çalışılan enzim kaynakları bakterilerdir; özellikle de *Bacillus* cinsine ait bakterilerin amilazlarıdır (Taslimi and Gülçin 2017).

Gıda endüstrisinde α -amilaz enzimi, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Ekşi 1988). *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen α -amilaz fırıncılıkta ve bira üretiminde kullanılmaktadır (Demain ve Solomon 1981). Ayrıca meyve suyu üretiminde de uygulama alanı bulan α amilaz enzimi, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için meyve suyunda bulanıklık meydana gelmektedir. Bu sorun, ortama α -amilaz ilave edilerek giderilmektedir (Ekşi 1988). Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler. Bu işleme haşılama adı verilir.

1.10. Serbest Radikaller

Serbest radikaller vücutta oksidatif stres sonucu oluşan endojen ve dışarıdan alınan bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerin en çok etkilendiği serbest oksijen radikalleri yapısında bulunan eşleşmemiş elektronlardan dolayı oldukça reaktif yapıda atom ve moleküllerdir (Nar 2011). Başka bir deyişle dış orbitallerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron bulunan yapılardır ama elektrik yükü olarak pozitif, negatif veya

nötr konumda olabilirler. Bu reaktif bileşiklere örnek olarak süperoksit anyonu ($-O_2^-$) veya hidroksil radikali ($-OH^\cdot$) verilebilir. Reaktif oksijen türleri (ROT) hücrelerde metabolik ürün olarak ve/veya mitokondrial solunum zincirindeki tepkimeler sonucu meydana gelirler. Pek çok fizyolojik koşulda üretilen serbest oksijen radikalleri antioksidan savunma sistemi ile nötralize edilir. Serbest oksijen radikallerinin üretimi ve antioksidan savunma bariyeri arasındaki dengenin serbest oksijen radikalleri lehine artışı vücutta hasar oluşturmaktadır (Gülçin 2012; Gülçin and Beydemir 2013).

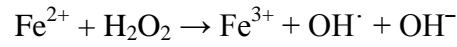
Serbest radikaller radyasyon, oksijen toksisitesi, iskemi reperfüzyon hasarları, enfeksiyonlar, enflamasyonlar, yaşlanma, kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz gibi hastalık süreçlerin yanı sıra birçok nöropsikiyatrik bozukluklarda da suçlanmışlardır (Gülçin 2012; Sehitoglu *et al.* 2015).

1.11. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (Gülçin 2012; Sehitoglu *et al.* 2015). Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara oranla daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engeller ya da geciktirirler.

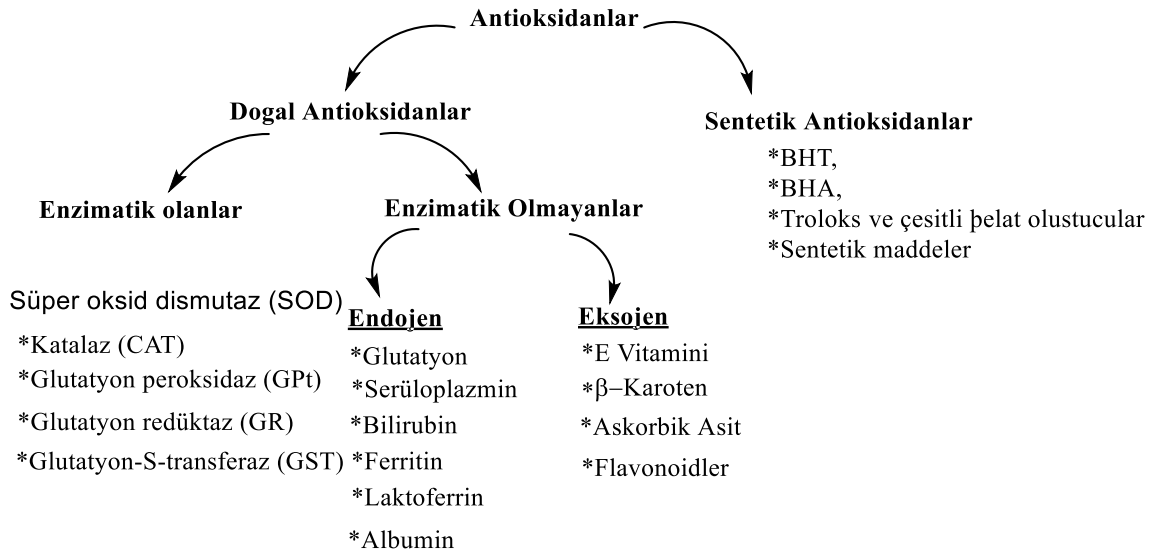
Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (Sehitoglu *et al.* 2015). Çünkü antioksidanlar, prooksidanları etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Gülçin 2012).

Radikalik reaksiyonun başlaması veya uzaması antioksidan molekül (AH) tarafından inhibe edilmektedir. Burada L[·] lipid, LO[·] alkoksil, LOO[·] ise peroksil radikallerini simgelemektedir. Bu mekanizma üzerinden etkinlik gösteren antioksidanlar 'primer antioksidanlar' olarak adlandırılırlar. Diğer yandan 'sekonder antioksidanlar' olarak adlandırılan bileşikler ise oksidasyon hızını düşürürler ve genellikle Fenton-tipi reaksiyonları inhibe etmeye çalışırlar (Sehitoglu *et al.* 2015). Fenton reaksiyonu hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olan bir reaksiyondur (Sehitoglu *et al.* 2015).



Bir antioksidanın aktivitesi şu faktörler ile belirlenir:

1. Hidrojen veya elektron donör aracı olarak gösterebildiği reaktivite (Genelde indirgeme potansiyeline bağlıdır).
2. Antioksidandan türeyen radikalın akıbeti.
3. Diğer antioksidanlarla etkileşim yeteneği.
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli (Diplock *et al.* 1998).



Şekil 1.17. Antioksidanların sınıflandırılması

1.12. Sentetik Antioksidanlar

Biyomolekülleri oksidatif hasardan koruyan ve organizmanın kendisinin sentezlediği ya da dışarıdan alınan antioksidanlara olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Birçok araştırmacı antioksidan aktivitesi yüksek ve organizmaya zararı olmayan sentetik bileşiklerin arayışı içerisinde (Gülçin 2005). Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte oksidasyonu önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (Gülçin 2005; Gülçin 2008; Gülçin *et al.* 2010; Çakmakçı *et al.* 2015). Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğala özdeş formları veya türevleri laboratuarda sentezlendiği gibi doğal yapı ile ilgisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine karşın, bunların ancak az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır (Gülçin 2005).

1.13. Doğal Antioksidanlar

İnsan diyetinde farklı türlerde antioksidan bileşikler bulunmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidan kapasitesine sahip olmalarının yanı sıra, aynı zamanda yapısal özelliklerinden dolayı ROS temizleme kapasitesinde sahip olduğu bilinmektedir (Kalkan 2007; Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2012). Diyette bulunan antioksidanların en önemli temsilcileri C vitamini, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler olduğu söylenebilir. C vitaminin dışında her bir grupta yapısal olarak farklı bir dizi bileşik bulunur (Rice and Miller 1996; Gülçin 2012). Diyet sırasında diyette bulunan farklı bileşikler arasında sinerjik etki meydana gelebilir ancak şu durumda bunların tespit ve değerlendirilmesi çok zordur. Açıkçası böyle bir diyet orkestra gibi düşünülebilir. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi diyette bulunan bileşikler tek tek bir araya gelip sinerjik etki oluşturmaktadırlar (Diplock *et al.* 1998; Gülçin 2012).

Askorbik asit (C vitamini) suda çözünen bir bileşiktir ve birçok gıda ve bitki de bulunur. Şekil 1.11'de de görüldüğü gibi C vitamini enzimatik antioksidanların rejenerasyonunda da önemli rol oynamaktadır (Göçer 2014). C vitamini tek bir elektron transfer etme

özelliğine sahip olduğundan özel bir antioksidandır. Askorbik asit, etkili bir redükleyici ajandır. Bu durumda konjuge bir sistem oluşur ve bu nedenle güçlü bir antioksidan gibi davranma kabiliyetine sahiptir (Gülçin 2012).

Doğal antioksidanlar mikroorganizmalar, mantarlar ve hayvan dokularında hemen hemen hepsinde bulunur. Fenolik bileşikler ikincil bitki metabolitlerdir ve doğal olarak, hemen hemen tüm bitkilerin içinde bitkisel kökenli gıda ürünleri de dahil olmak üzere mevcuttur. Bu bileşiklerin hem hayvanlar hemde insanların ayrılmaz bir parçası oldukları düşünülmektedir. Doğal antioksidanlar fenolik bileşiklerdir, bunların en önemli grupları tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Gülçin *et al.* 2011; Gülçin 2012).

1.14. Antioksidanların Etkisi

Bütün antioksidan yapıda olan maddelerin etki mekanizması dört şekilde olur (Gülçin 2012).

- ✚ Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutarak daha zayıf yeni moleküle çevirerek toplayıcı bir etki oluşur. Antioksidan bu tip etki gösterirler.
- ✚ Serbest radikallerin oluşturdukları zararın giderilmesi durumu da onarıcı etkidir.
- ✚ Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen vererek aktivitelerinin azalması ya da inaktif şekle dönmeleri bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoitler bu etkiye sahiptirler.
- ✚ Serbest oksijen radikallerini bağlanarak oluşan radikal zincirinin kırılması durumu da engelleyici veya zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

Antioksidan maddelerin antioksidan kapasiteleri üzerine sadece yapısal özellikleri ve girdiği reaksiyonlar değil aynı zamanda konsantrasyon, sıcaklık, ışık seviyesi, sistemin yüzey özellikleri, fiziksel durum oksidan olarak hareket eden çok sayıda mikro parçalar ve sinerjistler gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Gülçin *et al.* 2010a; 2010b).

1.15. Yaygın Olarak Kullanılan Antioksidan Metotlar

Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan antioksidan deneyleri Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal ($ABTS^{\cdot+}$) giderme, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal ($DPPH^{\cdot}$) giderme, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal ($DMPD^{\cdot+}$) giderme aktiviteleri, ferrozin ve bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktiviteleri ve ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivitesi olarak örneklendirilebilir.

1.16. Fenolik Bileşikler

Bütün bitkiler metabolizma işlemlerinde, sekonder metabolit olarak çok sayıda fenolik bileşik oluşturmaktadırlar. Bu sebeple, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı miktarda, nitelikte ve çeşitli fenolik moleküller bulunmaktadır. Bir veya daha çok miktarda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkası içeren bileşikler grubuna polifenoller veya fenolik bileşikler denir. En az bir aromatik halka grubu ve bu halkada çok sayıda hidroksil substitüenti bulunduran moleküllerin tümüne fenolik moleküller denir (Kahkönen *et al.* 1999; Ergün *et al.* 2002; Cemeroğlu 2004).

Gıda katkı bileşiklerin bir kısmını oluşturan renk bileşikleri günümüzde özel ve ayrı bir önem vermektedir. Bilindiği gibi çağdaş tüketici, gıdanın iç kısmında yer alan her bir öğeyi bilmek ve onun tüketici açısından en üstün kabul edilebilirlik düzeyinde olması konusunda titizlik göstermek çabası içindedir (Moure *et al.* 2001). Ham maddede son ürün elde edilinceye kadar değişik aşamalarda kullanılabilen renk maddelerinin tüketici açısından kabul edilebilirliğinin olması gerekmektedir. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler; bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır (Nizamlioğlu ve Nas 2010).

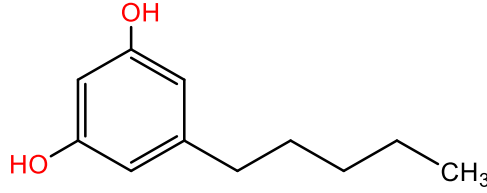
Gıda bileşeni olarak fenolik moleküller; insan sağlığı açısından işlevleri, koku ve tat oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antioksidatif ve antimikrobiyal etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar (Gülçin 2007). Fenolik bileşikler proteinlerle kompleks oluşturarak tortu yaparlar. Fenolik bileşiklerin bu özelliklerinden meyve suyu endüstrisinde meyve suyunun durultulması sırasında yararlanılmaktadır. Bitkilerdeki fenolik bileşikler; fenolik asitler (veya fenolkarbonik asitler), flavonoidler ile küçük molekülü ve çoğunlukla uçucu olan bileşiklerdir. Bunlardan, gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır (Tüzün 1996). Fenolik bileşikler gıdalarda istenilmeyen renk değişimlerine neden olurlar. Bunlar arasında en önemlisi enzimatik esmerleşmelerdir. Fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olan bu reaksiyonları katalize eden enzimlere genel olarak polifenoloksidaz enzimleri (PPO) adı verilmektedir. Gıdalarda enzimatik esmerleşme, genellikle kalite kaybı olarak değerlendirilmekte ve bu nedenle meyve ve sebzelerin işlenmeleri sırasında fenolik maddelerin oksidasyonları çeşitli yöntemlerle önlenmeye çalışılmaktadır (Carlo 1999; Sağıroğlu ve Özcan 2007).

1.17. Olivetol

Olivetol (5-n-Amilresorsinol) liken asidini, ilk kez olivetonik asidi parçalayarak gözlemledi. Olivetol bileşiği, karabuğday ve zeytinyağı ve diğer tahılların kepek fraksiyonlarında görülebilen bir resorsinoik fenoldür (Roberth *et al.* 1985). Olivetol, kanabinoidlerin n-pentil resorsinol sektörünün deneysel bir modeli olarak tanımlanır. Bir poliketit sintazı, üç molekül malonil-CoA ve bir molekül n-heksanoil-KoA'yı olivetole dönüştürür. 5-pentil-1,3-benzendiol veya 5-pentilresorsinol olarak bilinen Olivetol, farklı liken türlerinde bulunan organik bir bileşiktir (Raharjo *et al.* 2004).

Olivetol, tetrahidrokanabinolün farklı sentezlerinde ön moleküldür. 5-Pentilresorsinol feromon, antiseptik veya itici olarak kullanılan bir çeşit böcek tarafından üretilir. Bu bileşik, THC'nin sentetik bir formu oluşturabilen yoğunlaştırma reaksiyonlarının çeşitli tekniklerinde yararlı bir parça olarak kaydedilmiştir. Olivetol moleküler imprint polimer

sentezinde bir model bileşimi olarak kullanılmıştır. Aslında, moleküler imprint polimer, kalıp molekülü olarak olivetol, çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat, monomer olarak metil akrilik asit, çözücüler olarak dodekanol ve toluen kullanılarak dökme polimerizasyon ile sentezlenmiştir (Raharjo *et al.* 2004).



Şekil 1.18. Olivetol'un yapısı

1.18. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Fenolik moleküller bitkiler gurubunda yaygın ikincil metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturup, hidroksil gruplarının pozisyonuna ve sayısına göre farklı gruplara ayrılırlar. Antioksidan bileşikler, otookside olabilir materyallerin oksidasyon başlangıcını geciktiren veya oksidasyon hızını azaltan bileşiklerdir (Gülçin 2005). Gerek sentetik ve gerekse doğal yüzlerce molekülün antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde endüstriyel işlemlerinde gıda maddelerinin depolanma stabilitelelerini fazla etmek için çoğunlukla PG, BHA, BHT gibi sentetik antioksidan bileşikler kullanılmaktadır (Gülçin *et al.* 2006). Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel toksisiteleri sebebiyle, son zamanlarda bilim insanlarının ilgisi doğal antioksidan bileşikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Zira doğal antioksidan bileşikler, insanların yüzlerce yıldır tükettikleri veya gıdalara karıştırdıkları katkılardır. Bu sebeple tüketiciler tarafından güvenilir olarak görülmektedirler.

Bu çalışmada, susamdan elde edilen ve fenolik bir bileşik olan olivetolunun antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında Olivetolun, canlılarda önemli bir enzim olan ve CO₂'in hidratasyon

ve dehidratasyon reaksiyonunu katalizleyen CA enzim ailesinin CA I ve CA II izoenzimleri, sinir iletiminde görev alan AChE ve BChE enzimleri ve toksik maddelerin vücuttan atılmasını sağlayan glutatyon s-transferaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve sonuçlar standart inhibitörler ile mukayese edilmiştir.

Ayrıca çalışmada kullanılan olivetolun diğer antioksidanlarla mukayese edilip iyi bir antioksidan özelliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen bu veriler fenolik bileşimin farmakolojik uygulamalarda etkili bir şekilde kullanılabileceği göstermektedir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile alınabilirler. Antioksidanlar hücre yıkımını azaltarak hücrelerin tümör oluşturma eğilimlerini ortadan kaldırırlar böylece yaşam kalitesini artırırılar. Doğal antioksidan kaynakları; baharatlar, şifalı bitkiler, çaylar, yağlar, tohumlar, tahıllar, hububatlar, meyveler, sebzeler, enzimler, proteinler olarak sayılabilmektedir. Doğal antioksidanlara olan ilginin giderek önem kazanması bitkisel antioksidanlara yönelimi de arttırmıştır (Gülçin 2012).

Metabolizmada fizyolojik olaylar esnasında sürekli olarak üretilen ROS; nükleik asitler, lipitler, karbohidratlar, proteinler ve doymamış yağ asitleri başta olmak üzere önemli biyomoleküllere zarar verir. Bu zararlara bağlı olarak ROS'nin çok fazla sayıda hastalığa neden olduğu saptanmıştır (Gülçin 2010). Koruyucu ajanlar olarak adlandırılan antioksidanlar, ROS kaynaklı oksidatif hasarı azaltırlar ve birçok kronik hastalığın ilerlemesine engel olurlar (Gülçin 2008; Gülçin 2012).

Farklı kaynaklardan saflaştırılan maddelerin veya saf maddelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. *Perilla pankinensis* bitkisinden total olarak saflaştırılan antosiyaninler (Gülçin *et al.* 2005b), sarmaşık bitkisinden α -hederin, hederasaponin-C, hederakolşizit-E ve -F saponinleri (Gülçin *et al.* 2004d), *Chionanthus virginicus* bitkisinden oleoropin ve ligustrozit gibi sekoiridoidler saflaştırılmış (Gülçin *et al.* 2009) ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. *Vinca herbacea* bitkisinden ise majdin ve izomajdin maddeleri saflaştırılmış ve antioksidan özellikleri incelenmiştir (Gülçin *et al.* 2012b). Serotonin (Gülçin 2008), rezveratrol (Gülçin 2010), eugenol (Gülçin 2011), kafeik asit fenetil esteri (Göçer and Gülçin 2011), *Pistacia terebinthus* (Göçer 2013), gibi maddelerin de son zamanlarda antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile mukayeseleri yapılmış ve muhtemel mekanizmalar ileri sürülmüştür.

Ayrıca kivi (Dawes and Keene 1999), nane (Elmastas *et al.* 2005), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), çilek (Abuja *et al.* 1998), lavanta (Gülçin *et al.* 2004d), karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), kiraz (Wang *et al.* 1999), kiraz sapı (*Cerasus avium* L.) (Bursal *et al.* 2013), ışgın (Oktay *et al.* 2007), brokoli (Gülçin *et al.* 2004e), kıvılcık (Gülçin *et al.* 2005c), defne (Elmastas *et al.* 2006a), mantar (Elmastas *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a), madımak (*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2003), evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısırgan (Gülçin *et al.* 2004b), su mercimeği (Gülçin *et al.* 2009b), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) (Şerbetçi and Gülçin *et al.* 2010), melisa yaprakları (*Melissa officinalis*) (Köksal *et al.* 2011), ökse otu (Uçar *et al.* 2006), oğulotu (Köksal *et al.* 2011), tarçın (Chua *et al.* 2007) ve kuru erik (Donavan 1998), muşmula (*Mespilus germanica*) (Gülçin *et al.* 2011-175), ahududu (*Rubus idaeus*) (Gülçin *et al.* 2011-C593), çöven (*Gypsophila bitlisensis*) (Işık *et al.* 2015), kivi (*Actinidia deliciosa*) (Bursal and Gülçin, 2011) ve turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) (Kalın *et al.* 2015), mersinin (*Myrtus communis*) (Annakkaya 2012), altın çilek (*Physalis peruviana*) ve keten (*Linum usitatissimum*) (Han 2012) gibi birçok meyve ve sebze ile zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) ve karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012a) gibi bitkisel yağların (Gülçin *et al.* 2010b) gibi farklı kaynaklarda antioksidan aktivite araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998) ve meyve sularında (Wen *et al.* 1999) da yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir. Ayrıca patates (Friedman 1997), soğan (Ewald *et al.* 1999), fasulye (Ewald *et al.* 1999) ve ıspanak (Gil *et al.* 1999) gibi çeşitli sebzelerin de antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

İnsan glutatyon redüktaz enzimi 478 amino asitten oluşmuştur. İnsan GR enziminin, birbirinden ayrılması çok zor olan, mitokondrial ve sitoplazmik iki formu vardır. Bu iki izoenzim çekirdekte tek genden kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda insan ve fare genlerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir. Hem insan hem de fare glutatyon redüktaz geninde 13 tane ekzon bölgesi olduğu belirlenmiş 3' ve 5' uçlarında ufak birkaç bölge hariç genin tamamının yapısı belirlenmiştir (George and Franke 1976; Tutic *et al.* 1990; Tamura *et al.* 1996; Becker *et al.* 1998; Kelner and Montoya 2000).

Glutasyon redüktaz enzimi ile ilgili çalışmalar 1935 yılında Meldrum ve Tarr tarafından kanda GSSG'nin indirgenmesinin ve NADPH'nın bu sistemde kofaktör olduğunun deneysel olarak saptanması ile başlamıştır (Meldrum and Tarr 1935). GR enzimi ilk defa 1951'de tanımlanmıştır. GR ilk olarak 1955 yılında Asnis tarafından *Escherichia coli*'den saflaştırılmıştır (Asnis 1955). Glutasyon redüktaz enzimi insan eritrositi, domuz eritrositi, sığır eritrositi, sıçan karaciğeri, sığır karaciğeri, koyun beyini, koyun karaciğeri gibi memeli kaynaklardan, mantar, siyanobakteri gibi mikroorganizmalardan ve buğday, mısır, bezelye ve ıspanak gibi bitkisel kaynaklardan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Carlberg and Mannervik 1975; Worthington 1975; Boggaram *et al.* 1979; Carlberg and Mannervik 1981; Acan and Tezcan 1989; McCallum and Barrett 1995; Jiang *et al.* 1995; Mullineaux *et al.* 1996; Patel *et al.* 1998; Lamotte *et al.* 2000; Erat *et al.* 2003; Ulusu 2005).

GR enzimini saflaştırılması için bir çok kromatografi tekniği kullanılmıştır. Kullanılan kromatografik teknikler başta afinite olmak üzere iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisidir (Brodelius *et al.* 1974; Mannervik *et al.* 1976).

Eritrositlerde bulunan GR enziminin aktivitesindeki düşüş ve yükselişlerin birçok klinik bozuklukla ilgili olduğu tesbit edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda FAD'nin aktive ettiği, ATP'nin inhibe ettiği, ADP ve AMP'nin ise ATP'ye oranla daha az inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun sebebinin adenin nükleotidinin glutasyon redüktazın yapısında bulunan FAD'ye bağlanması olduğu düşünülmüştür (Beütler 1969).

GR enzimi ilk olarak saflaştırıldığı 1955 yılından günümüze kadar pek çok mikroorganizma, bitki ve hayvan dokusundan saflaştırılmış, yapısal ve karakterizasyon özellikleri belirlenmiştir. İnsan eritrositlerden (Worthington and Rosemeyer 1976; Erat 2004; Erat ve Çiftçi 2006; Şentürk *et al.* 2008; Akkemik *et al.* 2011), dana karaciğerinden (Carlberg and Mannervik 1981), buzağı karaciğerinden (Le Trang *et al.* 1983), sığır böbrek korteksinden (Ereser 2010), sığır eritrositinden (Erat *et al.* 2003), sığır karaciğerinden (Ulus and Tandoğan 2007), hindi karaciğerinden (Taşer and Çiftçi

2012), koyun beyninden (Açan and Tezcan 1989), domuz eritrositlerinden (Boggaram *et al.* 1979), sıçan böbreğinden (Can 2010), sıçan karaciğerinden (Carlberg and Mannervik 1975; Adem ve Çiftçi 2012), tavuk karaciğerinden (Erat *et al.* 2005), birçok mikroorganizmadan (Asnis 1955; Seerrano and Rivas 1984; Jiang *et al.* 1995; Arias *et al.* 2010; Yadav *et al.* 2013), çok sayıda bitkiden (Bielawski and Joy 1986; Halliwell and Gutteridge 1986; Mahan and Burke 1987; Lamotte *et al.* 2000; Jen Chen *et al.* 2009) saflaştırılarak özellikleri incelenmiştir.

İnsan eritrosit GR enzimi üzerinde bazı antibiyotik ilaçların etkisi incelenmiştir. Bunlardan bazıları streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin, ampisilin, metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum'dur. Yapılan invitro çalışmalarda streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin ve ampisilin ilaçlarının insan GR enzimini az veya çok aktive ettiği belirlenmiştir. Metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum ilaçlarının da az veya çok inhibe ettiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan sefotaksim ve sefodizimin K_i ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Sefotaksim için IC_{50} 12,179 mM ve K_i 6,5123±4,1139 mM, sefodizim için IC_{50} 1,682 mM ve K_i 0,7446±0,2216 mM olarak belirlenmiştir (Erat 2002; Erat *et al.* 2005).

Altun (2010), inci Kefalinin (*Chalcalburnus tarichi*, P-1811) karaciğer ve eritrositlerinden GR enzimini, 2',5'-ADP-Sepharose-4B afinite kromatografisi metodunu kullanarak saflaştırmış ve enzimin karakterizasyonunu belirlemiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimlerinin saflaştırılması sırasıyla 4552 ve 7619 kat olarak gerçekleştirmiştir. Karaciğer ve eritrosit GR enzimleri için optimum sıcaklık, pH ve iyonik şiddet etkisini tespit etmiştir. SDS-PAGE ile enzimlerin alt birimlerinin molekül ağırlıklarını 55 kDa olarak hesaplamıştır. Ayrıca İnci Kefalinin, karaciğer ve eritrosit GR enzim aktiviteleri için amikasin, sefazolin, ivermektin ve kanamisin ilaçlarının etkilerini incelemiştir. Yarışmasız inhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için K_i sabitleri ve IC_{50} değerlerini hesaplamıştır.

GST izoenzimleri ilk olarak sıçan karaciğerinde tanımlanmış ve farklı substrat spesifliklerine göre sınıflandırılması yapılmıştır. GST'ler epoksit transferaz, aril transferaz, alkil transferaz, alken transferaz ve aralkil transferaz şeklinde beş grup altında sınıflandırmışlardır (Boyland and Chasseaud 1969).

İnsan cenin karaciğerinden yapılan bir çalışmada GST'nin asidik bir formu afinite kromatografisiyle ve kromatofocuslama ile saflaştırılmıştır. Bu asidik GST homodimerdir ve alt birimini molekül ağırlığı 23 kDa olarak bulunmuştur. mRNA ve protein seviyesinde incelendiğinde GST asidik formunun ekspresyon seviyesinin yetişkin insan ve cenin karaciğerinde farklı olduğu görülmüştür (Kashiwada *et al.* 1991). Glutasyon S-Transferaz enzimi Van Gölü Balığı karaciğerinden %37 verimle 316 kat saflaştırılmış ve alt birimlerinin molekül ağırlığı 28 kDa olarak bulunmuştur (Özaslan 2014). Karayemiş meyvesi (*Prunus laurocerasus*) ile yapılan çalışmada GST enzimi %33 verimle 24 kat saflaştırılmıştır (Türkan 2015).

Glutasyon S-transferaz enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni non-spesifik hidrofobik substrat bağlanma bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoenzimin bulunmasıdır. Böylece GST karsinogenik bileşikleri, çevresel kirleticileri, ilaçları ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. GST, her biri, elektrofilik substrat için ve GSH için birer bağlanma bölgesi taşıyan iki protein alt birimine sahiptir (Cnubben *et al.* 2001).

Glutasyon S-transferaz enzimi daha çok hücrelerin sitozol kısmında bulunmaktadır. Ancak, son zamanlarda yapılan araştırmalarda, karaciğer hücrelerinin mikrozomal kısmında da glutasyon S-transferaz aktivitesine rastlanmıştır. Bu kısımdaki enzim mikrozomal membrana sıkı bir şekilde bağlı ve sitozolik formundan farklı özelliklere sahiptir (Boyer *et al.* 1985; Morgenstern *et al.* 1988).

Sığır eritrositlerinden GST enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiş ve bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada GST enziminin %97 verimle 6800 kat saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise optimum sıcaklık

20°C, optimum pH:7, optimum iyonik şiddet 0,1 M, stabil pH: 6,5, CDNB için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,186 mM, 116 EU/mL; GSH için 0,423 mM, 192 EU/mL olarak bulunmuştur. Enzimin molekül kütlesi ise 27 kDa olarak belirlenmiştir (Güvercin 2008).

İnsan kan serumdan izole edilen GST enzim aktivitesi üzerine Cd^{+2} , Hg^{+2} ve Ni^{+2} metal iyonlarının etkilerini incelemek için yapılan bir çalışmada, bu metal iyonlarının GST enzimini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Türkanoglu 2007).

Carillo *et al.* (1995) hormonların GST enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sıçana insülin uygulaması sonucu karaciğer sitozolik GST aktivitesinde 30 dakika gibi kısa bir sürede %56 artışa, mikrozomal GST aktivitesinde ise herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Glukagon hormonu enjeksiyonu, karaciğer sitozolik GST aktivitesinde %43 azalmaya sebep olurken, mikrozomal GST'yi etkilememiştir.

İnsan kan serumdan GST saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Yapılan çalışmada GST enziminin optimum iyonik şiddeti 2 mM potasyum fosfat tamponu, optimum pH sı 5,5, optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca aktivite ölçümünde kullanılan substratları CDNB ve GSH için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,8 mM ve 0,43 nmol/min.mg; 4,11 mM ve 0,23 nmol/min.mg protein olarak belirlenmiştir (Türkanoglu 2007).

CA enziminin saflaştırılması genelde hayvan dokularından yapılmıştır. Son yıllarda bitkilerde de CA saflaştırılması yapılmıştır. (Atkins *et al.* 1972). CA sığır eritrositlerinden saflaştırması ise 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonraları Keilin and Martin (1944) hCA aktivitesi ile çinko içeriği arasında bağlantı olduğunu belirterek çinkonun katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Bu şekilde hCA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçti. Daha sonra hCA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda tespit edilmeye başlandı

(Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006). Enzim göz, ciğer ve merkezi sinir sistemi gibi çoğu dokuda da dağılmıştır (Beydemir and Gülçin 2004). Enzimin bitkilerdeki molekül kütlesi 160-260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu ve memelilerde ise molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Beydemir *et al.* 2002).

CA-II hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan karbonik anhidraz gen familyasında en fazla dağılmış izoenzimdir (Tashian 1992). Ayrıca bu enzim birçok sindirim sistemi organında eksprese olmuştur (Lönnerholm *et al.* 1985; Parkkila and Parkkila 1996). Yine mide de mide öz suyunun asitliğini düzenlediği gastrik mukozanın çepere ait ve yüzey epitel hücrelerinde de eksprese olmuştur (Parkkila and Parkkila 1996).

Asetilkolin gibi transmitter miktarında ise azalma ya da artmalar çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin asetilkolin'nin çok fazla hirolizlenmesiyle Alzyemer hastalığı meydana gelmekte ve bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan ilaçlar aranmakta ve çalışılmaktadır. Bu ilaçların ancak çok büyük yan etkileri olduğu için doğal kaynaklı inhibitörler daha dikkat çekmektedir. AChE inhibitörleri olarak karbamat türevleri ve organo fosforlu bileşikler üzerinde durulmuştur. Özellikle balıklar üzerinde karbamat türevi ilaçlar ya da organo fosforlu ilaçlar inhibitör inhisyon özellikleri açısından çalışılmıştır. Fernandez ve grubu Anguilla. anguilla'da (Fernandez *et al.* 2002), beyin, solungaç ve kas dokusunda, Ferrari ve grubu Carassius auratus'un (Ferrari *et al.* 2004) beyin dokusunda karbamat türevlerinin ve organofosforlu bileşiklerin etkisini araştırmış ve total AChE aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. Carassius auratus'nın beyin dokusunda organofosforlu bileşiklerin AChE'yi yüksek miktarda inhibe ettiği bulunmuştur (Ferrari *et al.* 2004). Diğer benzer bir çalışmada Dembele ve arkadaşları ise Organofosforlu chlorfenvinphos ve karbamat carbofuran etkisinde Cyprinus carpio'nun beyin dokusunda çalışmış ve AChE'nin inhibe olduğunu bulmuşlardır. Carbofuranın etkisinden sonra aktivite geri kazanımının yakın zamanda olduğu, fakat chlorfenvinphos etkisinden sonra aktivitenin tamamen geri kazanımı için zaman gerektirdiği ayrıca belirtilmiştir (Dembele *et al.* 1999).

AChE inhibitörleri olarak karbamat türevleri ve organo fosforlu bileşikler üzerinde durulmuştur. Özellikle balıklar üzerinde karbamat türevi ilaçlar ya da organo fosforlu ilaçlar inhibitör inhisyon özellikleri açısından çalışılmıştır. Beyin, solungaç ve kas dokusunda karbamat türevlerinin ve organofosforlu bileşiklerin etkisi araştırılmış ve total AChE aktivitesinin azaldığını bulunmuştur (Fernandez *et al.* 2002; Ferrari *et al.* 2004). Diğer benzer bir çalışmada ise Organofosforlu chlorfenvinphos ve karbamat carbofuran etkisinde *Cyprinus carpio*'nın beyin dokusunda çalışmış ve AChE'nin inhibe olduğunu bulunmuştur. Carbofuranın etkisinden sonra aktivite geri kazanımının yakın zamanda olduğu, fakat chlorfenvinphos etkisinden sonra aktivitenin tamamen geri kazanımı için zaman gerektirdiği ayrıca belirtilmiştir (Dembele *et al.* 1999).

Abramis ballerus ve *Rutilus rutilus*'da AChE ve BChE'in duyarlılığı kıyaslanmış, BChE enziminin Organo fosforlu ve karbamat türevi bileşiklere karşı AChE enziminden çok daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Chuiko 2000). Organofosfat pestisid malathion ve anilofosun uygulandığı sığanlardaki eritrosit, kan ve plazma AChE ve BChE ile beyin AChE aktivitelerinin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında çok daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Hazarika *et al.* 2003).

BChE karaciğerde sentezlenir ve kana salınır (Chatonnet and Lockridge 1989). Ayrıca bu enzim yağ dokusu, incebağırsak, akciğer ve beyin ak maddesi gibi pekçok dokuda bulunur (Dave *et al.* 2000). Plazma ve beyinde çözülmüş olarak bulunur (Darvesh *et al.* 2003). Bunun yanında bazı balıklarda ve kas dokusunda önemli boyutta BChE aktivitesi olduğu görülmüştür (Fulton and Key 2001). Bütirilkolinesteraz, memelilerde bilinen biyolojik substratı olmayan bir enzimdir (Kutty *et al.* 1989). Ama bütiriltiyokolin, bütirilkolin, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin ve farmakolojik açıdan önemli bir yeri olan süksinilkolin gibi kolin esterleri hidroliz eder (Kutty and Payne 1994). BChE yaklaşık olarak 342 KDa ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir (Barta *et al.* 2001).

Tükürüğün organik bir komponenti olan α -Amilaz enzimi nişasta ve glikojenin α -1,4 bağlarını hidrolize ederek glukoz ve maltoz açığa çıkmasını sağlar. Amilaz pH 6'da etkilidir ve fazla asidite olduğu durumlarda bu enzim tahrip olur. İnsan tükürüğünde

bulunan total proteinin (300 mg/mL) büyük kısmını oluşturan amilazın aktivitesinin tükürüğün akış hızı ile orantılı olarak arttığı veya azaldığı bildirilmiştir (Fisher *et al.* 2006).



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışma için kullanılan Sepharose-4B, Sephadex G-150, α -glukozidaz enzimi, α -amilaz enzimi, nişasta, 4-nitrofenil α -D-glukopiranozid (*p*-NPG), *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve L-tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, diyaliz torbaları, β -nikotinamid adenindinükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH), β -nikotinamid adenindinükleotidfosfat (okside form) (NADP⁺), trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, indirgenmiş glutatyon (GSH), brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, G-250, coomassie brilliant blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı laboratuardan sağlanmıştır. 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, 3-(2-piridil)- 5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin), α -tokoferol, asetilkolin esterase enzimi, asetilkolin tiyoyodür, bütirilkolinesteraz, bütirilkolin iyodat, 5,5'Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı.

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
pH metre	Thermo
Otomatik pipetler	Eppendorf ve Socorex
Vorteks	Fisons, Whirlimixer

Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Hassas terazi	Denver Instrument
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet
Magnetik karıştırıcı	Jeio Tech

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çalışma sırasında kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde olduğu gibi hazırlanmıştır.

a. İnsan Kanından Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin Saflaştırılması Ve Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon (0,2 M NaHCO₃ (pH:8,8)):** 8,4 g NaHCO₃, 400 mL destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim saf su ile 500 mL tamamlandı.
- CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon (0,15 M Na₂CO₃ ve 0,1 M NaHCO₃ (pH:10)) :** 30,18 g (0,3 mol) Na₂CO₃ ve 16,8 g (0,2 mol) NaHCO₃'ün 2 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
- Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl ve 22 mM Na₂SO₄ (pH:8,7)) :** 6,052 g (50 mmol) Tris ve 6,248 g (44 mmol) Na₂SO₄, 1950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 2 litreye tamamlandı.
- Kolona tutunmuş HCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (25 mM Na₂HPO₄ ve 1 M NaCl, (pH: 6,3)):** 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH: 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti (0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4)):** 6,055 g Tris 950 mL destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
- Kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (0,1 M CH₃COONa ve 0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6)):** 9,187 g NaClO₄ tutunmuş ve 2,04 g

0,015 mol $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 120 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6 olana kadar titre edilerek toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

7. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 200 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 alınarak %95'lik olan etanolde çözüldükten sonra elde edilen çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilip çözeltinin hacmi destile suyla 2 litreye tamamlandı.

8. 0,025 M veronal tamponu: 0,025 mol sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp pH:8,2'ye kadar 0,1 M NaOH ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

9. CO_2 çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C 'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO_2 gazı geçirilerek hazırlandı.

10. İndikatör çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0250 g fenol kırmızısı ve 0,436 g NaHCO_3 ün 2 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

11. %0,04'lük Brom Timol Mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N'lik NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

12. Stok fenolik Olivetol çözeltisi: 1 mg Olivetol 1 mL çözücüde (etanol) çözüldürüldü.

b. İnsan Kanından Glutasyon S-Transferaz Enzimin Saflaştırılması ve Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl, (pH:7,4) (Kolonun paketlenmesi, dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan çözelti): 0,34 g KH_2PO_4 ve 2,19 g NaCl alınarak 200 mL suda çözülüp pH 7,4'e getirildikten sonra saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2. 2,5 mM, 5 mM ve 10 mM GSH çözeltisi içeren 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH:9,5) (Afinite jeline tutunan GST enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 50 mM Tris- HCl çözeltisi (pH:9,5) içerisinde katı olarak GSH çözülerek 10 mM'lık GSH çözeltisi hazırlandıktan sonra 5 tüpten oluşan gradient oluşturuldu ve düşük konsantrasyondan başlanarak sırayla afinite kolonuna uygulandı.

3. **0,1 M H₃BO₃ ve 0,5 M NaCl, pH:8,5 (Borat Tamponu) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon 1):** 3,090 g H₃BO₃ ve 14,62 g NaCl alınarak 400 mL saf su da çözülüp, pH 8,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
4. **0,1 M NaCH₃COO ve 0,5 M NaCl, pH:4,5 (Asetat Tamponu) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon 2):** 4,1 g NaCH₃COO ve 14,62 g NaCl alınarak 400 mL saf su da çözülüp pH:4,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
5. **%0,02 NaN₃ çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için kullanılan çözelti):** 40 mg NaN₃ alınarak saf suda çözülüp ve hacmi yine saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.
6. **0,1 M KH₂PO₄ (pH:6,5):** 0,68 g KH₂PO₄ ve 0,014 g EDTA tartılarak 30 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH 6,5'a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.
7. **20 mM GSH Çözeltisi:** 0,03 g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
8. **25 mM CDNB Çözeltisi:** 0,025 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 5 mL'ye tamamlandı.

c. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İçin Kullanılan Çözeltiler

1. **SDS-PAGE'de kullanılan numune tampon:** 0,65 mL 1,0 M Tris-HCl (pH:6,8) 1 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan önce, 950 µL numune tamponundan 50 µL olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edildi.
2. **SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tampon:** 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin tartılarak 50 mL saf suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
3. **Boyama çözeltisi (elektrofrez jelinin boyanması için kullanılan çözelti):** 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak

şekilde yeteri kadar hazırlandı.

4. **Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi:** 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid karışımı 100 mL suda çözüldü.
5. **%10'luk SDS çözeltisi:** 10 g SDS 90 µL saf suda çözüldü.
6. **3 M'lık Tris-HCl çözeltisi (pH: 8,8) :** 36,3 g Tris alındı ve 48 mL 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
7. **Jel fiksasyon çözeltisi :** %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.
8. **Jel yıkama çözeltisi :** %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışım hazırlandı.

d. **Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. **0,2 M fosfat tampon çözelti (pH: 6,6):** 3,12 g Na₂HPO₄ yaklaşık 80 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 100 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. **%1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisi:** 1,5 g K₃Fe(CN)₆ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. **%10'luk TCA çözeltisi:** 20 g TCA saf suda çözüldü ve toplam hacmi 200 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. **%0,1'lik FeCl₃ çözeltisi:** 170 mg FeCl₃.6H₂O saf suda çözülerek ve toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı.

e. **Kuprak Metoduna Göre İndirgeme Kapasitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler**

1. **0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisi:** 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
2. **7,5x10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi:** 156 mg Neokuprin alındı ve 100 mL etanolde çözüldü.
3. **1 M'lık CH₃COONH₄ tampon çözelti (pH: 6,5):** 15,4 g CH₃COONH₄ alındı ve 180 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH:6,5'e ayarlandıktan sonra hacim destile suyla 200 mL'ye tamamlandı.

f. DPPH[•] Serbest Radikal Giderme Aktivitesi İle İlgili Çözeltiler

1. **10⁻³ M'luk DPPH[•] çözeltisi:** 40 mg DPPH[•] 100 mL etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece etanolde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

g. ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. **0,1 M'luk fosfat tampon çözelti (pH: 7,4):** 5,68 g Na₂HPO₄ 350 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlanarak hacim saf suyla 400 mL'ye tamamlandı.
2. **2 mM'luk ABTS çözeltisi:** 11 mg ABTS 0,1 M'luk ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
3. **2,5 mM'luk potasyum persülfat çözeltisi:** 66,25 mg K₂O₈S₂ 0,1 M'luk ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

h. DMPD^{•+} Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. **0,1 M'luk asetat tampon çözelti (pH 5,3):** 4,1 g CH₃COONa 450 mL saf suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 5,3'e ayarlanarak hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
2. **0,1 M'luk DMPD çözeltisi:** 209 mg DMPD 10 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
3. **0,001 M'luk DMPD^{•+} çözeltisi:** 0,1 M'luk DMPD çözeltisinden 1 mL alındı 100 mL'lik ve 0,1 M'luk (pH: 5,25) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 mL ve 0,05 M'luk FeCl₃ ilave edilerek hazırlandı.
4. **0,05 M'luk FeCl₃ çözeltisi:** 0,81 g FeCl₃ 100 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

i. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. **0,05 M'lık fosfat tampon çözelti (pH: 7,8):** 2,84 g Na_2HPO_4 yaklaşık 350 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 7,8'e ayarlanarak hacim saf su ile 400 mL olacak şekilde tamamlandı.
2. **$1,33 \times 10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltisi:** 12 mg riboflavin 100 mL, 0,05 M ve pH: 7,8'lik fosfat tamponunda çözüneceye kadar karıştırıldı.
3. **$4,46 \times 10^{-5}$ M'lık metiyonin çözeltisi:** 0,665 mg metiyonin 100 mL, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözüneceye kadar karıştırıldı.
4. **$8,15 \times 10^{-8}$ M'lık NBT çözeltisi:** 12,2 mg NBT alındı ve toplam hacim 100 mL'ye fosfat tamponuyla (pH:7,4, 0,1 M) tamamlandı.

j. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini İle İlgili Çözeltiler

1. **2 mM'lık FeCl_2 çözeltisi:** 0,028 g $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 100 mL etanolde çözüldü.
2. **5 mM'lık ferrozin çözeltisi:** 12 mg ferrozin 50 mL saf etanolde çözüneceye kadar karıştırıldı.

k. FRAP İndirgeme Metodu İle İlgili Çözeltiler

1. **0,3 M'lık Asetat Tampon çözelti:** 4,92 g NaCH_3COO alındı ve 180 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlanarak hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. **40 mM'lık HCl Çözeltisi:** 0,334 mL %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. **10 mM'lık TPTZ Çözeltisi:** 0,312 g TPTZ alındı ve 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.
4. **20 mM'lık FeCl_3 Çözeltisi:** 0,54 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 100 mL destile suda çözüldü.
5. **FRAP Reaktifi:** 10 hacim 0,3M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden oluşur.

l. Ferrozin Metal Şelatlama Metodu İle İlgili Çözeltiler

- 1. 0,1 M'lık Tris-HCl Tampon çözelti:** 2,42 g Tris alındı ve 180 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 200 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 2. 0,2 M'lık HCl Çözeltisi:** 3,2 mL %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 200 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 3. %0,2'lik Ferrozin Çözeltisi:** 0,2 g Ferrozin alındı ve 100 mL'lik, 0,2 M'lık HCl çözeltisinde çözüldü.
- 4. 2 mM'lık FeSO₄ Çözeltisi:** 0,056 g FeSO₄.7H₂O alındı ve 100 mL destile suda çözüldü.

m. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- 1. 1 M'lık Tris-HCl Tampon çözelti:** 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldü pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 2. 10 mM'lık Asetilkolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.290 g Asetil kolin İyodat alındı ve 100 mL destile suda çözüldü.
- 3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)) Çözeltisi:** 0.02 g DTNB ve 1 g sodyum sitrat alındı 100 mL destile suda çözüldü.

n. Bütirilkolin Esteraz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

- 1. 1 M'lık Tris-HCl Tampon çözelti:** 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldü pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 2. 5 mM'lık Bütirilkolin iyodat Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,14 g Bütiril kolin İyodat alındı ve 100 mL destile suda çözüldü.
- 3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit)) Çözeltisi:** 3,4 mg DTNB alındı ve 25 mL destile suda çözüldü.

o. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,1 mM Sodyum Fosfat Tamponu (Enzim seyretmek için): 6 mg sodyum fosfat tartılıp 450 mL saf suya ilave edilip pH'sı 6,9'e ayarlayıp saf su ile hacmin 500 mL'ye tamamlandı.

2. 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivite ölçmesi için): 5,99 g sodyum fosfat tamponu tartılır ve 450 mL saf su içerisinde çözünür ve pH'sı 6,9'a ayarlandıktan sonra son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3. 5 mM'lık 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside substrat çözeltisinin hazırlanması: 0,0376 g ilgili substrattan tartılıp 0,1 M'lık fosfat tampon içerisinde 25 mL'de çözüldü.

p. α -Amilaz Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. 0,1 mM Sodyum Fosfat Tamponu (Enzim seyretmek için): 6 mg sodyum fosfat tartılıp 450 mL saf suya ilave edilip pH'sı 6,9'e ayarlayıp saf su ile hacmin 500 mL'ye tamamlandı.

2. 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivite ölçmesi için): 5,99 g sodyum fosfat tamponu tartılır ve 450 mL saf su içerisinde çözünür ve pH'sı 6,9'a ayarlandıktan sonra son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

3. Nişasta Substrat Olarak Hazırlanması: 20 mg nişasta 20 mL saf su içerisinde çözüldü.

q. GR Enziminin Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. 50 mM Tris-HCl/1 mM EDTA (pH: 8.0): 0,6057 g (5mmol) Tris ve 0,0292 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 90 mL destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 1 M KH_2PO_4 (pH: 7,3): 6,8 g KH_2PO_4 (0,05 mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH: 7,3'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. 20 mM GSSG Çözeltisi: 61,88 mg okside glutatyon (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü, toplam hacim suyla 5 mL'ye tamamlandı.

4. 2mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH ($9,9 \times 10^{-3}$ mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Suyla 5 mL'ye tamamlandı.

r. GR için Eritrositlerin Yıkınması İçin Kullanılan Çözeltiler:

1. 0,154 M NaCl: 9,009 g NaCl (0,154 mol) alınarak hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2. 0,16 M KCl: 11,92 g KCl (0,16 mol) alınarak destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

3. (Eritrositlerin hemolizinde kullanılan stabilize edici çözelti) 0,789 g EDTA (2,699 mmol) bir miktar suda çözüldü, 0,05 mL β -merkaptoetanol ilave edildi, pH=7,0'a ayarlandı ve toplam hacim suyla 1 L'ye tamamlandı.

3.2. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enziminin Saflaştırılması İçin Kullanılacak Kanın Temini

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden temin edildi. Deneylerde kullanılmaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enzim Saflaştırma Çalışmaları

3.3.1. Karbonik anhidraz enzim hemolizatının hazırlanması

Alınan kan santirifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca $2500 \times g$ 'de santirifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınarak, tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her defasında $2500 \times g$ 'de 15 dakika santirifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $20.000 \times g$ 'de 30 boyunca dakika santirifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere

+4°C’de muhafaza edildi (Çoban *et al.*2008).

3.3.2. CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

a) Sefaroz-4B-L-tirozin Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinde uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid ise karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü olarak afinite jelinin yapısında bulunmasıyla enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

b) CNBr ile Aktifleştirilmiş Sefaroz-4B’ye Tirozin Takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL’inde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C’de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C’de bekletildi. Bu sürenin sonunda yıkama suyu 280 nm’de absorban vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH: 8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

c) Sülfanilamid Kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL, 1,0 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C’de 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı.

10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1,0 M NaOH ile pH: 9,5’de sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldıktan sonra 1 L su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı.

d) Afinite Kolonunun Paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:8,8) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm’lik kapalı bir sistem olan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompayla yıkama ve dengeleme tamponuyla yıkandı. Kolonun dengelenmesi eluat ile tamponun 280 nm’de absorbanlarının ve pH’ların aynı değerde olmasıyla anlaşıldı.

e) Afinite Kolonuna Numune Tatbiki Ve Elüsyonu

Katı Tris ile pH’sı 8,7’ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) tamponu tatbik edilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5’er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm’deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat’e ayarlandı.

3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini

3.4.1. Hidrataz aktivitesi

Bu amaçla öncelikle hidrataz aktivitesi kullanıldı. CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

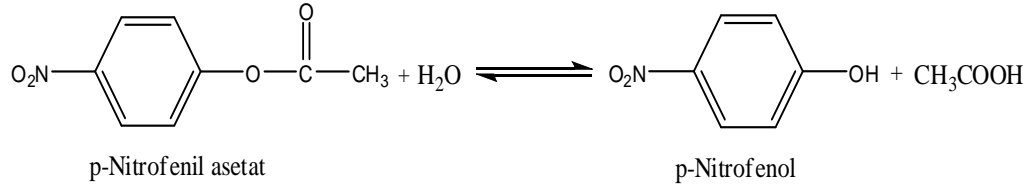
Bunun için kor olarak hazırlanan tüpe 1 mL 0.025 M veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 mL %0,04'luk brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t_o). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

$$EU = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

Formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı. Hemolizat, saf enzim çözeltisi ve inhibisyon çalışmalarında aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı. Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı.

3.4.2. Esteraz aktivitesi

Yöntemde karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması temeline dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidrazın substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın enzimatik olarak p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm’de hem *p*-Nitrofenol hemde *p*-Nitrofenolat aynı absorbansı vermektedir. Yani fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ya da ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Göçer and Gülçin 2013). Bu dalga boyunda 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı:

Çizelge 3.1. Karbonik Anhidraz esteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris-SO ₄ (pH:7.4, 0.05 M)	400	400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat (PNA)	360	360
Saf su	240	210
Enzim çözeltisi	-	30
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 3 dakika sonundaki 25°C’de 348 nm’de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Yapılan deneylerde kullanılan *p*-Nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM’lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterın sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Kalitatif protein tayini

Protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında olan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi temeline dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda bu tayini yapıldı ve fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede okundu.

3.5.2. Kantitatif protein tayini

Bu yöntem sayesinde afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları belirlendi. Bu yöntemin esası, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanmasıdır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı bir şekilde olur. Protein-boya kompleksi çözeltelerde uzun süre kalır. Bu yöntemde hassasiyet 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Tayin sırasında şunlar yapıldı: 1 mL'sinde 1 mg protein olan standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 100 µL'ye tamamlanarak 4900 µL renklendirme reaktifi tüplere eklendikten sonra vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu.

Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 4900 µL renklendirme reaktifinin ilavesiyle oluşan karışım kullanılarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleriyle standart grafik çizildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayinine gidildi.

3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasının akabinde Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (1970). Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptetanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin %20 ayırma jelinde elektrofrezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban *et al.* 2008).

3.7. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine Olivetol'un Etkisinin Belirlenmesi

Olivetol'un saflaştırılacak olan CA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hem hidrataz hem de esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra IC₅₀ ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

3.8. İnsan Eritrositlerinden Glutasyon S-transferaz Enzim Saflaştırma Çalışmaları

3.8.1. Glutasyon S-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

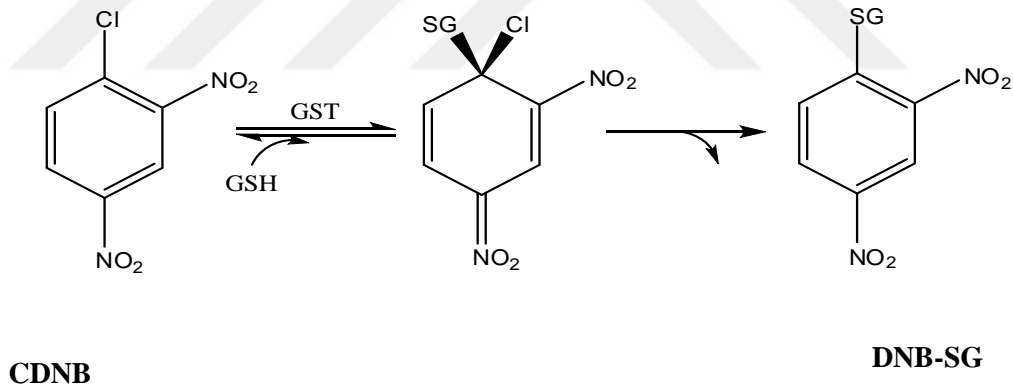
Enzimi saflaştırmada kullanmak üzere Glutasyon- Agaroz jeli 1 g tartılarak 200 mL saf su da 2°C ile 4°C arasında bir gece şişirildi daha sonra safsızlıkları uzaklaştırmak için jelin 10 katı kadar saf suyla ya da dengeleme tamponuyla birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompuyla vakum uygulanarak alındı. Hazırlanan jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm de absorbanslarının veya pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu (Güvercin *et al.*2008).

Önceden hazırlanan homojenat dengelenen Glutasyon Agaroz afinite kolonuna uygulandı. Numune kolondan geçirildikten sonra, 280 nm'de elüsyonlardaki absorbans

farkı 0,05 oluncaya kadar kolon dengeleme tamponuyla yıkandı. Daha sonra 10 mM GSH içeren 50 mM Tris/HCl (pH:7,5) tamponuyla gradientli elüsyon yapıldı ve elüatlar 1,5 mL halinde tüplere alındı ve 340 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Aktif elüsyonlar sonraki çalışmalar için birleştirildi.

3.8.2. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi bir glutasyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizler. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen 5-glutasyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbans gösterir (Şekil 3.2). Böylece bu dalga boyundaki absorbans artışından yararlanılarak aktivite ölçümü yapılabilir. Biz de çalışmalarımızda bu aktivite ölçüm metodunu kullandık.



Şekil 3.2. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous *et al.* 2002)

GSH'ın yokluğunda, CDNB hızlı bir şekilde glutasyon S-transferazı inaktive eder. Bu sebepten dolayı reaksiyonun CDNB ile başlatılması gerekir. Aktivite ölçümü için toplam hacim 1 mL olacak şekilde Çizelge 3.2'de verilen çözelti ortamı hazırlandı. Küvetler spektrofotometreye yerleştirilip okuma başlatıldı. Kronometre kullanılarak başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika süresince absorbans değerleri ölçülüp kaydedildi (Habig *et al.* 1974).

Çizelge 3.2. GST enzimini aktivite ölçümünde kullanılan küvet içeriği

Küvet İçeriği	Kör (µL)	Numune (µL)
0,5 M aktivite tamponu	200	200
25 mM CDNB	20	20
20 mM GSH	50	50
Saf su	730	720
Enzim numunesi	-	10

Bir enzim ünitesi bir dakikada, 25°C’de ve pH 6,5’de substratı ürüne dönüştüren enzim aktivitesi olarak tanımlanır. Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U} = (\Delta OD / 9,6) \times (VT / VE) \times SF$$

EÜ: 1 mL’deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

9,6: 340 nm’de 1 mM DNB-SG’nin ekstinksiyon katsayısı

VT: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

VE: Ölçüm yapılan küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

3.8.3. Olivetol’un glutatyon redüktaz, glutatyon s-transferaz, α-glikozidaz ve α-amilaz enzimlerin üzerine inhibisyon etkisi

Olivetol’un saflaştırılacak olan Glutatyon S-transferaz ve Glutatyon redüktaz enzimler üzerindeki etkisi araştırıldı. Daha sonra satın alınmış α-Glikozidaz ve α-Amilaz enzimler üzerine etkisi incelendi. Ölçümler aktivite tayin yöntemiyle yapıldı. Daha sonra IC₅₀ ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

3.9. İnsan Eritrositlerinden Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırmasıyla ilgili Çalışmalar

3.9.1. Kan temini ve hemolizat hazırlanması

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, santrifüje yerleştirildi ve 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklı dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M (izotonik) NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin 5 katı kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +40°C'de 20.000 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere damlalıklı dikkatli bir şekilde alındıktan sonra çökelek kısmı atıldı. Böylece hemolizat elde edilmiş oldu (Hunaiti and Soud 2000).

3.9.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Yapılacak amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Kan numunesinden hazırlanan hemolizat için %30-70 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çöktürme için kullanılan katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bar ile iyice çözünmesi sağlandı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S1: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S2: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Önce %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Tuzlu hemolizat santrifüj tüplerine konularak 5000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı (böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Daha sonra %70 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çözünen tuzlu hemolizat santrifüj tüplerine konularak 5000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı çökelek minimum fosfat tamponunda (50 mM K-fosfat, pH=7,5) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri buzla dolu kap içerisinde gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7,5) karşı 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (Simith 1987). Diyaliz işlemi, soğuk ortamda gerçekleştirildi.

3.9.3. Afinite kolonunun hazırlanması ve insan eritrosit GR enziminin saflaştırılması

10 mL'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP-Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 mL destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (50 mM KH₂PO₄/1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH: 7,3) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Belirlenen amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen numune, uygun tamponda çözülüp diyaliz edildikten sonra 2',5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan

geçdikten sonra kanın kırmızı rengi tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Bunu takiben kolondan 0,4 M KH_2PO_4 tamponu (pH: 7,3) geçirilerek yıkandı. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla belirlendi. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM KH_2PO_4 /1 mM EDTA, 1 mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH: 7,3) ile elüe edildi (Danner *et al.* 1977; Boggaram *et al.* 1979; Carlbeg and mannervik 1981). İnsan eritrosit GR ile çalışırken literatürde kullanılan optimal şartlar uygulandı. Elüsyonlar 1,7 mL olacak şekilde eppendorf tüplerine alındı, her birinde aktivite değerleri okunarak insan eritrosit GR enzimi için grafik oluşturuldu (Şekil 4.16). Bu çalışmayla elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılarak elektroforez bantları elde edildi (Şekil 4.17). İnsan eritrosit GR enziminin saflaştırılmasında kullanılan afinite kolonu yeterli olmadığı için ikinci bir kromatografik teknik olan jel filtrasyon kromatografisi uygulandı.

3.9.4. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması, insan eritrosit GR enziminin saflaştırılması

Jel filtrasyon kromatografisi ile enzim saflaştırılmasının esası molekül büyüklüğüne bağlıdır. Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimin elektroforezde yürütülmesi ile farklı bölgelerde bant oluşturan proteinlerin jel filtrasyon kromatografisi ile ayrılabilceği düşünüldü ve jel filtrasyon kromatografisi kolonu hazırlandı. Kolon materyali olarak Sephadex G-200'ün 5 g'ı tartılarak 200 mL saf su içersine konuldu. 90°C'de 4 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH'sı 7,5 olan 0,05 Tris-HCl ve 0,1 M KCl tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlenildi. Kolonun dengelenmesi yine aynı tampon ile yapıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 15 mL/saat'e ayarlandı. Dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçirilerek ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun 280 nm'de absorbansı ile pH değerinin aynı olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı.

Dengelenmiş kolona numunelerin tatbiki için kolonun üzerindeki kapalı sistem açıldı ve

jelin üzerinde birikmiş tamponun emilmesi beklendi. Tampon tam jelin üzerine indiği anda 2,5 mL afinite kolonundan elüe edilip diyaliz yapılan ve 0,125 mL gliserol ile karıştırılan enzim numunesi jelin üzerine tatbik edildi. Tatbik edilen numunenin emilmesi beklendi ve üzerine pipetle dikkatli bir şekilde yürütme tamponu eklendi. Daha sonra sistem, stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı.

Kolonun üzerine enzim uygulandıktan sonra elüsyon alınmaya başlandı. Her bir tüpte 1,7 mL olacak şekilde elüatlar tüplere alındı. Alınan tüplerde 280 nm'de absorbans değerleri ve 340 nm'de aktivite değerleri okundu. Elüsyon işlemi aktivite değerinin bitmesine kadar devam edildi. Elde edilen değerler Şekil 4.16'da gösterildi. Bu tüplerde protein ve aktivite değerleri belirlenerek saflaştırma katsayısı ve verimi hesaplandı (Çizelge 4.6.). Aktivite gösteren tüpler diyaliz yapıldı. Yüksek aktivite gösteren iki tüp birleştirildi ve elektroforez yapmak için derişikleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla Liyofilizatör kullanıldı.

Enzim numunesine liyofilize etmek için -85°C 'de bekletilerek iyice donduruldu. Bu sırada liyofilizatör çalıştırılarak basınç ve sıcaklık değerlerinin ayarlanması sağlandı. Tamamen dondurulmuş enzim numunesi hemen çıkarılarak, hazır hale gelmiş liyofilizatöre takıldı ve liyofilizasyon işlemi başlatıldı. Liyofilizasyon işlemi enzim numunesinin yaklaşık %80 oranında suyu uzaklaştırılıncaya kadar devam edildi. Elde edilen derişik insan eritrosit GR enzim numunesi saflaştırılmak amacıyla jel filtrasyon kromatografisinde ve saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE'de yürütüldü. İlaç ve kimyasal maddelerin etkilerinin araştırılmasında kullanılan enzim numunesi liyofilize edilmeden kullanıldı.

3.9.5. Glutatyon redüktaz enziminin aktivite tayini

Glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa dayanmaktadır. Birincisi; yukarıdaki reaksiyona giren NAD(P)H 340 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NAD(P)H'nin azalmasına sebep

olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm’de takip edilmektedir (Carlberg and Mannervik 1985).

İkincisi ise aynı reaksiyonda ürün olarak ortaya çıkan GSH’ın 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu bileşiğin 412 nm’de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır. GR enzimi GSH’ın zamanla artmasını sağlamakta, oluşan GSH da DTNB ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmaktadır (Smit *et al.* 1988). Bu iki yöntemden birincisi daha spesifik olduğu için tercih edilmektedir. Bu sebeple biz de bu çalışmada birinci yöntemi kullandık. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi FAD’li ve FAD’siz olmak üzere iki değişik ölçüm yapılmaktadır. Bazen biri bazen de her iki türlü ölçüm yapılarak karşılaştırma yapılmaktadır. Çalışmamızda FAD’siz ölçüm yapıldı. Genellikle aktivite ölçümü yapılırken hemolizat ve amonyum sülfat çökeleğinde 1/20 oranında seyreltme yapıldı, afinite kromatografisi ya da jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen elüsyonlar seyreltilmeden kullanıldı.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/mL = \frac{AOD}{6,22} \times \frac{VT}{VE} \times SF$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

E \ddot{U} /mL: 1 mL’deki enzim ünitesi

Δ OD: Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22: 1 mM NADPH’ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

VT: Ölçümün yapıldığı toplam kuvvet hacmi

VE: Ölçümün yapıldığı kuvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır).

3.10. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini

α -Glikozidaz enzim aktivitesi, Tao ve arkadaşlarının prosedürüne göre substrat olarak p-NPG kullanılarak belirlendi; Numuneler 20 mg'ı 2 mL'de eriterek hazırlandı (EtOH:H₂O). Tüm enzim inhibisyonu elde edilmesi durumunda fosfat tamponunda çoklu çözeltiler hazırlandı. İlk olarak 75 uL fosfat tamponu, fosfat tamponu (0.15 U / mL, pH 7.4) ve 5 uL numune içindeki 20 uL enzim çözeltisi ile karıştırıldı. Ardından tepkime başlangıcına p-NPG ilave edilmeden önce 35°C'de 10 dakika ön inkübe edilmiştir. Ayrıca, ön inkübasyondan sonra fosfat tamponunda (5 mM, pH= 7,4) 20 uL p-NPG ilave edildi ve inkübasyon tekrar 35°C'de gerçekleştirildi. Verilerin eğri uydurulması ile IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Akarboz bileşiği pozitif kontrol olarak kullanıldı. Absorbanslar 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. α -Glikosidazın bir birimi dakikada 1.0 mol substrat hidrolizini katalize eden enzim miktarıdır (pH: 7,4).

3.11. α -Amilaz Enziminin Aktivite Tayini

α -amilaz enziminin aktivitesi, Xiao ve arkadaşları tarafından kaydedilen prosedüre göre belirlendi. Bu çalışmada, sübstrat çözeltisi hazırlamak için, 80 mL NaOH çözeltisi (0.4 M) içerisinde çözüldürülmüş 2 g nişasta ve 30 dakika boyunca 80°C'de ısıtılmıştır. Ayrıca, buzlu suda 2.0 M HCl ile soğutulduktan sonra, çözeltinin pH'sı 6.9'a ayarlandı ve 100 mL tamamlamak için H₂O kullanıldı. Numune solüsyonları 20 mg'ı 2 mL'de eriterek hazırlandı (EtOH:H₂O). Tüm enzim inhibisyonu elde edilmesi durumunda fosfat tamponunda çoklu çözeltiler hazırlandı. Yüzey (35 uL), fosfat tamponu (pH 6.9, 35 uL) ve numunenin (5 uL) çözeltileri karıştırıldı ve 35°C'de 30 dakika önceden inkübe edildi. Ardından 50 µg/mL'lik bir enzim solüsyonundan 20 uL ilave edildi. Çözelti 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, 50 mL 0,1 M HCl ilave edilerek bitirildi. Emilim değerleri 580 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. α -Amilaz enziminin bir birimi 20°C'de pH 6,9'da 3 dakika içinde nişastadan 1,0 mg maltoz salan enzim miktarıdır.

3.12. Antioksidan Çalışmaları

3.12.1. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi

Olivetol'un indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmiş şekline göre yapıldı (Gülçin 2009). Bunun için öncelikle 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözülden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere aktarıldı, hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandıktan sonra her bir tüpe 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH:6,6) ve 2,5 mL %1'lik K₃Fe(CN)₆ ilave edilerek karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL FeCl₃ (%0,1) ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör içinde saf su kullanıldı. Kontrol için de numune yerine saf su kullanıldı.

3.12.2. Cu²⁺-Cu⁺ indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu)

Olivetol'un Cu²⁺ indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif bir modifikasyonu ile yapıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Olivetol tüplerine 0,25 mL CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M) ve 0,25 mL CH₃COONH₄ tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü ve kör olarak saf su kullanıldı.

3.12.3. FRAP indirgeme aktivitesi

Total antioksidan için hazırlanan stok çözelti bu deneyde de kullanılır. Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde Olivetol'un çözeltisi ve standart çözeltiler aktarıldı. Hacimleri 0,5 mL'ye tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µL, 20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi ve 2250 µL FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 mL'ye tamamlandı. Deney

tüpleri Vortex'de karıştırıldı ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbansları kaydedildi. Kör olarak asetat tamponu kullanıldı.

Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırılmasının akabinde oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkübe edildikten sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı etanoldenoluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak da fenolik bileşikli numune hariç geriye kalan çözelti kullanıldı.

3.12.4. Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi

Fe^{2+} şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı (Re *et al.* 1999). Bu amaçla deney tüplerine 0,25 mL $FeSO_4$ çözeltisi (2 mM) aktarıldı. Bu çözeltinin üzerine 0,12 mL Olivetol'un veya standart çözelti ilave edildi. Daha sonra sırasıyla 1 mL Tris-HCl tamponu (pH: 7,4) ve HCl (0,2 M) içerisinde çözülmüş 1,5 mL'lık bipiridil çözeltisi (%0,2) ilave edildi. 2,5 mL etanol ve 0,63 mL saf su içeren numunenin absorbansı 522 nm de ölçüldü. Kör olarak Tris-HCl tamponu kullanıldı. Kontrol olarak da numune yerine Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı.

3.12.5. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi

Olivetol'un süperoksit anyon radikallerini gidermesi, nitroblue tetrazoliumun (NBT) spektrofotometrik ölçümü sayesinde belirlendi (Zhishen *et al.* 1999). Daha önce hazırlanan stok çözelti bu amaç için de kullanıldı. Bunun için numune ve standartların farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lık ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazırlandı. Numunenin olduğu tampon çözeltiye riboflavin, metiyonin ve NBT'den sırasıyla $1,33 \times 10^{-5}$, $4,46 \times 10^{-5}$ ve $8,15 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonlarına denk gelen Olivetol'un miktarları ilave edildi. Meydana gelen reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 40 dakika boyunca 20 W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Absorbanslar, sudan oluşan köre karşı 560 nm'de kaydedildi.

3.12.6. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi

Olivetol'un DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (Blois 1958). Serbest radikal olarak DPPH^{*}'ın 10⁻³ M'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonundaki Olivetol'un'un stok çözelti kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde etanol ile tamamlandıktan sonra her bir numune tüpüne stok DPPH^{*} çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH^{*} çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH^{*} çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

3.12.7. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

Olivetol'un ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi (1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretilildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 0,700±0,025 nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan Olivetol'un farklı konsantrasyonlarına (10-30 µg/mL) birer mL ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar kaydedildi.

3.12.8. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi

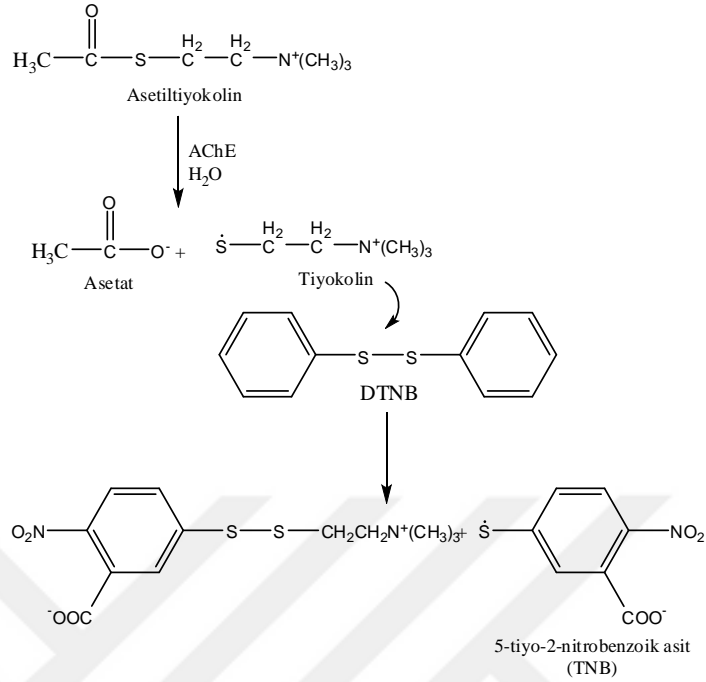
N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon (DMPD⁺) elde edildi. Bunun için 100 mL'lik DMPD çözeltisinin

(pH: 5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 mL FeCl₃ ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 mL'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı. DMPD^{•+} radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik dansitesi 0,1 M'luk ve pH'ı 5,3 olan fosfat tamponu ile 0,900±0,100 nm'ye ayarlandı. Günlük taze olarak hazırlanan DMPD^{•+} çözeltisinin absorbansı 12 saate kadar sabittir.

Olivetol ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10–30 µg/mL) deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 0,5 mL ye tamamlandıktan sonra üzerine 1 mL DMPD^{•+} çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorbans değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.13. Olivetol'un Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine inhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Olivetol'un asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi Ellman metoduna göre araştırıldı. Bu amaçla IC₅₀ ve K_i değerleri bulundu ve inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonuyla oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşturur. Meydana gelen bileşik renk 412 nm'de absorbans verdi (Ellman *et al.* 1961). Örnek ve kör kuvvetlerinin 412 nm dalga boyunda ve 5 dakikada boyunca absorbansları ölçüldü.



Şekil 3.3. Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayini (Ellman 1961)

Çizelge 3.3. Asetilkolinesteraz aktivite tayininde küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Asetilkolintiyoiyodür	50	50

3.14. Olivetol'un Bütirikolinesteraz Enzimi Üzerine inhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Olivetol'un BChE üzerindeki etkisi araştırıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonuyla sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Meydana gelen

renk 412 nm'de ölçülür (Ellman *et al.* 1961). Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda, 5 dakikada boyunca absorbansları ölçüldü.

Çizelge 3.4. Bütirikolinesteraz aktivite tayininde küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (μL)	Numune Tüpü (μL)
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Bütirikolintiyoiyodür	50	50

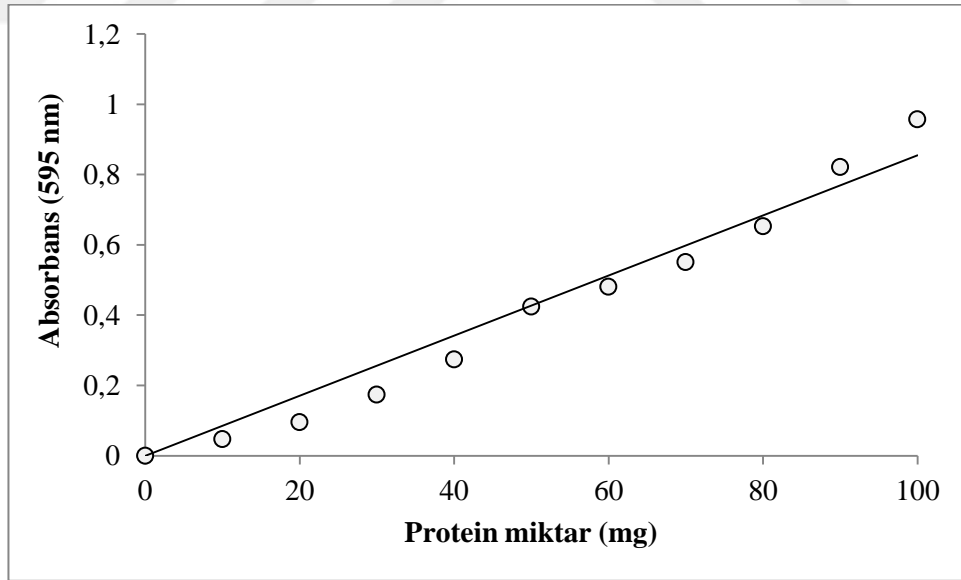
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'den elde edilen denklemden hesaplandı (r^2 : 0,9648).

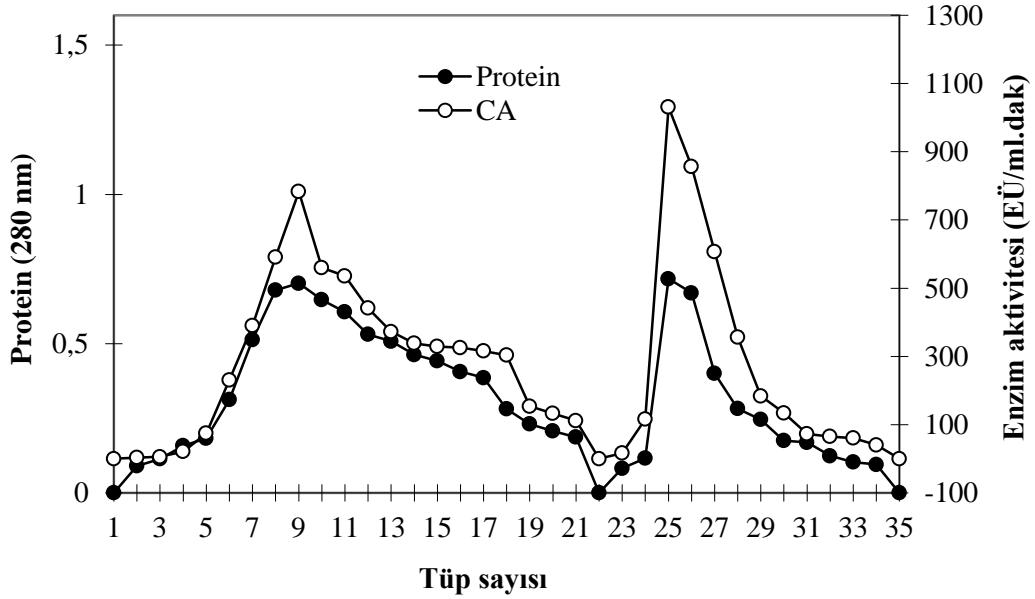
$$\text{Absorbans } (\lambda_{595\text{nm}}) = 0,0086x$$



Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik.

4.1.2. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

İnsan eritrositlerinden hCA I ve II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı. Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona yüklendi. Kolondan önce 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) tamponu geçirilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ pH: 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği

İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizattanın Sepharose-4B-L-Tirozin sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar

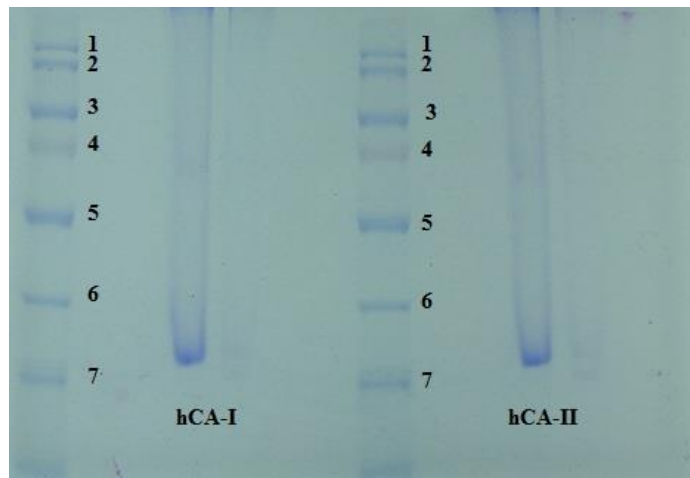
Çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. İnsan kanından elde saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin için saflaştırma özeti

Numune Türü	Aktive (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam hacim(mL)	Toplam aktivite (EÜ)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı	
Hemolizat	4831,13	39,20	25	120778,25	980	123,24	100	1	
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	CA I	5385,41	0,16	6	32312,46	0,96	33658,81	26,75	273,11
	CAII	6340,11	0,07	3	19020,33	0,21	90573,00	15,74	734,93

4.1.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamid jel elektroforezine insandan saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).



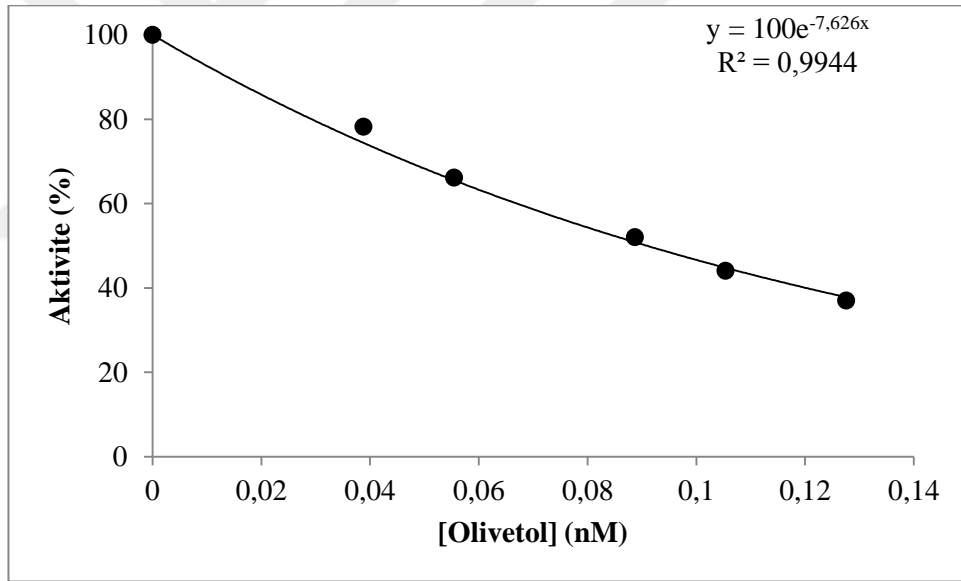
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

*Standart proteinler (1: 170 kDa 2: 130 kDa 3: 100 kDa, 4: 70 kDa 5: 55 kDa 6: 40 kDa 7: 30 kDa),

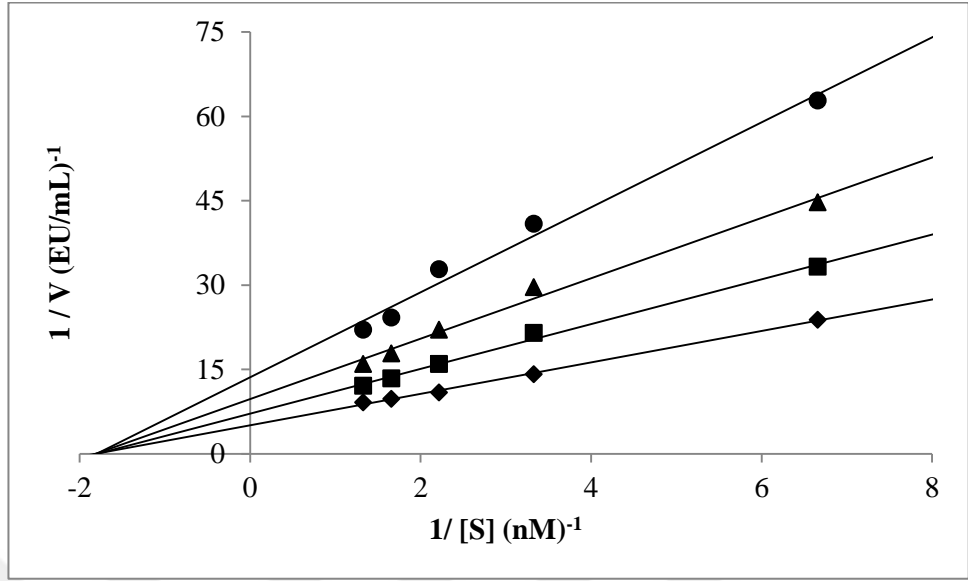
4.1.4. hCA I ve II izoenzimleri esteraz aktiviteleeri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

4.1.4.a. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde olivetol ve asetazolamid inhibisyon etkisi ile ilgili sonuçlar

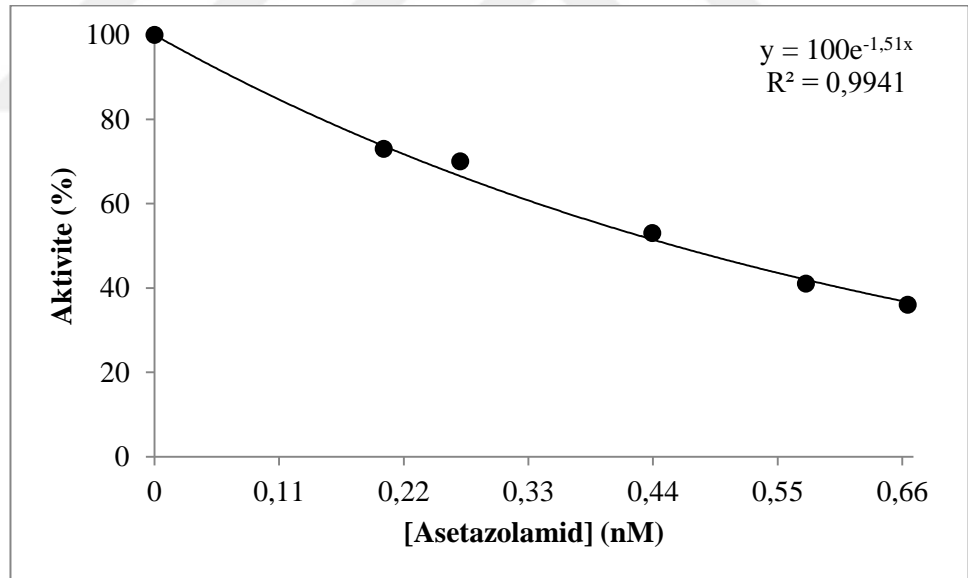
Doygun substrat derişiminde insan eritrositinden saflaştırılan hCA I izoenzimi standart inhibitörü olan Asetazolamid ve antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



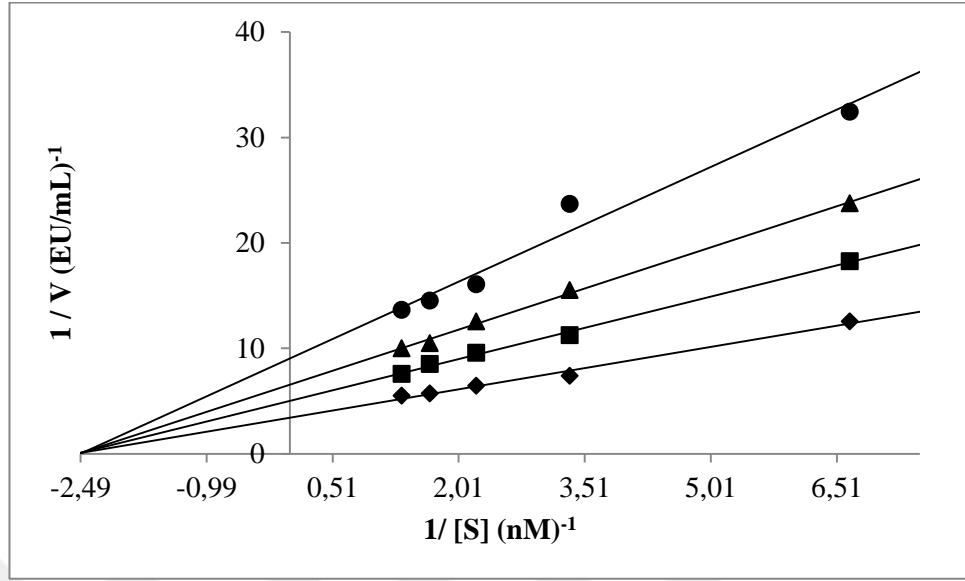
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği



Şekil 4.5. hCA I izoenzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği



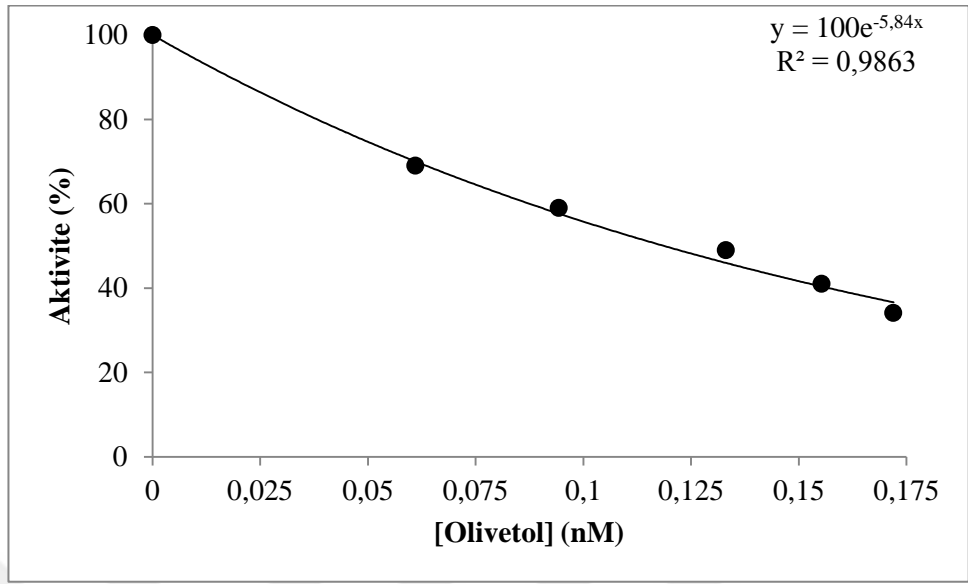
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri

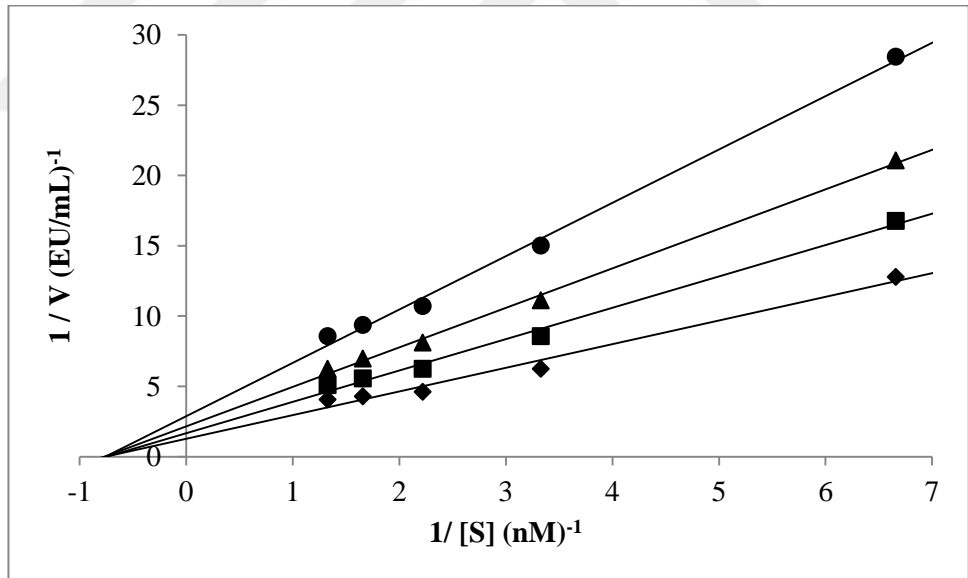
İnhibitör	IC_{50} (nM)	R^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Olivetol	90,87	0,9944	$88,05 \pm 11,15$	Yarışmasız
Asetazolamid	458,94	0,9941	$441,86 \pm 39,14$	Yarışmasız

4.1.4.b. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde olivetol ve asetazolamid inhibisyon etkisi ile ilgili sonuçlar

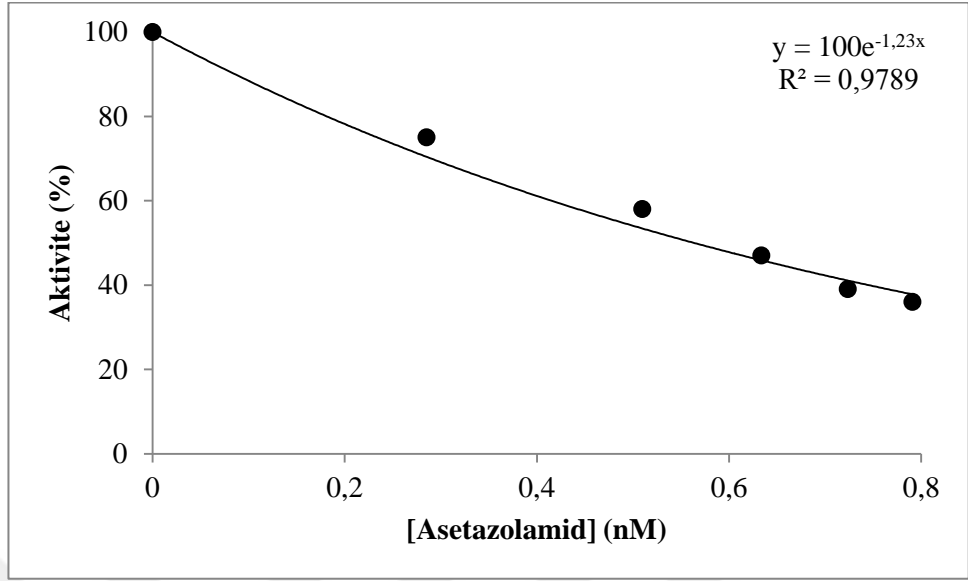
Doygun substrat derişiminde insan eritrositinden saflaştırılan hCA II izoenzimi standart inhibitörü olan Asetazolamid ve antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



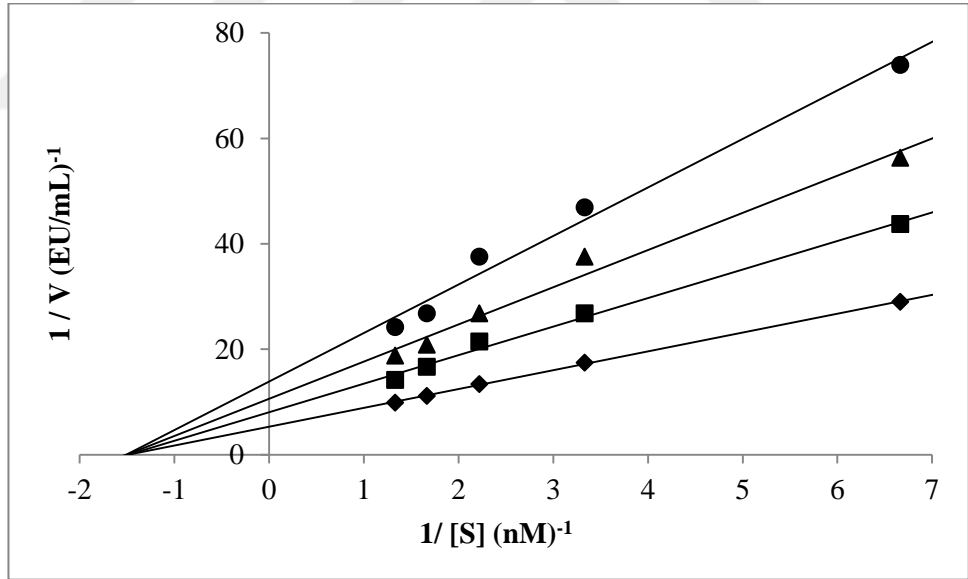
Şekil 4.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği



Şekil 4.9. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği



Şekil 4.11. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

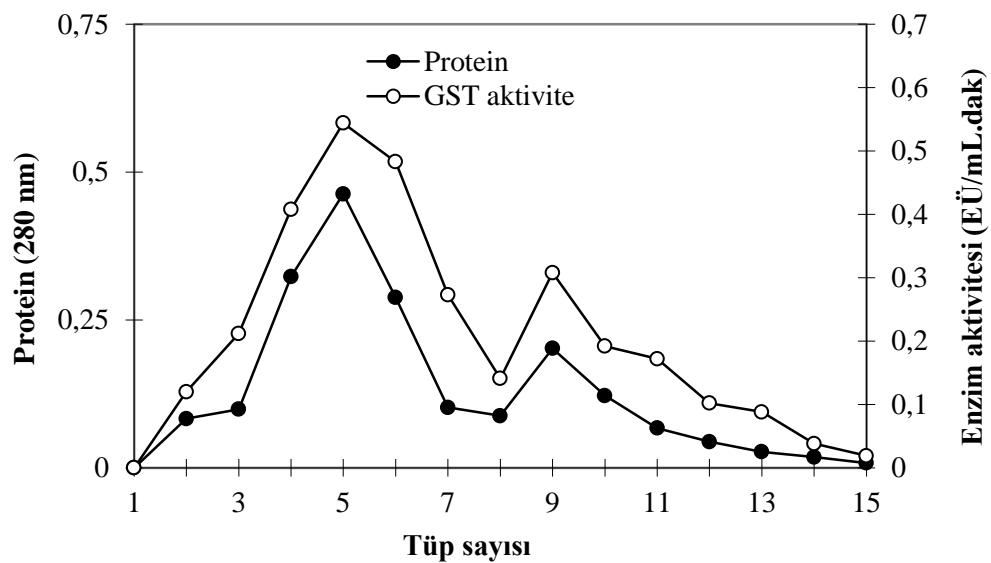
Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetolun ve Asetazolamid Ki değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	R ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Olivetol	118,66	0,9863	178,27±35,94	Yarışmasız
Asetazolamid	563,41	0,9789	553,12±73,44	Yarışmasız

4.2. Glutatyon S-transferaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.2.1. Glutatyon S-transferaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

İnsan eritrositlerinden Glutatyon S-transferaz enzimi saflaştırılması yapıldı. Kolon bölüm 3.8’de açıklandığı gibi uygun tamponla yıkandı ve enzim gradientli elüsyon yapılarak 24,33 EÜ/mg spesifik aktiviteyle %40,45 verimle 176,30 kat elde edildi. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.4’de gösterildi. Elüe edilen elüatlardaki aktivite değerleri ölçülerek Şekil 4.12’deki elüsyon grafiği çizildi.



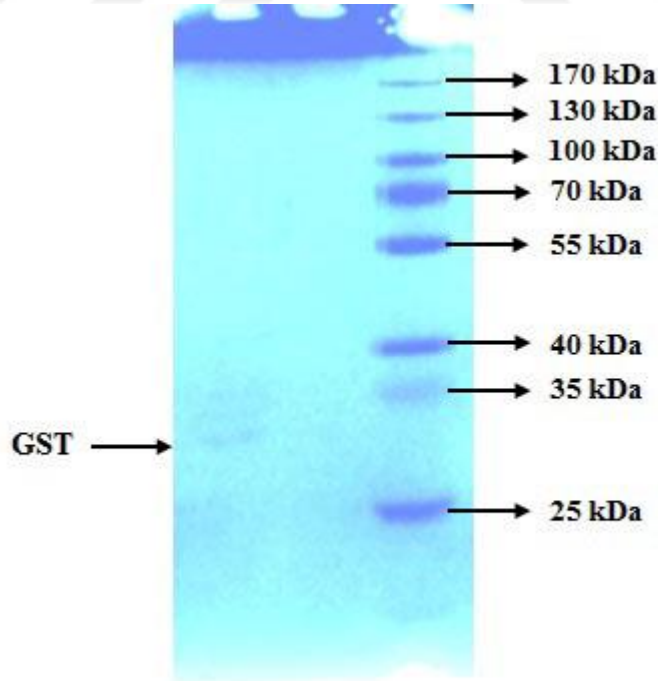
Şekil 4.12. İnsan eritrositlerinden elde edilen GST enziminin Glutatyon Agaroz afinite kolonundan elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği

Çizelge 4.4. İnsan kanından saflaştırma GST enziminin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktive (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam hacim(mL)	Toplam aktivite (EÜ)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,203	1,462	16	3,248	23,392	0,138	100	1
Afinite Kromatografisi	0,292	0,012	4,5	1,314	0,054	24,33	40,45	176,30

4.2.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

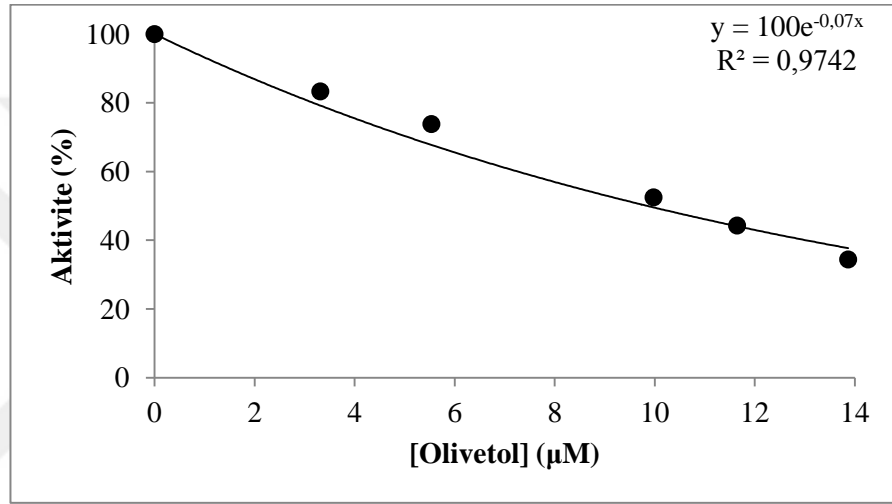
Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan GST enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamid jel elektroforezine insandan saflaştırılan enzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.13).



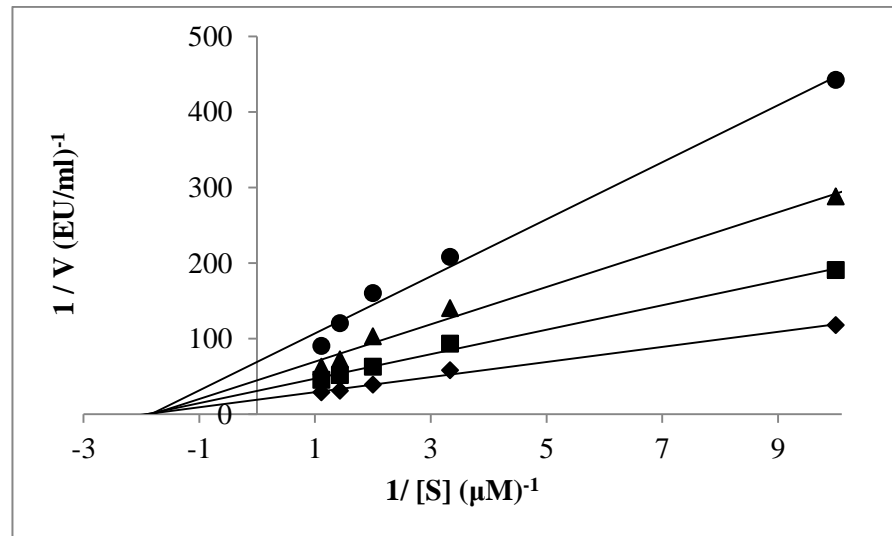
Şekil 4.13. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Glutatyon S-transferaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

4.2.3. GST enziminin aktivitesi üzerinde Olivetolun inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

Doygun substrat derişiminde insan eritrositinden saflaştirılan GST enzimi antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı. Aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.14. GST enziminin farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[olivetol] grafiği



Şekil 4.15. GST enzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

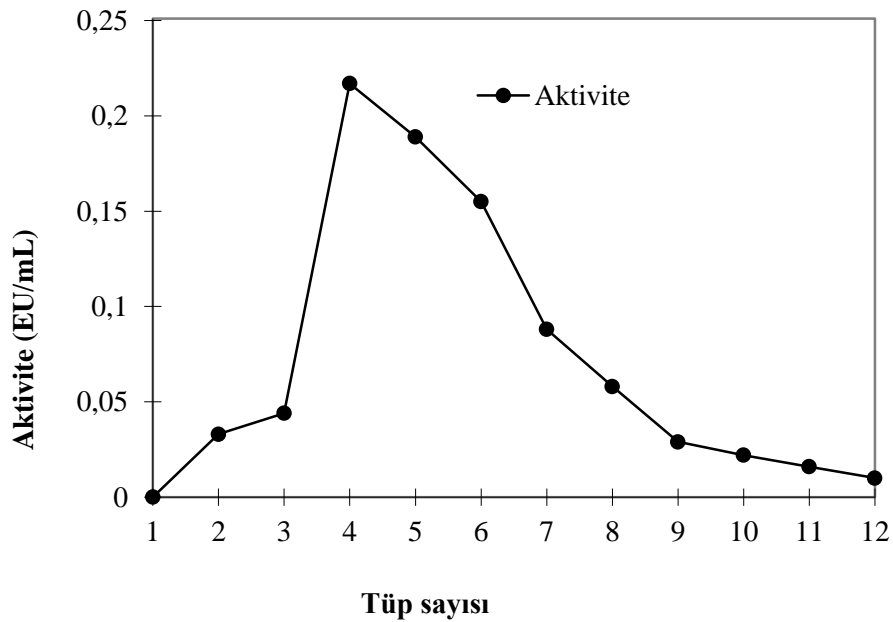
Çizelge 4.5. GST enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun IC_{50} ve K_i değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50} (μ M)	R^2	Ortalama K_i (μ M)	İnhibisyon türü
Olivetol	9,90	0,974	$6,02 \pm 1,15$	Yarışmasız

4.3. Glutatyon redüktaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.3.1. Glutatyon redüktaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

İnsan eritrositlerinden Glutatyon redüktaz enzimi saflaştırılması yapıldı. Kolon bölüm 3.9.'da açıklandığı gibi uygun tamponla yıkandı ve enzim gradientli elüsyon yapılarak 1,85 EÜ/mg spesifik aktiviteyle %16,31 verimle 185 kat elde edildi. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.6'da gösterildi. Elüe edilen elüatlardaki aktivite değerleri ölçülerek Şekil 4.16'daki elüsyon grafiği çizildi.



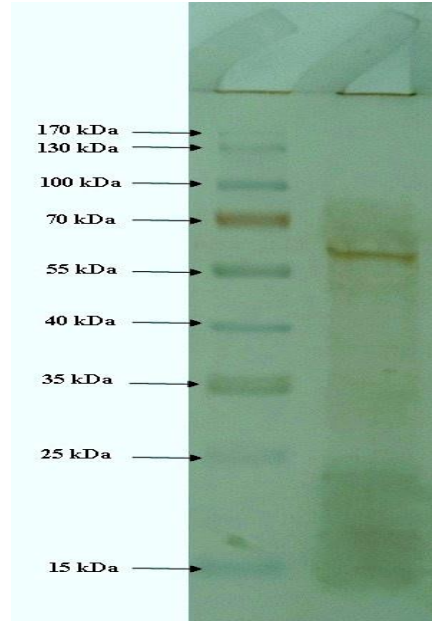
Şekil 4.16. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan GR enziminin Glutatyon Sefaroz-4B afinite kolonundan elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği

Çizelge 4.6. İnsan kanından saflaştırma GR enziminin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktive (EÜ/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam hacim(mL)	Toplam aktivite (EÜ)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,266	26	100	26,60	2600	0,010	100	1
Amonyüm sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0,220	20	50	11	1000	0,011	41,35	1,10
Afinite kromatografisi	0,483	0,26	9	4,34	2,34	1,85	16,31	185

4.3.2. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

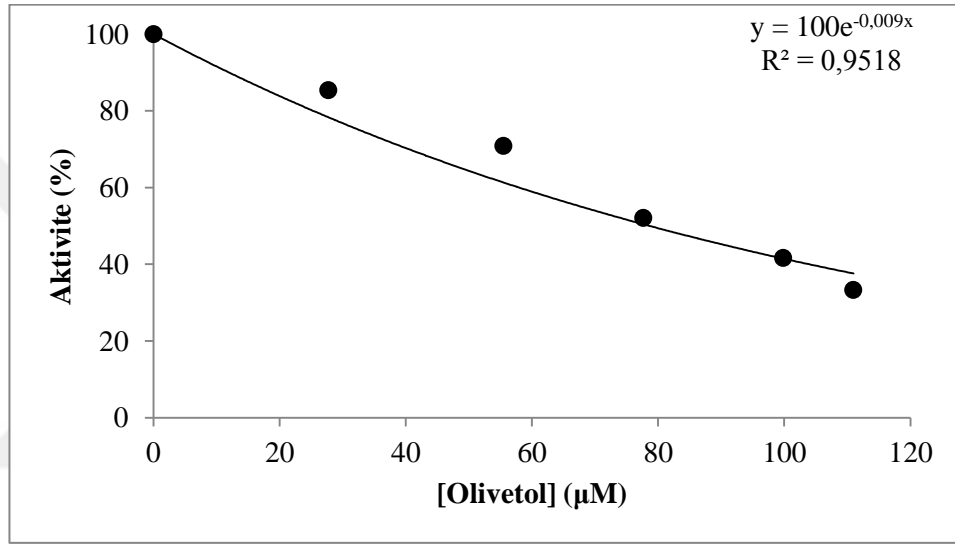
Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan GR enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamid jel elektroforezine insandan saflaştırılan enzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.17).



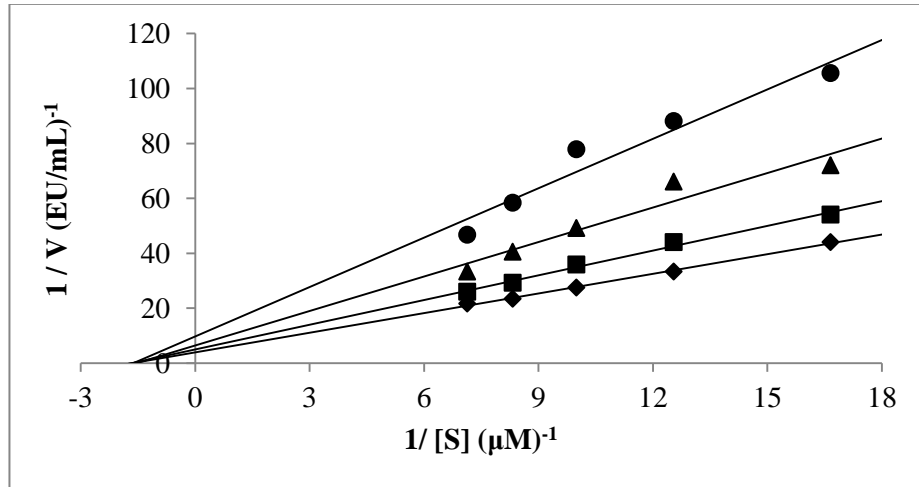
Şekil 4.17. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan Glutasyon redüktaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

4.3.3. GR enziminin aktivitesi üzerinde olivetolun inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

Doygun substrat derişiminde insan eritrositinden saflaştırılan GR enzimi antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı. Aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.18. GR enziminin farklı olivetolun konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Olivetol] grafiği



Şekil 4.19. GR enzimi kullanılarak farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

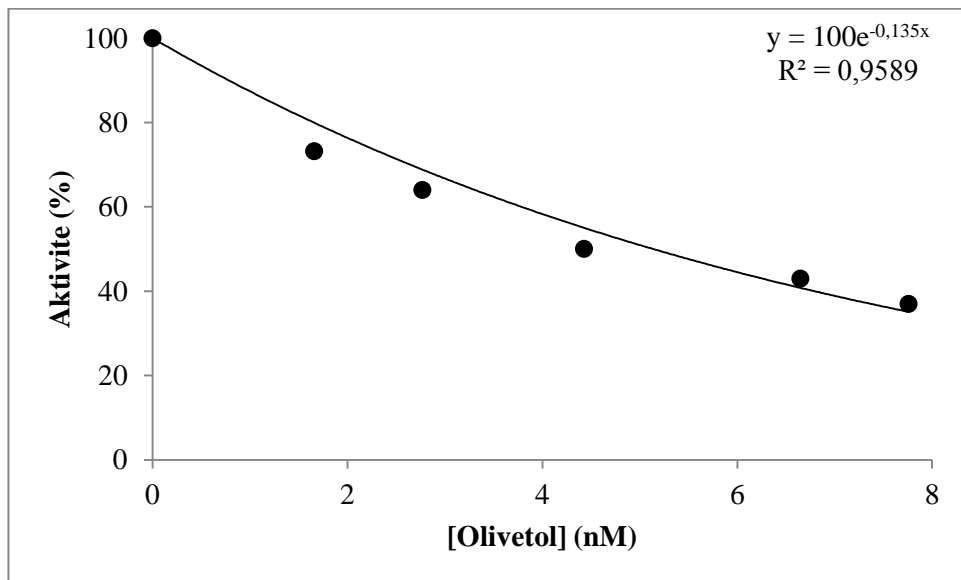
Çizelge 4.7. GR enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun IC_{50} ve K_i değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50} (μM)	R^2	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon türü
Olivetol	77,02	0,951	$97 \pm 22,77$	Yarışmasız

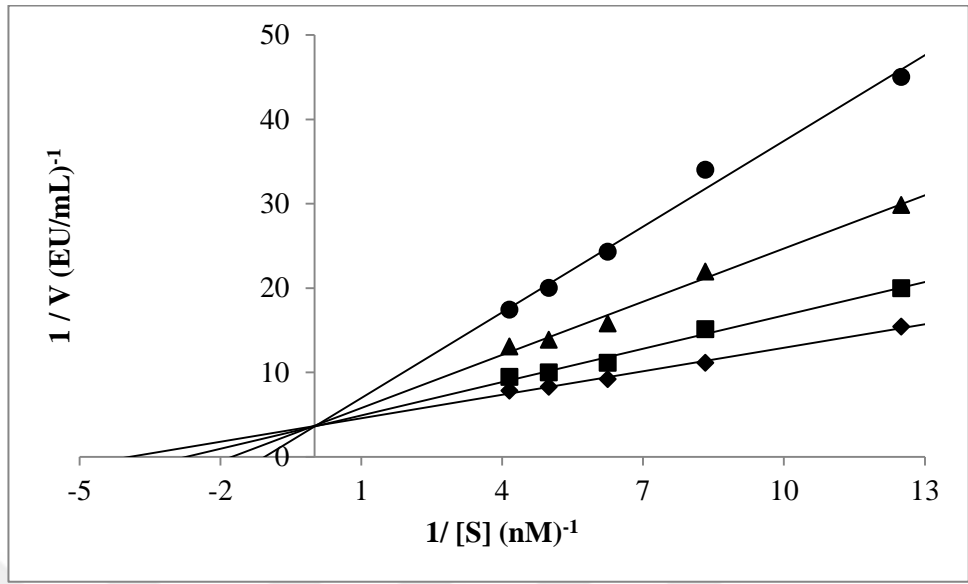
4.4. AChE ve BChE Enzim Aktiviteleri Üzerine Olivetolün Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları

4.4.1. AChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin ile ilgili sonuçlar

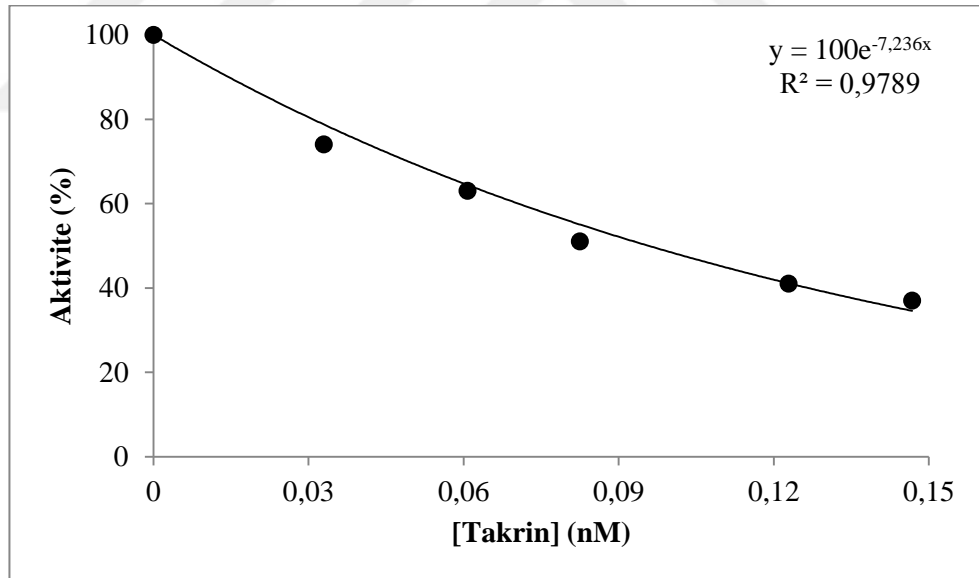
Doygun substrat derişiminde AChE enziminin standart inhibitörü olan Takrin ve antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



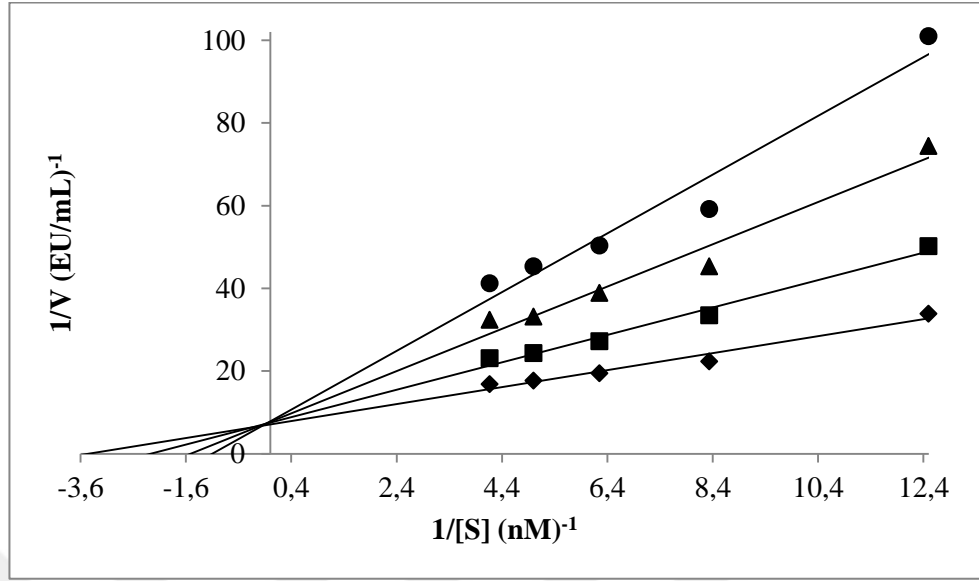
Şekil 4.20. AChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği



Şekil 4.21. AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.22. AChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği



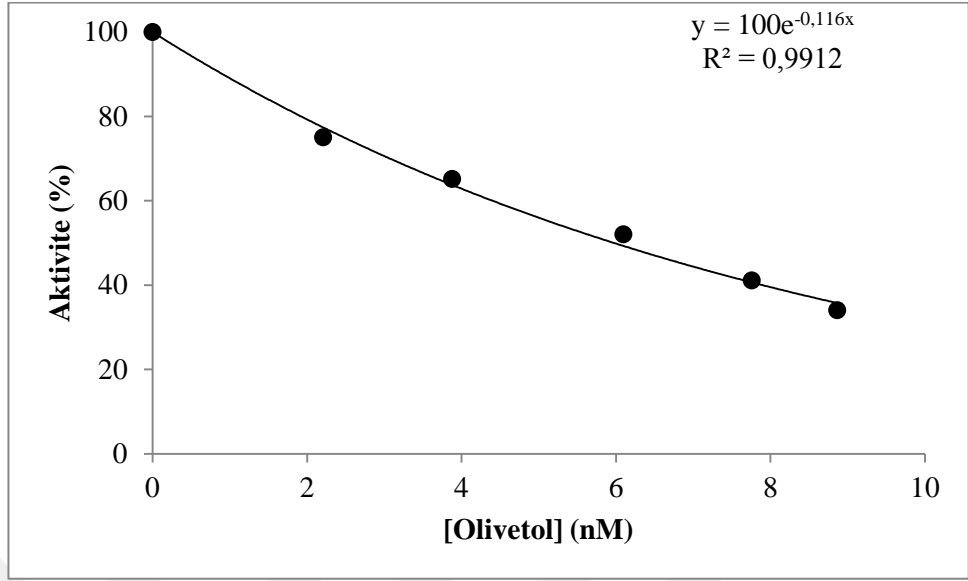
Şekil 4.23. AChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. AChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve Takrin K_i değeri ve inhibisyon türü

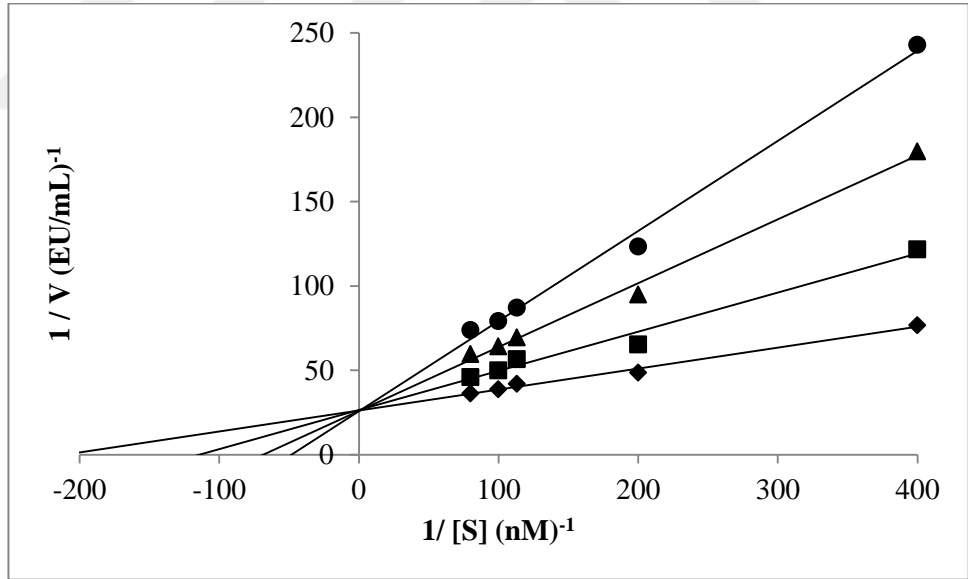
İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	R ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Olivetol	5,13	0,958	3,40±0,34	Yarışmalı
Takrin	95,77	0,978	65,92±2,68	Yarışmalı

4.4.2. BChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin ile ilgili sonuçlar

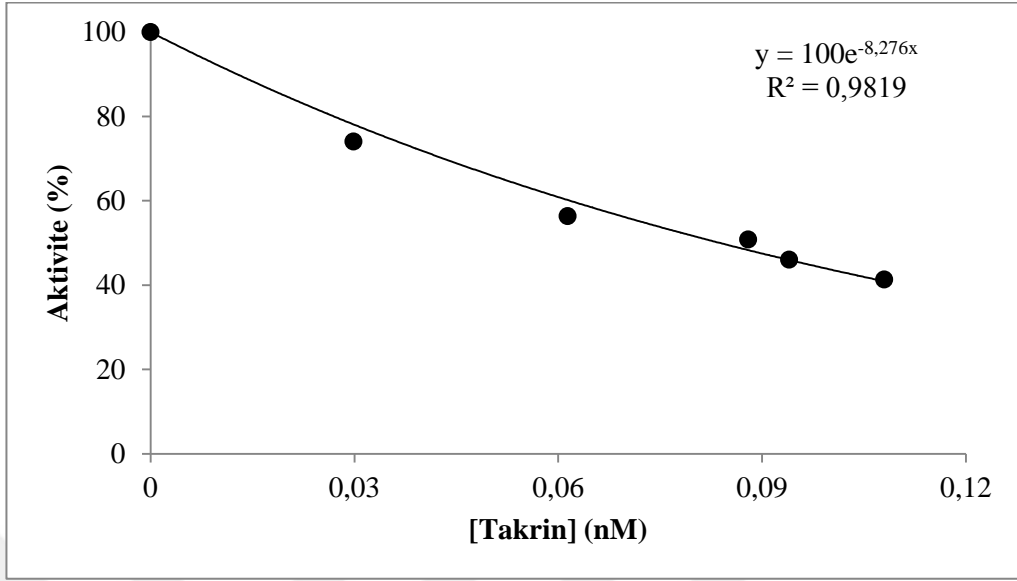
Doygun substrat derişiminde BChE enziminin standart inhibitörü olan Takrin ve antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için Aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



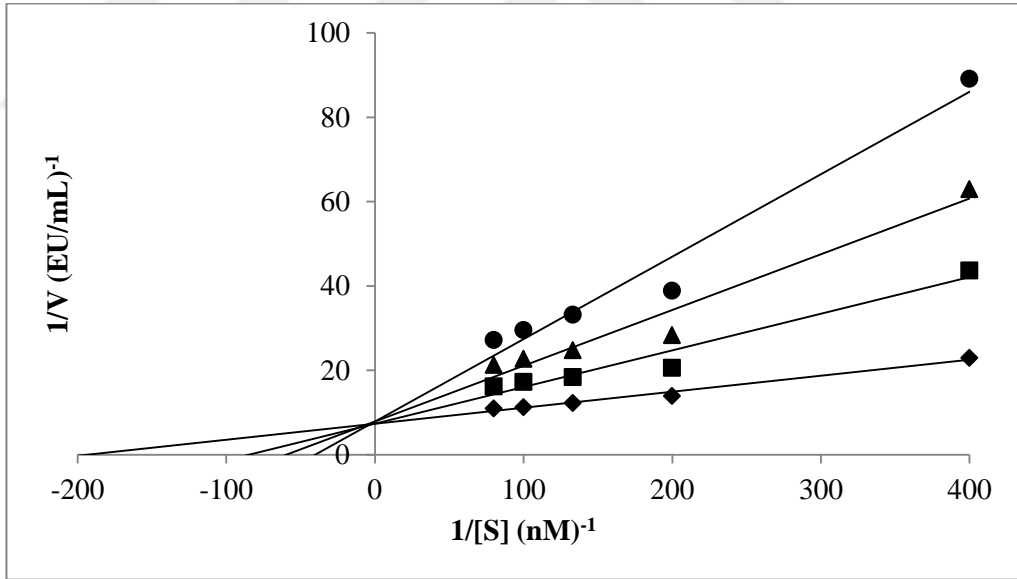
Şekil 4.24. BChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği



Şekil 4.25. BChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.26. BChE enzim aktivitesinde çalışılan farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Takrin] grafiği



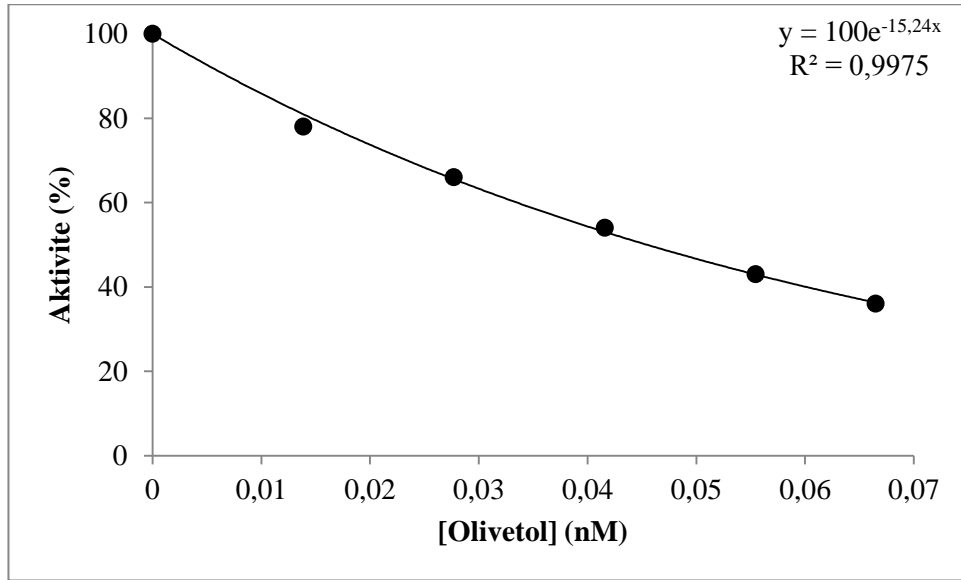
Şekil 4.27. BChE enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.9. BChE enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetol ve takrin K_i değeri ve inhibisyon türü

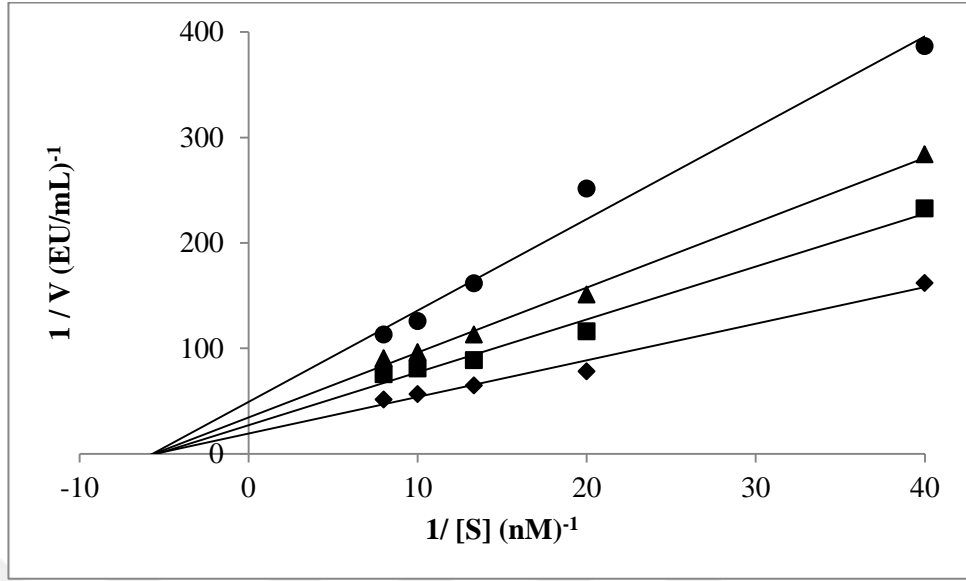
İnhibitör	IC_{50} (nM)	R^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Olivetol	6,01	0,991	$2,73 \pm 0,18$	Yarışmalı
Takrin	83,73	0,981	$30,36 \pm 8,08$	Yarışmalı

4.5. α -Glikozidaz Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Olivetol İle İlgili Sonuçlar

Doygun substrat derişiminde α -Glikozidaz enziminin üzerine antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için Aktivite(%)-[Olivetol] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.28. α -Glikozidaz enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği



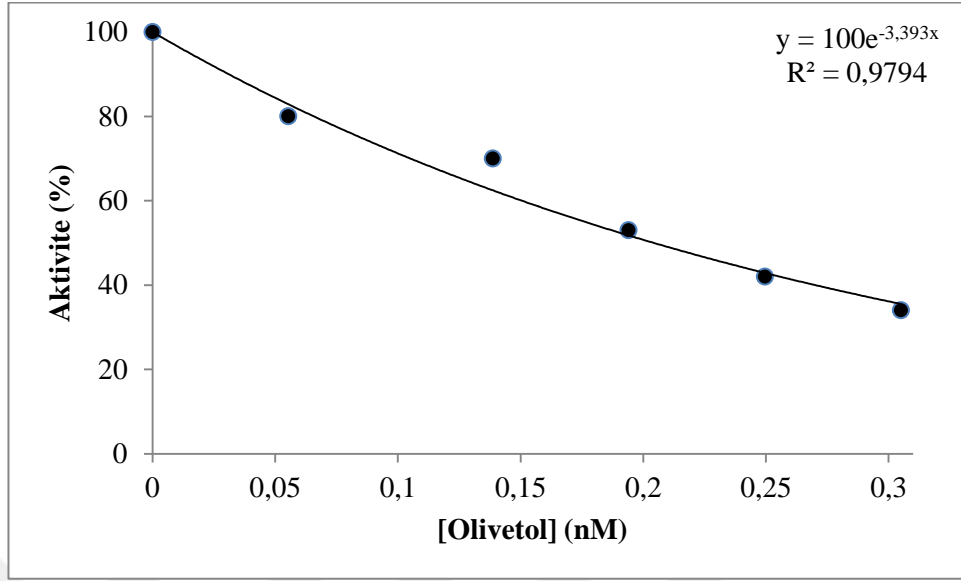
Şekil 4.29. α -Glikozidaz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.10. α -Glikozidaz enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50} (nM)	R^2	K_i Ortalama (nM)	İnhibisyon türü
Olivetol	45,47	0,997	41,85±9,38	Yarışmasız

4.6. α -Amilaz Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Olivetol İle İlgili IC_{50} Sonucu

α -Amilaz enziminin üzerine antioksidan bir madde olan olivetol ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için Aktivite(%)-[Olivetol] grafiği çizildi ve değeri hesaplandı.



Şekil 4.30. α -Amilaz enzim aktivitesinde çalışılan farklı olivetol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Olivetol] grafiği

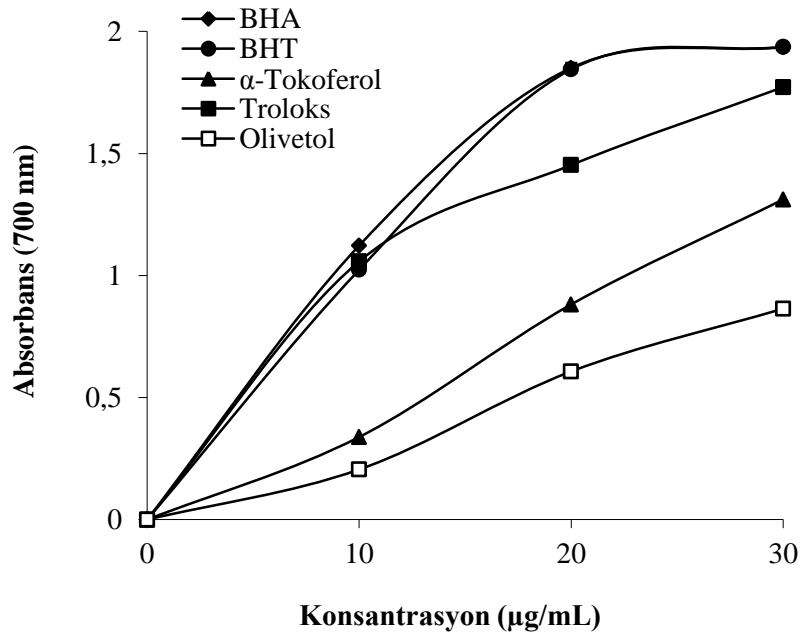
Çizelge 4.11. α -Amilaz enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un IC_{50} ve değeri

İnhibitör	IC_{50} (nM)	R^2
Olivetol	204,24	0,979

4.7. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.7.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktiviteleri sayesinde farklı tonlarda yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006a). Çalışmada kullanılan olivetol indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Olivetol indirgeme potansiyel farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μ g/mL) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.31).



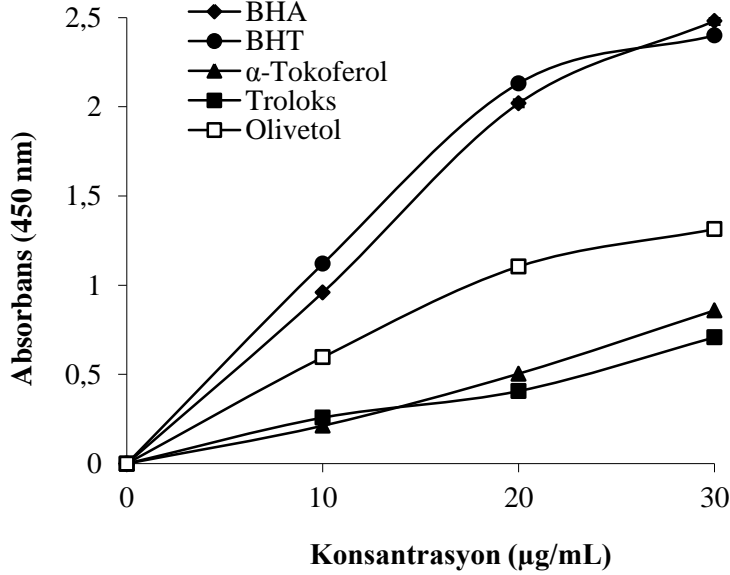
Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) olivetol'un ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Olivetol'un ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.31) her bir standart antioksidan ve olivetol için 30 µg/mL'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.12'de verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda olivetol ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları $BHT > BHA > Troloks > \alpha$ -Tokoferol $>$ olivetol şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.12'de gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

4.7.2. Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular

Olivetol'un kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Olivetol kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 µg/mL) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.32). Olivetol çözeltilisinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.32) her bir standart

antioksidan, olivetol için 30 µg/mL'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.12'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.



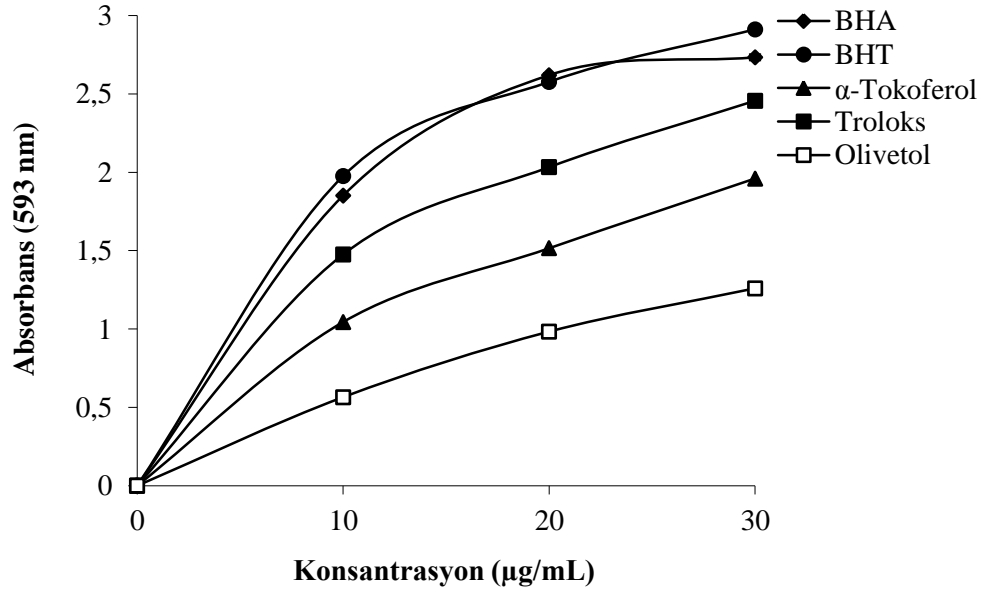
Şekil 4.32. Olivetol'un farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda olivetol ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında $\text{BHA} > \text{BHT} > \text{Olivetol} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{Trolox}$ şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi (Çizelge 4.12).

4.7.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottür. Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{2+}) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluştur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans gösterir. Olivetol'un FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.33). Ayrıca olivetol'un standart

antioksidanlarla mukayesesi yapıldı ve BHT > BHA > Troloks > α -Tokoferol > Olivetol şeklinde bir sıralama gözlemlendi. Çizelge 4.12’de ise 30 $\mu\text{g/mL}$ ’deki absorbanlarının mukayese edildi.



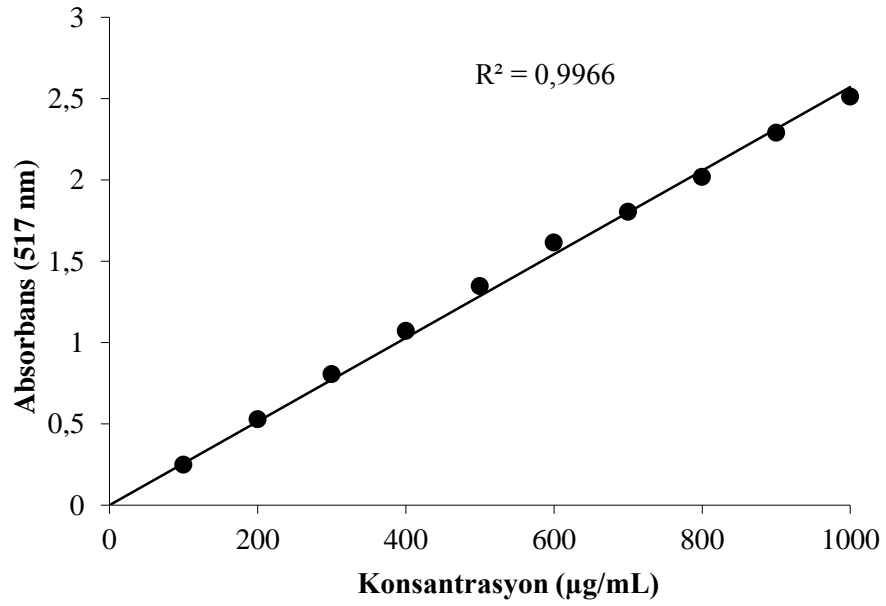
Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki olivetol’un FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Çizelge 4.12. 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda olivetol’un çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	Fe^{3+} İndirgeme Metodu		Kuprak Metodu		FRAP Metodu	
	λ_{700}	R^2	λ_{450}	R^2	λ_{593}	R^2
	BHA	1,936±0,013	0,9753	2,481±0,020	0,9584	2,734±0,017
BHT	1,947±0,012	0,9827	2,399±0,081	0,9273	2,912±0,012	0,9680
α-Tokoferol	1,312±0,017	0,9340	0,859±0,019	0,9848	1,960±0,001	0,9942
Troloks	1,772±0,013	0,9922	0,708±0,005	0,9960	2,456±0,015	0,9570
Olivetol	0,864±0,012	0,9873	1,314±0,044	0,9682	1,260±0,005	0,9832

4.7.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Olivetol ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9966) (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. DPPH radikali giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

DPPH radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH radikali miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

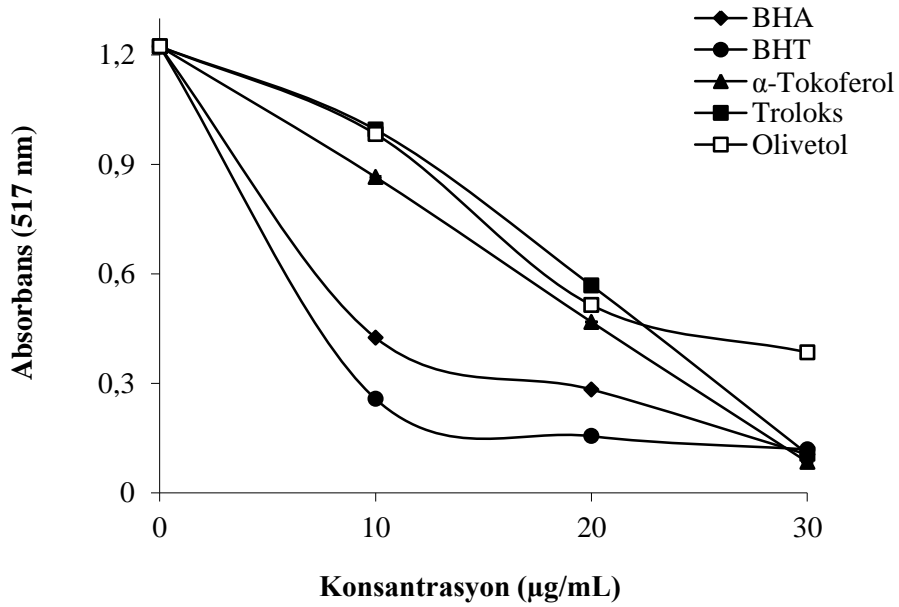
$$(\text{Absorbans } \lambda_{517}) = 0,0026 \times [\text{DPPH}]$$

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{DPPH} \cdot \text{giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$

Burada λ_{517-N} DPPH radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, λ_{517-K} ise sadece DPPH radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks kullanıldı.

Olivetol çözeltisinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.35’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

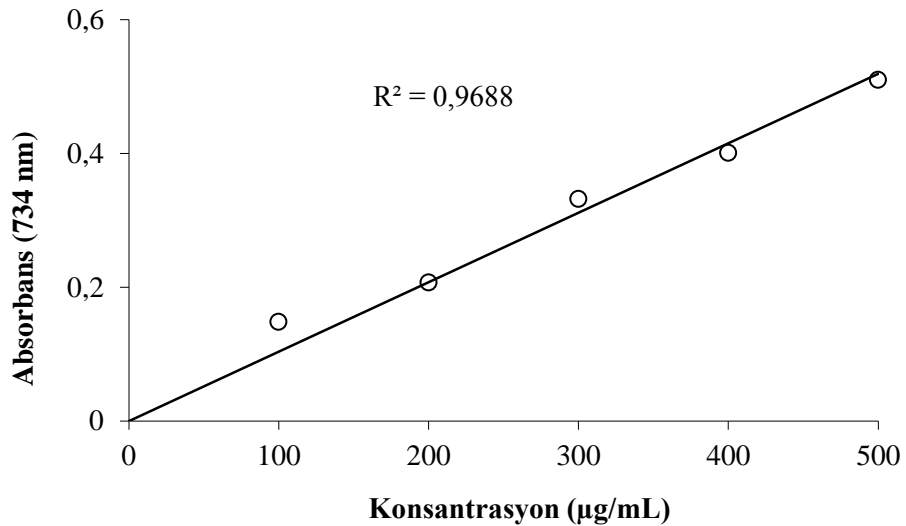


Şekil 4.35. Olivetol’un farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Olivetol çözeltisinin DPPH radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.35) her bir standart, olivetol için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.13). Olivetol ve kullanılan standart antioksidan moleküllersırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi $BHT < BHA < \alpha$ -Tokoferol < Troloks < Olivetol şeklindedir.

4.7.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS⁺ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstraların veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Gülçin *et al.* 2007b). Bunun için öncelikle ABTS'den ABTS⁺'nin oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH: 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiliye 2,45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorban değerleri 1.411±0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi. Bu aşamadan sonra Olivetol'un çözeltilisinde çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS⁺ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2:0,9688$) (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS⁺ için hazırlanan standart grafik

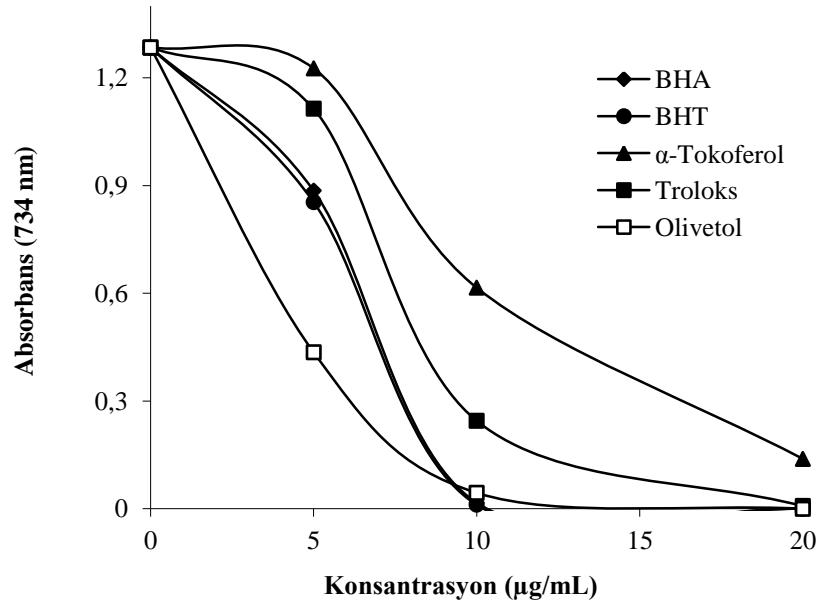
ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan ABTS⁺ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda da verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } \lambda_{734}) = 0,001 \times [\text{ABTS}^{+\cdot}]$$

ABTS⁺ giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

$$\text{ABTS}^{+\cdot} \text{ Giderme (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{734\text{-N}}}{\lambda_{734\text{-K}}} \right) \times 100$$

Burada $\lambda_{734\text{-N}}$ ABTS⁺ çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $\lambda_{734\text{-K}}$ ise sadece ABTS⁺ çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.37).



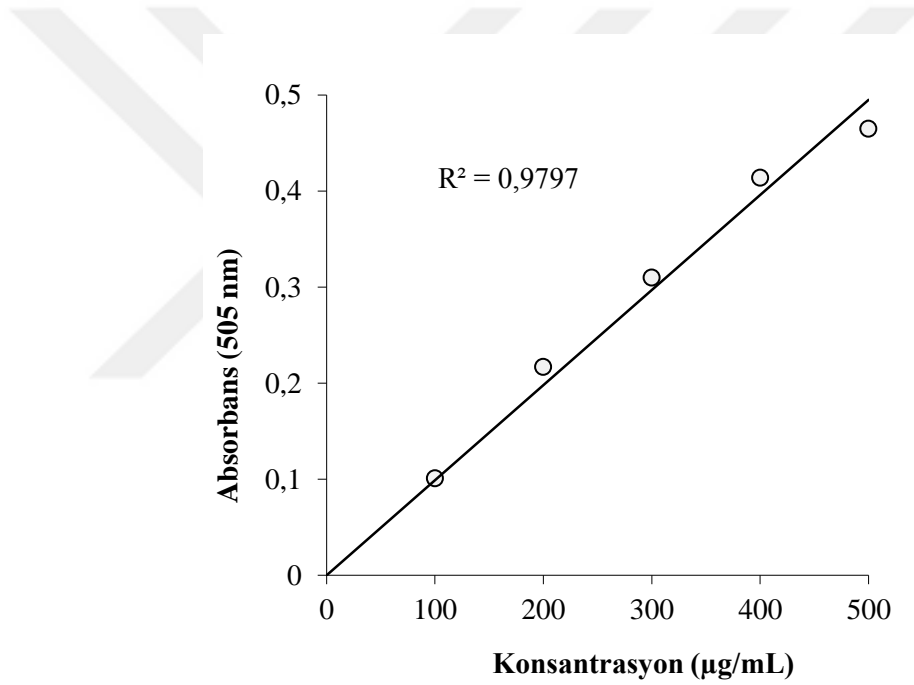
Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlardaki olivetol'un (10-30 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Olivetol çözeltisinin ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.37) her standart ve olivetol için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.13). Olivetol'un ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS⁺ giderme aktivitesi sergilediler: Olivetol < BHT < BHA < Troloks < α -Tokoferol

şeklindedir.

4.7.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan olivetol çözeltisi, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DMPD^{•+} giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (Şekil 4.38). DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD^{•+} miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.



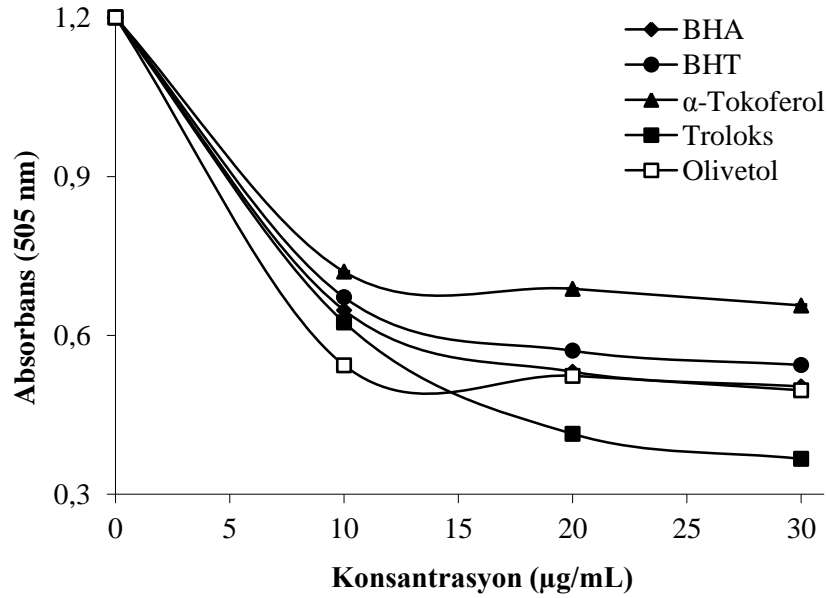
Şekil 4.38. DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

$$(\text{Absorbans } \lambda_{505}) = 0,0011 \times [\text{DMPD}^{\bullet+}]$$

DMPD^{•+} miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

$$[\text{DMPD}^{\bullet+}] \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{505-N}}{\lambda_{505-K}} \right) \times 100$$

Burada λ_{505-N} , $DMPD^{+}$ çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, λ_{505-K} ise sadece $DMPD^{+}$ çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA ve Troloks kullanıldı (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Olivetol'un (10-30 µg/mL) konsantrasyonundaki $DMPD^{+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, troloks ve α -tokoferol ile karşılaştırması

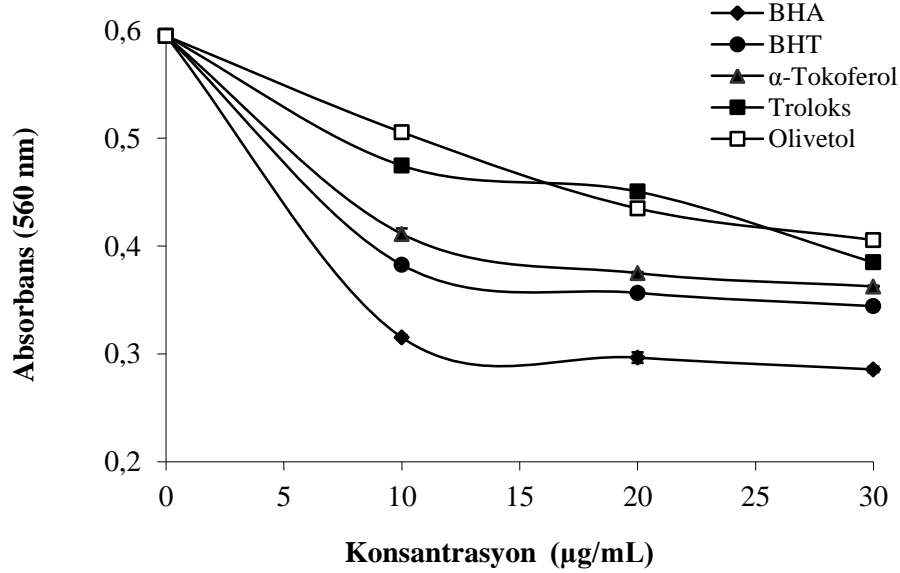
Olivetol çözeltisinin $DMPD^{+}$ radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.39) kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde $DMPD^{+}$ giderme aktivitesi Troloks < Olivetol < BHA < BHT < α -Tokoferol'dur (Çizelge 4.13).

4.7.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Olivetol'un süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi riboflavin / metiyonin / ışık metoduna göre yapıldı. Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Süperoksit giderme aktivitesi (\%)} = \left(\frac{\lambda_{560-K} - \lambda_{560-N}}{\lambda_{560-K}} \right) \times 100$$

Formülde verilen λ_{560-K} kontrol numunesinin absorbans değeridir. λ_{560-N} ise çalışmada kullanılan antioksidan numunelerin absorbans değeridir (Gülçin *et al.* 2004c).



Şekil 4.40. Olivetol'un çözeltisinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Olivetol ve kullanılan standart antioksidanlar sırasıyla şu şekilde süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi sergilediler: BHA < BHT < α -Tokoferol < Troloks < Olivetol. (Şekil 4.40)

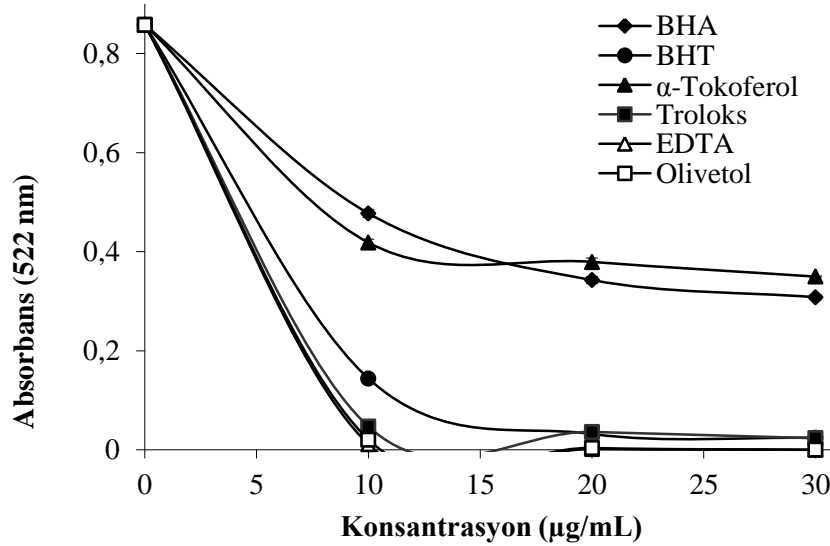
4.7.8. Ferrozin reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi bulguları

Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığının göstergesidir (Şekil 4.41). Şelatlanan metal iyonu miktarı aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı (Çizelge 4.13).

$$\text{Ferröz iyonları (Fe}^{2+}\text{) şelatlama aktivitesi(\%)} = \left(\frac{\lambda_{562-K} - \lambda_{562-N}}{\lambda_{562-K}} \right) \times 100$$

Yukarıdaki eşitlikte verilen λ_{562-K} değeri ortamda sadece kompleks oluşturan

maddelerolan ferrozün ve Fe^{2+} iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbanans değeri. λ_{562-N} ise su veya etanol ekstratlarının ya da çalışmada kullanılan standart antioksidanların absorbanans değeri (Gülçin *et al.* 2004e).



Şekil 4.41. Olivetol farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) ferröz (Fe^{2+}) iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Olivetol (30 µg/mL) ve standart antioksidan moleküller sırasıyla ferröziyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama kapasiteleri $EDTA < Olivetol < Troloks < BHT < BHA < \alpha$ -Tokoferol şeklinde olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.13. Olivetol çözeltilerinin DPPH, $ABTS^{+}$, $DMPD^{+}$ ve O_2^{-} radikali giderme ve ferrozün metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Antioksidanlar	DPPH· Giderme	$ABTS^{+}$ Giderme	$DMPD^{+}$ Giderme	O_2^{-} Giderme	Metal şelatlama
BHA	8,55	2,75	19,82	23,11	17,77
BHT	7,61	2,06	21,65	31,50	5,11
α-Tokoferol	9,36	6,96	27,72	34,65	19,25
Troloks	10,66	3,01	15,40	46,22	4,84
EDTA	-	-	-	-	2,07
Olivetol	17,77	1,94	19,25	53,30	2,83

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, insan eritrositinden afinite kromatografi tekniği ile karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II), glutatyon s-transferaz ve glutatyon redüktaz enzimleri ayrı ayrı saflaştırılarak, Olivetol'un her iki izoenzim ve diğer iki enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Ayrıca ticari olarak alınan asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, ve α -amilaz ile α -glukozidaz üzerindeki inhibisyon çalışmaları da yapıldı.

Öncelikle CA enzimi birçok dokuda başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. CA enzimi pH düzenleyici bir enzim olarak bilinmektedir. Oldukça hızlı bir reaksiyon olan, karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) dönüşümlü reaksiyonunu katalizler (Gülçin *et al.* 2004f). Karbonik anhidraz bu reaksiyonu katalizlediğinde reaksiyon hızını arttırarak saniyede 10^4 - 10^6 reaksiyon hızına kadar ulaşmasını sağlar (Çoban *et al.* 2007). Bu durum enzimlerin olağanüstü katalizleme gücünü bir anlamda ortaya koymuş olur.

CA enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanında ayrıca birçok dokuda da H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynar. Bu şekilde vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında rolü olduğu ortaya çıkartılmıştır. Bu dokulara örnek olarak böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi verilebilir. CA son yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, histokimyasal metotlarla kaslarda, tükürük bezleri, prostat, sinir miyelin kılıfı, pankreas, beyin ve endometrium dokularından, çeşitli bakteriler ve bitkisel kaynaklardan saflaştırılmış, karakterize edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

CA enzim familyası, biyofiziksel çalışmalardan, protein ligant bağlanma modeli açısından ve inhibisyon gibi birçok sebeplerden dolayı oldukça ilgi çekicidir. Bütün bunların sebepleri aşağıdaki gibi sayılabilir (Akıncıoğlu *et al.* 2014).

1. CA'nın monomerik bir enzim olması,
2. Moleküler kütlesi 30 kDa olarak ne çok büyük ne de çok küçük olması,
3. CA proteinin tek bir polipeptit zincirine sahip olması,
4. CA I ve CA II izoenzimlerinin en yaygın ca formlarının olması,
5. Polipeptit zincirinde disülfid bağının olmaması
6. Polipeptit zincirinde şeker ve fosfat gruplarının olmaması,
7. Özellikle CA II izoenziminin hazır olarak satılabilmesi,
8. Diğer enzimlere nisbeten daha kolay bir saflaştırma prosedürüne sahip olması,
9. Çoğu CA izoenzimlerinin amino asit sekanslarının biliniyor olması,
10. X-Ray difraksiyon analizleriyle mevcut 16 izoenziminin 13 tanesinin yapılarının ve aktif bölge geometrilerinin biliniyor olması,
11. Sadece CO₂ hidraz/dehidrataz aktivitesine sahip olması değil aynı zamanda çok yüksek bir turnover sayısına sahip karboksilik asit esterleri, fosforik asit esterleri ve hatta sülfat esterleri üzerinde de kuvvetli bir esteraz aktivitesine sahip olması (Innocenti *et al.* 2010a; Ekinci *et al.* 2012a; 2012b),
12. İnhibitörler tarafından inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve Zn⁺² iyonu ile inhibitörlerin bağlanma modelinin iyi bir şekilde karakterize edilmiş olması (Supuran 2008; Alterio *et al.* 2012; Alterio *et al.* 2012; Akıncıoğlu *et al.* 2014).

Saflaştırma işlemi yapılırken ilk önce afinite kromatografisinde kullanılan Sefaroz-4B-L Tirozin-sülfanilamid afinite jeli üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce matriks olarak seçilen Sefaroz-4B, CNBr ile aktifleştirildi. Daha sonra CNBr ile aktifleştirilen jele L-Tirozin uzantı kolu takıldı. Sonra, sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendirildi. Sülfanilamid enzimin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligant olarak kullanıldı. L-Tirozin ise enzimin matriksle etkileşimini engellemek ve ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamak için uzantı kolu olarak seçildi (Cuatrecases 1970). Jele tutunan hCA I ve II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1,0 M NaCl (pH: 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-PAGE uygulandı. HCA I ve II için tek bant gözlemlendi (Şekil 4.3).

Enzim aktivitesi tayini için ise çalışmamızda iki yöntem kullanıldı.

1. Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂ hidrataz aktivitesidir (Maren *et al.*1967). Bu yöntemle CO₂'nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃'ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu aktivite, hCA izoenzimlerinin fizyolojik fonksiyonu olduğundan, Sinefrin ve Fenilefrin'in hCA izoenzimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla çalışmalarımızda kullanılmıştır.
2. Kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından modifiye edilen bu yöntemin esası, CA'nın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (Armstrong *et al.* 1966). CA enzimi, *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Bu yöntemin seçiliş sebebi Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassas olmasıdır. *p*-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce az miktarda asetonda çözüldü, daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak asetonu seçilmesinin sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967).

hCAI'in spesifik aktivitesi 33658,81 EU/mg olup %26,75 verimle saflaştırıldı. Hca II izoenzimi ise spesifik aktivitesi 90573,00 EU/mg olup, %15,74 verimle saflaştırıldı (Çizelge 4.1).

Afinite kromatografisi ile CA izoenzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein miktarları 280 nm de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayinleri ise Coomassie-Blue yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün yanı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu

faktörlerinin çok olmaması ve protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Ayrıca bu yöntemde hassasiyet 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Aktivite ölçüm pH'sı hCA I ve II izoenzimleri için 7,4 olarak alındı. Bunun sebebi ise hCA I ile II izoenzimlerinin bulunduğu ortam olan eritrositlerin pH'sının 7,4 olmasıdır.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisinin belirlenmesinde IC₅₀ değerleri kullanılmaktadır. Bunun için taze insan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetol, bu izoenzimlerinin doğal inhibitörü olan Asetazolamid'in K_i ve IC₅₀ değerindeki benzerlikten dolayı inhibitör olarak kullanılabilir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Olivetolün hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisine ait IC₅₀ ve ortalama K_i değerleri

İzoenzimler	Olivetol		Asetazolamid	
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)
hCA I	90,87	88,05±11,15	458,94	441,86±39,1
hCA II	118,66	178,27±35,9	563,41	553,12±73,4

Fenolik asitlerinin hCA izoenzimlerinin doğal inhibitörü olduğu bilinmektedir. Ayrıca glukoma hastalığından dolayı hCA II izoenzimi üzerine yoğun bir şekilde inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu sebeple doğal kaynaklı fenolik asitlerden olan Olivetol'un glukoma hastalığı için geliştirilecek olan yeni bir ilaın dizaynında kullanılabilir. Fenollerin ve fenolik asitlerin, hCA inhibitörleri olarak araştırılmasının temel nedeni, basit fenollerin hCA'nın asıl izoformu yani hCA II'yi başta olmak üzere substrat olarak CO₂'e karşı tek yarışmalı inhibitör olduğunun ispatlanmasından ileri gelmektedir.

Bu çalışma kapsamında, CA izoenzimlerinin yanı sıra GST enzimide insan eritrositlerinden saflaştırılarak Olivetolün inhibisyon etkisi çalışıldı. Günümüzde sağlıklı ve kaliteli bir ömür sürdürmenin gerekliliği oldukça önemlidir. Özellikle son yıllarda aşırı nüfus artışı, hızlı kentleşme ve sanayinin gelişmesine bağlı olarak çevre

kirliliği artmaktadır. Bu durum doğadaki tüm canlıların sağlığını tehdit etmektedir. Bu tehditlere karşı vücudun direncini artırıcı besinlerin kullanımı gerekmektedir. Bununla birlikte canlı organizmalarda görev alan enzimlerin işlevleri sağlıklı ve sürdürülebilir bir yaşam için çok önem kazanmaktadır. Bu enzimlerin en önemlilerinden biri detoksifikasyondan sorumlu olan GST enzimidir.

Bu çalışmada zehirsizleştirme reaksiyonları için son derece önemli olan GST enziminin insan eritrositlerinden afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik olan Olivetolun enzim aktivitesi üzerine etkileri ve antioksidan kapasitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla insan eritrositinden hazırlanan homojenat uygun tampon içerisine alındıktan sonra 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj ile çöktürülen hücre atıkları atılarak sznt dengelenen Glutasyon agaroz afinite kolonuna yüklenerek enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

GST'lerin saflaştırılma işleminde Glutasyon-agaroz afinite kolon ligandı olan glutasyona GST'nin afinitesinin yüksek olması nedeniyle etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Saflaştırma işleminde sadece bir kromatografi tekniğinin kullanılmış olması, saflaştırma süresinin az olması ve saflaştırma esnasında aktivite kaybının düşük olması gibi avantajlar sağlamaktadır. Bu saflaştırma prosedürü sayesinde GST enzimi çok kısa bir sürede 24,33 E/mg protein spesifik aktiviteyle, %40,45 verimle 176,30 kat saflaştırılmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada insan eritrositinden saflaştırılan GST enzimi aktivitesi zerine Olivetol fenolik bileşiğinin *in vitro* etkileri incelenmiştir. GST enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerini belirlemek için %Aktivite-[Olivetol] grafiği, K_i değerini belirlemek için ise Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Olivetolün IC₅₀ değerini 9,90 µM olarak bulunmuş K_i değerini ise 6,02±1,15 µM olarak hesaplanmıştır. Bu düşük K_i değerine bakılarak Olivetol fenolik bileşiğinin GST enzimini etkili bir şekilde inhibe ettiği söylenebilir. Ayrıca inhibisyon türünün de yarışmalı olduğu tespit edilmiştir (izelge 5.2).

Çizelge 5.2. GST enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetol'un IC₅₀ ve K_i değeri

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	R ²	Ortalama K _i (μM)	İnhibisyon türü
Olivetol	9,90	0,974	6,02±1,15	Yarışmasız

Bu çalışmada zehirsizleştirme reaksiyonları için son derece önemli ve diğer bir enzim olan glutatyon redüktaz ise insan eritrositlerinden afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırıldı ve Olivetolün ilgili enzim üzerine inhibisyon etkileride çalışılmıştır.

Antioksidant enzim glutatyon redüktaz (GR), çoğu organizmanın hücrel redoks metabolizmasında GSH indirgenmesinin düzenlenmesini katalizleyerek hayati bir rol oynar. GSH redoks homeostasisinde, deoksiribonükleotidlerin şekillendirilmesinde ayrıca peroksitlerin, 2-oksoaldehitlerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Oksidatif strese karşı dayanıksız hücreler ve ek olarak hızlı poliferasyon hücrelerinin canlılığı nisbeten GSH'ın rejenerasyonuna bağlıdır. Bu sebepten, potansiyel GR inhibitörleri antitümör ve antiparaziter ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynar (Karplus *et al.* 1988; Nordhoff *et al.* 1993; Boehme *et al.* 2000; Irmiler *et al.* 2002; Savvides *et al.* 2002; Becker *et al.* 2001, 2003).

Bu öneminden dolayı GR enzimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmış, bir çok kaynaktan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bazı kaynaklardan elde edilen enzimin amino asit dizilimi ve aktif bölgeleri belirlenmiştir (Douglas 1987; Krauth-Siegel *et al.* 1998; Becker *et al.* 2001). İnsan eritrositi, fare karaciğeri, bazı bitki ve bakteri hücrelerinden GR cDNA'ları elde edilmiş ve bazı biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır (Jiang *et al.* 1995; Tamura *et al.* 1997; Kelner and Montoya 2000).

İnsan eritrosit GR enzimi üzerine yapılan ilaç çalışmalarında antikanserojen ve antisitma ilacı olarak kullanılan quinolan halkası içeren nitro aromatik bileşiklerin enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Grallier *et al.* 2001).

Bu çalışmada insan eritrositlerinden GR enzimini saflaştırılarak üzerinde bazı ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri çalışıldı. İnsan eritrositlerinden GR enzimini saflaştırmak için önce hemolizat hazırlandı, literatür bilgilerine dayanılarak %30-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldıktan sonra numune 2',5'-ADP Sefaroz-4B afinite kolonuna tatbik edildi. En son işlem olarak 2',5'-ADP Sefaroz-4B afinite kolonu sadece GR'yi yakalamadığından enzimin tamamen saflaştırılabilmesi için Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak enzim saf halde elde edildi. Saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu belirlendi. Çalışma sonucunda insan eritrosit GR enzimini %16,31 verimle ve 185,0 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edildi.

Bu çalışmada insan eritrositinden saflaştırılan GR enzimi aktivitesi üzerine Olivetolün *in vitro* etkisi de incelenmiştir. Sonuçlar son yıllarda yapılan insan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılmasına göre benzer çıkmıştır (Eratin *et al.* 2000). GR enzimi için IC₅₀ değerini belirlemek için %Aktivite-[Olivetol] grafiği, Ki değerini belirlemek için ise Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Olivetolün IC₅₀ değeri 77,02 µM olarak bulunmuş Ki değeri ise 97±22,77 µM olarak bulunmuştur. Bu düşük Ki değerine bakılarak Olivetol fenolik bileşiğinin GR enzimini inhibe ettiği söylenebilir. Ayrıca inhibisyon türünde yarışmalı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. GR enziminin aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren olivetolun'un IC₅₀ ve K_i değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC ₅₀ (µM)	R ²	Ortalama K _i (µM)	İnhibisyon türü
Olivetol	77,02	0,951	97±22,77	Yarışmasız

Hastalıkların tedavisi konusunda son on yıl içerisinde kaydedilen önemli klinik başarılar Alzheimer Hastalığı (AH) konusundaki kolinerjik çalışmalarda da kendisini göstermiştir. AH'da kolinerjik transmisyonu güçlendirmeye yönelik bazı yaklaşımlar

üzerinde durulmuştur. Ancak şimdiye kadar bu hastalığın semptomları üzerinde etkinlik gösteren kolinerjik ajanlar, yalnızca asetilkolinesteraz inhibitörleridir (AChEIs). AChE'nin primer etki mekanizması ortama salınan asetilkolinin yıkımının önlenmesine ve böylece intrasınaptik asetilkolin miktarının artırılmasına dayanmaktadır. Bunlar içinde takrin ve fizostigmin içeren birinci kuşak kolinesteraz inhibitörlerinden, donepezil, rivastigmin, metrifonat gibi ikinci kuşak AChE'lerine kadar çok sayıda ilaç yer almaktadır. Hastalığın prognozuna ve klinik etkinliğe yönelik çalışmalarda oldukça fazla sayıda veri elde edilmiştir. Ancak Rivastigmin ve Donepezilin, AH'da izlenen bilişsel ve işlevsel yetilerdeki kaybın yavaşlatılmasında ya da durdurulmasındaki karşılaştırmalı etkileri konusunda çok az sayıda çalışma vardır.

Sinir uyarılarının nöron boyunca ilerlemesi sonucunda, aksonda asetilkolin salınır. Asetilkolin, istirahat halindeki hücrede sinir iletilisini yeniden oluşturmak için sinaptik boşluğu geçerek takip eden nörona bağlanır. Asetilkolini sinaptik aralıktan uzaklaştırmak için AChE enzimi nörotransmitteri hidroliz eder. Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer alır.

AH'nın başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı, daha düşük düzeylerde ACh salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için ya kişiye ACh benzeri maddeler verilmelidir ki bu mümkün görünmemektedir, ya da mevcut ACh seviyesinin daha da düşmesini önleyici tedbirlerin alınması gerekmektedir. Bunu sağlamak üzere kullanılan tedavilerin odağında ACh'i yıkan AChE enziminin baskılanması vardır. Bu baskılama olayı için çok sayıda AChE inhibitörü kullanılmaktadır. AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzey artışlarının, AH'nın erken evrelerindeki kognitif bozukluğu iyileştirebileceği düşünülmüştür. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle ACh'in sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan stratejidir (Taslimi *et al.* 2017a).

Memelilerde; bir tanesi seçici olarak ACh'i hidroliz eden AChE, diğeri ise ACh ve

diğer kolin esterlerini hidroliz edebilen butirikolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tip kolinesteraz bulunur. Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahiptirler. Substrat özgülüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılmışlardır. Farmakolojik özellikleri bakımından birbirinden farklı olan bütün AChE inhibitörlerinin hepsi de ortak bir şekilde, ACh'in yıkımının inhibisyonunu sağlamak üzere fonksiyon gösterir. AChE veya gerçek kolinesteraz (Asetilkolin asetil hidrolaz, AChE, E.C.3.1.1.7) ve butirikolinesteraz (Açilkolin açilhidrolaz, BChE, E.C.3.1.1.8), spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir. AChE, beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonda bulunurken; BChE, serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'inden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Taslimi *et al.* 2017b).

Bu çalışmada kullanılan Olivetol doğal kaynaklı bir fenolik bileşiktir. AChE doğal inhibitörü olan Takrin, Olivetol'un K_i ve IC_{50} değerlerindeki benzerlikten dolayı da AChE inhibitörü olarak ilaç eldesinde kullanılabilir (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.4. AChE ve BChE enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Olivetol ve Takrin'in IC_{50} ve K_i değerleri

Enzimler	Olivetol		Takrin	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)
AChE	5,13	3,40±0,34	95,77	65,92±2,68
BChE	6,01	2,73±0,18	83,73	30,36±8,08

AChE ve BChE'nin yapısal benzerliklerinden dolayı Olivetol ve doğal inhibitörü olan Takrin ile yaptığımız inhibisyon çalışmalarında K_i ve IC_{50} değerlerinin birbirine benzer çıkmasından dolayı bu bileşik hem AChE inhibitörü hemde BChE inhibitörü olarak kullanılabilir (Çizelge 5.3).

Diğer taraftan Alzheimer dahil birçok hastalığın serbest radikallerin sebep oldukları

mekanizma ile olduğu bilinmektedir. Fenolik bileşikler serbest radikalleri gidererek oluşan hastalıkları da engelleyebilmektedir. Çalışılan madde fenolik yapıda bir bileşik olduğundan antioksidan ve serbest radikali giderme özelliklerine sahip olduğu gözlemlendi (Taslimi *et al.* 2017c).

Antioksidanlar, gıda maddelerini ve bu gıdaları tüketen canlıları nitrojen türü ve reaktif oksijen gibi serbest radikal moleküllerin oksidatif zararlarına karşı koruyan kimyasallardır. Antioksidan maddelerin en önemli kaynağı bitkisel gıdalar olduğundan dolayı diyetle alınan antioksidanlar genellikle fitokimyasal antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşenler; indirgen ajan, serbest radikal bağlayıcı, singlet oksijen tutucu mekanizmalardan bir veya birkaçı ile antioksidan etkilerini göstermektedirler (Gülçin *et al.* 2006).

Antioksidanlar, canlılardaki serbest radikalleri nötralize edip hücrelerin onlardan etkilenmesini engelleyen veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek tümör gelişimini önlerler (Gülçin *et al.* 2006).

Canlıların hayatlarını sürdürmeleri için gerekli olan oksijen, elzem bir moleküldür. Eğer oksijen molekülü eksik indirgenirse hücrelere zarar veren Reaktif Oksijen Türleri (ROT) meydana gelmektedir. ROT ve Serbest Radikaller (SR) hücrelerde aşırı miktarda oluşuyor ise bu olay "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Oksidatif stres, hücrelerdeki bileşenler üzerinde olumsuz bir etki oluşturur. Bu etki ile Hidroksil Radikali (OH) başta olmak üzere birçok serbest radikal, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) üzerinde bulunan nükleik asit ve bazlarının değişimine, DNA üzerindeki zincirlerde kırılmalar meydana getirerek kanser oluşumuna, hücrelerin yaşlanmasına ve hücrelerin ölümüne kadar giden süreçleri başlatabilirler (Gülçin *et al.* 2006).

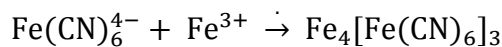
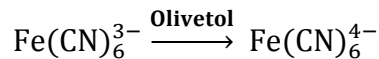
Çalışmamızda Olivetol'un antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar şunlardır:

1. Fe³⁺-Fe²⁺ transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi,
2. Kuprik iyonlarını (Cu²⁺) kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgeme kapasitesi,
3. FRAP metoduna göre Fe³⁺-TPTZ indirgeme kapasitesi,
4. Ferrozin kullanarak ferröz iyonlarını (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi,
5. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi,
6. ABTS radikal giderme aktivitesi,
7. DMPD radikal giderme aktivitesi
8. Riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan O₂⁻ giderme aktivitesi

Bu metotlar kullanılarak Olivetol'un farklı derişimlerde antioksidan kapasiteleri belirlendi. BHA, BHT, α -Tokoferol ve α -Tokoferolün bir analogu olan troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile kıyaslamaları yapıldı. Çalışmada yapılan çoğu antioksidan yönteminde Olivetol'un aktivitesinin kullanılan standartların aktivitelere benzer aktiviteye sahip olduğu görüldü.

İndirgeme kapasitesini belirlemek amacıyla tasarlanmış birçok farklı metot mevcuttur. Bundan dolayı bu tez kapsamında ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kapasitesi ile birlikte kuprik iyonlarını (Cu²⁺) kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduyla Fe³⁺-TPTZ indirgeme kapasitesi de çalışıldı.

İlk olarak önemli metotlardan birisi olan Fe[(CN)₆]⁺³'nin Fe[(CN)₆]⁺²'ye indirgenmesi metodu ile Olivetol ve Fe³⁺'ün ilavesiyle 700 nm'de güçlü absorbansı olan Prussian mavisi rengindeki bir kompleks madde olan Fe₄[Fe(CN)₆] oluşturur. Artan absorbans, kompleks oluşumundan kaynaklı artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini verir.

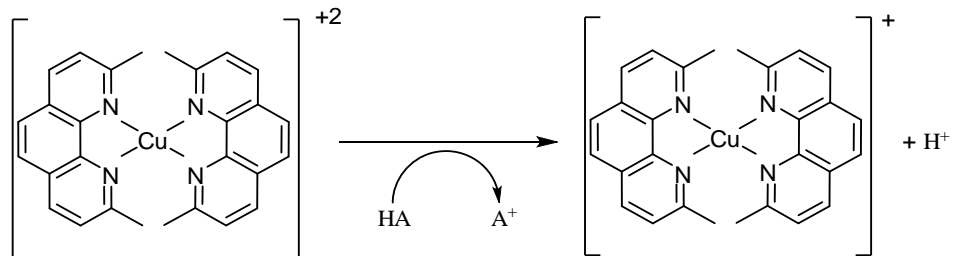


Bu metotta kontrol çözeltisi sarı renklidir ve antioksidan örneklerinin ilavesiyle

indirgeme kapasitesine bağı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Benzie and Strain 1996). Çalışmamızın sonuçların değerlendirildiğinde Olivetol'un standartlara göre daha düşük indirgeme kuvvetine sahip olduğu ve kıyaslama yapıldığında ise Olivetol farklı konsantrasyonların farklı nispeten daha zayıf indirgenme sergilemediği görüldü. Genel olarak ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme aktivitesinin artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği gözlemlendi. Sonuç olarak; BHT > BHA > Troloks > α -Tokoferol > Olivetol şeklinde bir sıralama elde edildi.

Kuprak metodu Apak ve grubu tarafından indirgeme kapasitesi analizi için geliştirilen önemli bir metottur (2004). Son yıllarda özellikle Gülçin ve grubu tarafından oldukça yaygın ve etkili bir kullanım alanı bulmuştur (Gülçin 2008; 2010; Gülçin *et al.* 2010). Bu metot, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve rahat uygulanabilir bir metottur (Huang *et al.* 2005). Kuprak metodu fizyolojik pH'ya yakın bir pH olan pH: 7.0'da gerçekleştirilir (Gülçin 2008).

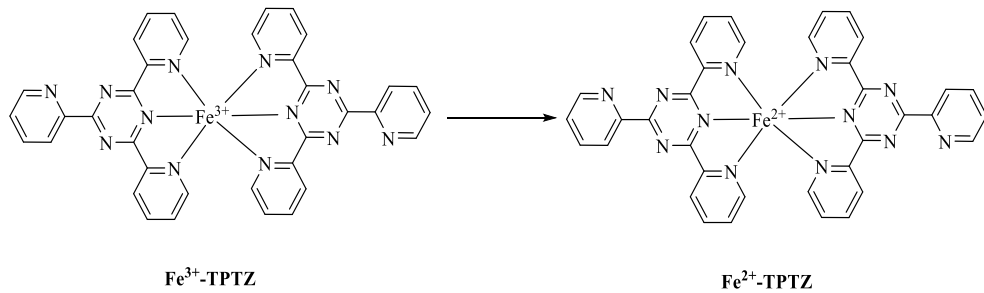
Bu metodda, $CuCl_2$ ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Kullanılan neokuprin, heterosiklik bir organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır. Kuprak metodu, antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi esasına dayanır. Neokuprinin varlığında Cu^{2+} , Cu^+ 'e indirgenir. Oluşan kompleks bileşiğin 450 nm'de maksimum absorbanası ölçülür (Gülçin 2006).



Şekil 5.1. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen neokuprin molekülünün indirgenme reaksiyonu

Bu yöntem, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve seçicidir. İndirgeyici maddenin türü ve hidrofiliği gözetilmeksizin farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir yöntemdir. Aynı molekül yapısına sahip fenoliklerde bulunan -OH grubunun pozisyonu antioksidan özellikler açısından belirleyici bir unsurdur (Gülçin 2012). Bu yöntemde de Olivetol'un indirgenme kuvveti standartlara benzer indirgenme kuvveti gösterdi. Sonuç olarak Sonuç olarak; BHA > BHT > Olivetol > α -Tokoferol > Trolox şeklinde bir sıralama elde edildi.

Diğer bir indirgeme metodu ise Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgendiği FRAP metodudur. FRAP yöntemi kolay standardize edilebilen, basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Düşük pH'da Fe^{3+} 'ün Fe^{2+} 'ye indirgenmesi renkli Fe^{2+} -TPTZ kompleksinin oluşmasına yol açar. Oluşan bu demir kompleksi oksidan olarak kullanılır ve redoks potansiyeli 0.70 V'tur (Benzie and Strain 1996). Bu metodun esası; oksidan olarak kullanılan Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin düşük pH'da renkli formdaki Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesidir. Oluşan renkli kompleks 595 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir.



Şekil 5.2. Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesi

Olivetol'un FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı görüldü. Ayrıca Olivetol standart antioksidanlarla FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin mukayesesi yapıldı: BHT > BHA > Trolox > α -Tokoferol > Olivetol şeklinde bir sıralama bulundu.

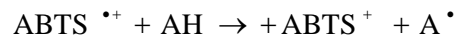
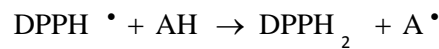
Çizelge 5.4. 30 µg/mL konsantrasyonunda Olivetol'un ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ve kuprik (Cu²⁺) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	Fe ³⁺ İndirgeme Metodu		Kuprak Metodu		FRAP Metodu	
	λ ₇₀₀	R ²	λ ₄₅₀	R ²	λ ₅₉₃	R ²
BHA	1,936±0,013	0,975	2,481±0,020	0,958	2,734±0,017	0,978
BHT	1,947±0,012	0,982	2,399±0,081	0,927	2,912±0,012	0,968
α-Tokoferol	1,312±0,017	0,934	0,859±0,019	0,984	1,960±0,001	0,994
Troloks	1,772±0,013	0,992	0,708±0,005	0,996	2,456±0,015	0,957
Olivetol	0,864±0,012	0,987	1,314±0,044	0,968	1,260±0,005	0,983

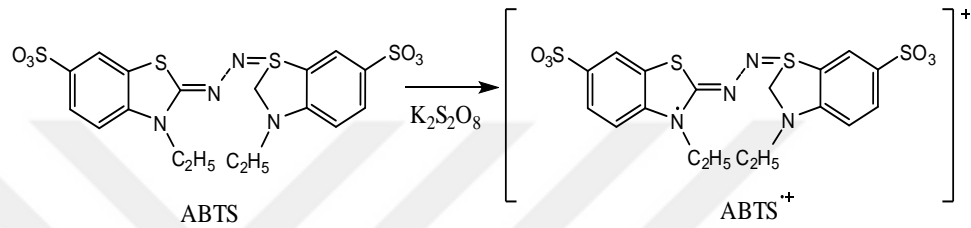
Olivetol'un her üç indirgeme metodunda artan konsantrasyona bağlı olarak indirgeme kapasitelerinde de artış meydana geldiği tespit edildi.

Fenolik bileşikler, bir aromatik halkaya bağlı fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere bir veya birden fazla hidroksil grubu içeren maddelerdir. Fenolikler en aktif doğal antioksidanlardan olup, antioksidan etkilerini serbest radikalleri bağlama, metallere şelatları oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inhibe etmeleri ile gerçekleştirilmektedirler.

Antioksidanların radikal giderme aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan en popüler spektroskopik yöntemler DPPH[•], ABTS^{•+}, DMPD^{•+} ve O₂^{•-} radikallerinin kullanıldığı yöntemlerdir. Özellikle ABTS^{•+} ve DPPH[•] yöntemleri basit, hızlı, hassas ve tekrarlanabilir yöntemlerdir. Bu yöntemler yüksek duyarlılığa sahiptir. Ayrıca pek çok benzer çalışmanın analizinde rahatlıkla kullanılabilirler (Gülçin *et al.* 2010; Gülçin 2012).

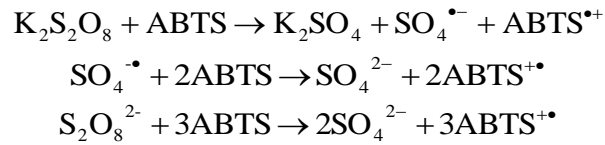


çözücülerde çözünen $ABTS^{\cdot+}$ iyonik şiddetten etkilenmediği için oldukça kullanışlı bir metottur. Bu metotta öncelikle ABTS radikali oluşturmak gerekmektedir. Burada tanımlanan ABTS oluşumu için geliştirilen teknik, ABTS ve $K_2S_2O_8$ arasındaki reaksiyon sonucu mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Gülçin 2012).



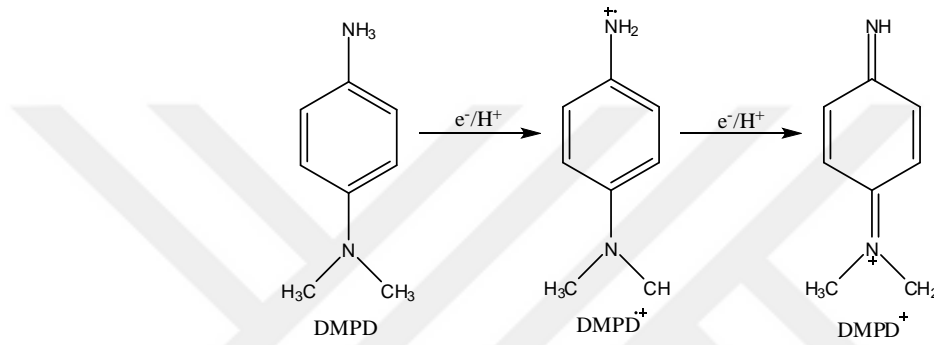
Şekil 5.4. ABTS radikalinin ($ABTS^{\cdot+}$) oluşum mekanizması

Bu metot oluşturulan $ABTS^{\cdot+}$ katyonunun 734 nm de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. ABTS radikal katyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak $K_2S_2O_8$ kullanılabildiği gibi Mn_2O_3 'de kullanılabilir. Potasyum persülfat veya Mn_2O_3 varlığında ABTS'den $ABTS^{\cdot+}$ meydana gelebilir. ABTS radikalleri ABTS / $K_2S_2O_8$ ortamında aşağıda verildiği üzere oluşmaktadır. Burada peroksidisülfatın yıkımı elektron transferinden sonra meydana gelebilir. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali aşağıdaki reaksiyona göre tepkime verir.



ABTS radikal giderme yönteminde Olivetol'un diğer antioksidanlara benzer şekilde ABTS radikallerini giderdiği (IC_{50} : 1,94 $\mu\text{g/mL}$) gözlenmektedir. Diğer antioksidanlara ait IC_{50} değerleri ise şu şekildedir. BHA (IC_{50} : 2,75 $\mu\text{g/mL}$), BHT (IC_{50} : 2,06 $\mu\text{g/mL}$), α -Tokoferol (IC_{50} : 6,96 $\mu\text{g/mL}$) ve Troloks (IC_{50} : 3,01 $\mu\text{g/mL}$). Ayrıca $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi sıralandı: Olivetol < BHT < BHA < Troloks < α -Tokoferol.

Deneysel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir radikal giderme metodu ise $\text{DMPD}^{\bullet+}$ giderme aktivitesidir. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ giderme analizinin temeli, asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD 'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu ($\text{DMPD}^{\bullet+}$) oluşturması esasına dayanır. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ 505 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Şekil 5.10'da görüldüğü gibi $\text{DMPD}^{\bullet+}$ 'ye bir H atomu transfer edebilen antioksidanlar rengi söndürür ve solüsyonda bir renksizleşme meydana gelir.



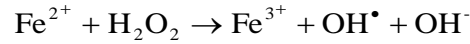
Şekil 5.5. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ radikalinin oluşum ve giderilmesi

Olivetolun $\text{DMPD}^{\bullet+}$ giderme aktivitesi standart olarak kullanılan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks bileşiklere göre iyi etkinliği gözlenmiştir. Olivetolun $\text{DMPD}^{\bullet+}$ giderme aktivitesine ait IC_{50} değeri 19,25 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. BHA IC_{50} değeri 19,82 $\mu\text{g/mL}$, BHT IC_{50} değeri 21,65 $\mu\text{g/mL}$, α -Tokoferol IC_{50} değeri 27,72 $\mu\text{g/mL}$, Troloks IC_{50} değeri 15,40 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.5).

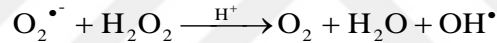
$\text{DMPD}^{\bullet+}$ giderme aktivitesi ile ilgili IC_{50} değerleri literatürde ki diğer çalışmalar ile mukayese edildiğinde ise benzer şekilde etkili olduğu gözlenmiştir. Gülçin ve grubu tarafından yapılan benzer çalışmaların sonuçlarının IC_{50} değerleri ise L-Adrenalin için 15,6 $\mu\text{g/mL}$ (Gülçin 2009a) eugenol için 10,04 $\mu\text{g/mL}$ (Gülçin 2010), rezveratrol için 9,5 $\mu\text{g/mL}$ (Gülçin 2010), kurkumin için ise 34,5 $\mu\text{g/mL}$ (Ak and Gülçin 2008) ve CAPE için 26,70 $\mu\text{g/mL}$ (Göçer and Gülçin 2011) olarak bulunmuştur.

Radikal giderme yöntemlerinden biri olan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de bu çalışma kapsamında araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipid

peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Bu radikaller biyolojik makro moleküller ile direk etkileşip doku hasarlarına sebep olurlar (Halliwell and Gutteridge 1984). Fe^{2+} ise Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksit moleküllerinden oldukça reaktif olan $OH\cdot$ radikallerinin oluşumuna neden olurlar. Fenton Reaksiyonu:



Süperoksit anyon radikalleri, katalaz ve peroksidaz enzimlerini de inaktive edebilir, oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranında hasar oluşturabilir. Bunun yanı sıra Haber-Weiss reaksiyonu ile doğrudan hidrojen peroksitle etkileşip hidroksil iyonu ve hidroksil radikali de oluşturabilir (Fridovich 1983; Mavi 2005; Gülçin *et al.* 2007b). Haber-Weiss Raksiyonu:



Ayrıca süperoksit anyon radikalleri katalaz ve peroksidaz enzimlerini de inaktive edebilir, oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranını da parçalayabilir. Bütün bunların yanı sıra lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynarlar. Sitokrom c gibi bazı demir komplekslerini de kolaylıkla indirgeyebilir (Gülçin 2012).

Olivetolun ve diğer antioksidanların süperoksit giderme aktivitesine ait IC_{50} değerleri şu şekildedir (Çizelge 5.5). BHA için IC_{50} 23,11 $\mu g/mL$, BHT için IC_{50} 31,50 $\mu g/mL$, α -Takoferol için IC_{50} 34,65 $\mu g/mL$, Troloks IC_{50} 46,22 $\mu g/mL$, Olivetol ise IC_{50} 53,30 $\mu g/mL$ dir.

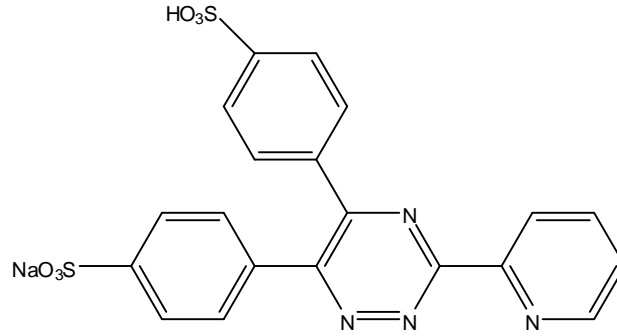
Demir, bazı normal fizyolojik prosesler için gerekli bir mineraldir. Ancak fazlası hücre hasarına sebep olabilir. Ferröz iyonu (Fe^{2+}) gibi elementel türler, canlı metabolizmasında ROS üretimini kolaylaştırabilir. Geçiş metalleri arasındaki demir,

reaktivitesinden dolayı en önemli lipit oksitleyici olarak bilinmektedir. Demir iyonları bağırsaklar tarafından emilerek transferrin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) şeklinde demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanır. Transferrine spesifik olarak bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar ve dolayısıyla metabolizma için zararsız hale gelirler. Bu sebeplerden demir şelatlama kapasitesi oldukça önemli bir antioksidan özelliğidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için kullanılan bir antioksidan yöntemidir (Gülçin 2007; Gülçin 2012).

Çizelge 5.5. Olivetol çözeltilerinin DPPH \cdot , ABTS $^{+}$, DMPD $^{+}$ ve $O_2^{\cdot-}$ radikali giderme ve ferrozin metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

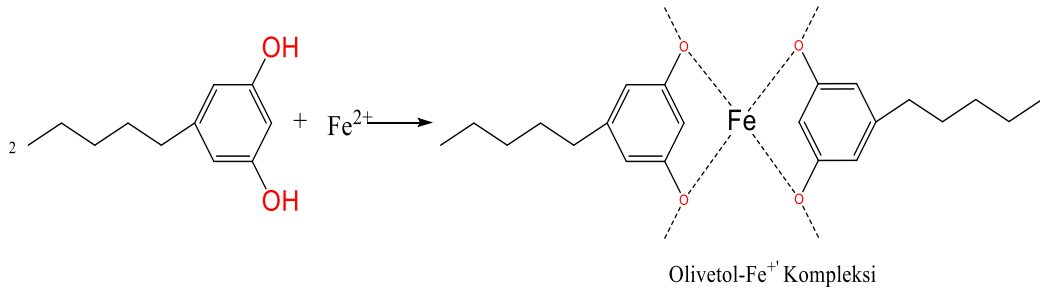
Antioksidanlar	DPPH \cdot Giderme	ABTS $^{+}$ Giderme	DMPD $^{+}$ Giderme	$O_2^{\cdot-}$ Giderme	Metal şelatlama
BHA	8,55	2,75	19,82	23,11	17,77
BHT	7,61	2,06	21,65	31,50	5,11
α -Tokoferol	9,36	6,96	27,72	34,65	19,25
Troloks	10,66	3,01	15,40	46,22	4,84
EDTA	-	-	-	-	2,07
Olivetol	17,77	1,94	19,25	53,30	2,83

Antioksidan bir molekülün metal şelatlama aktivitesinin ölçümü, test çözeltisi ile önceden hazırlanmış ferröz iyonu çözeltisinin muamelesiyle oluşan Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin 562 nm’de absorpsiyon ölçümüne dayanır. Fe^{2+} -Ferrozin kompleksi kırmızı renkli bir komplekstir.



Şekil 5.6. Bir metal şelatörü olan Ferrozin'in açık kimyasal yapısı

Bazı fonksiyonel gruplara ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_3$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$ ve $-\text{O}-$ gibi) sahip olan moleküllerin metalleri kolaylıkla şelatlayabilecekleri bildirilmiştir (Gülçin 2012). Bu grupların antioksidan molekülde bulunması molekülün metal şelatlamada yapı-fonksiyon konfügrasyonunun lehinedir. Bu bilgilere dayanarak bir bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile oksidasyonu durdurabilir veya hızını yavaşlatabilir (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2009a). çalışmamızda yapılan olivetolun metal şelatlama mekanizması aşağıda verilen şekilde açıklanmıştır.



Şekil 5.7. Olivetolün Fe^{2+} iyonu ile bağlanarak oluşturabileceği muhtemel kompleks yapısı

Bu çalışma kapsamında Olivetol fenolik bileşiğinin antioksidan kapasitesi araştırılmış ayrıca hCA I, hCA II, AChE, BChE, GST, GR, α -glukozidaz, ve α -amilaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bütün bu işlemlerin sonuçları değerlendirildiğinde yapılan çalışmaların biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalarda yol gösterici olabileceği, bulunan sonuçların Alzheimer ve glokom gibi hastalıkların araştırılması açısından önemli olacağı ve bu maddenin ileride tedavi amaçlı kullanılacak

ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında Olivetol fenolik bileşiğinin antioksidan kapasitesi araştırılmış ayrıca hCA I, hCA II, AChE, BChE, GST, GR, α -glikozidaz, ve α -amilaz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir ve antioksidan kapasitesi farklı metotlar ile belirlenmiştir. Sonuçlar ilgili aktivitelerde kullanılan standard moleküller ile mukayese edilmiştir. Elde edilen sonuçları ilgili alanlarda ileride yapılacak biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarda ışık tutacağı, bulunan sonuçların Alzheimer ve Glokom gibi birçok metabolik hastalıkların araştırılması ve tedavisinde önemli etkileri olacağı muhakkaktır. Bu bağlamda olivetolün ileride tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynında ve ilgili uygulamalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Ak, T. ve Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbaba, Y., Bastem, E., Topal, F., Gülçin, İ., Maraş, A., Göksu, S. 2014. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of novel sulfamides derived from 1-aminoindanes and anilines. *Archiv der Pharmazie*, 347, 950–957.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1379-1385.
- Aksu, K., Topal, F., Gülçin, I., Tümer, F., Göksu, S. 2015. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of novel symmetric sulfamides derived from phenethylamines. *Archiv der Pharmazie*, 348, 446-455.
- Allam, A.R., Sridhar, G.R., Das, U.N., 2007. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypothesis*, 69, 1272-1276.
- Alterio V., Fiore D.A., Katia D'Ambrosio, Supuran C.T., and Simone G. D., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *American Chemical Society*, 112, 4421–4468.
- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arabaci, B., Gülçin, İ., Alwasel, S., 2014. Capsaicin: A potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Molecules*, 19, 10103-10114.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö. İ.: A new Method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166, 1996.
- Ashani Y, Shapiro S, Levy D, Wolfe AD, Doctor BP, Raveh L., 1991. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochemical Pharmacology*, 41, 37-41.
- Awika, J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657–6662.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Barta C, Sasvari-Szekely M, Devai A, Kovacs E, Staub M, Enyedi P., 2001. Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Molecular Genetics and Metabolism* 484-488.
- Benzie, I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2013. *Biochemistry*, 7. Baskıdan çeviri (Çeviri

- editörü: Denizli A., Özden A. K.), Palme Yayıncılık.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T. 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 35-39.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ. 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., Gluud, C., 2007. Antioxidant supplements for primary and secondary prevention systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 297, 842-857.
- Blekas, G., Boskou, D., 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and a-tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. *Grasas y Aceites*, 34-37.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bodur, E., Çokuğraş, A.N., 2006. Benzoylcholine, indole-3-acetic and human serum butyrylcholinesterase interactions. *Turkish Journal of Biochemistry*, 31, 182-186.
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P., 1961. *Biochemical Journal*, 79, 516-524.
- Bottcher, K., Waheed, A., Sly, W.S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: purification, characterization and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- Boyland, E. and Chasseaud, L.F., 1969. The role of Glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 173-219.
- Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin, İ., Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., Supuran, C.T. 2015. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxy-bromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 640-650.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Burda, S., Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2774-2777.
- Bursal, E., Gülçin, İ., (2011). Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44, 1482-1489.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C., 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*, 51, 66-74.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and

- characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Ciftci, M., Kufrevioğlu, Oİ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gulcin, İ., Oktay, M., Kufrevioğlu, Oİ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F., 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stress-induced ulcer formation in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 31, 199-203.
- Carlo, G., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 4, 337-353.
- Carter, N., Wistrand, P.J., Lonnerholm, G., 1989. Carbonic-anhydrase localization to *perivenous hepatocytes*. *Acta Physiologica Scandinavica*, 135, 163-167.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Ozkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi, 1-174. In Ed. B. Cemeroğlu, meyve sebze teknolojisi. 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- Chatonnet A, Lockridge O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 260, 625-634.
- Christie, KN., Thomson, C., Xue, LZ., Lucocq, JM., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45, 35-40.
- Chua, M.T., Tung, Y.T., Chang, S.T., 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*, 99, 1918-1925.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 127, 233-242.
- Chuiko, G.M., Podgornoya, V.A., Zhelnin, Y.Y., 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135B, 55-61.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S., Anfinsen, C.B., 1968. The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 159, 417-419.
- Çakmakçı, S., Topdaş, E.F., Kalın, P., Han, H., Şekerci, P., Polat Kose, L., Gülçin, İ., 2015. Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 472-481.
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Menzek, A., Gülçin, İ., 2012. Synthesis and antioxidant properties of (3,4-dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone and its derivatives. *Archiv Der Pharmazie* 345, 323-334.
- Çınar İ., Çolakoğlu AS., 2004. Ön işlem ve depolama koşullarının portakal kabuğu

- karotenoidlerinin stabilitesi üzerine ekileri. Gıda Teknolojisi Derneği, Türkiye 8. Gıda Kongresi, Bursa.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: in vivo and in vitro studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 266-270.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2257-2261.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of (*Mytilus galloprovincialis*), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56, 443-470.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C., 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 4, 131-8.
- Dawes, H.W., Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwi fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2398-2403.
- Dembele, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 731-742.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th Ed., Wiley-Liss Inc., Newyork.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid. M., Stahl, W., Vina-Ribes, J., 1998. Functional foodscience and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80,77-112
- Dodgson, S.J., Forster, R.E., Storey, B.T., 1984. The role of carbonic-anhydrase in hepatocyte metabolism. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 429, 516-524.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Techonology*. 53, 46-48.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D. , Andres, V. ve Featherston, R. M., 1961. *Biochem. Pharmacology.*, 7, 88-95.
- Elmastas, M., Türkekul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- Elmastas, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y. (2006a). Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 258-266.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148.
- Ergün, A., Tuncer, ŞD., Colpan, İ., Yalcın, S., Yıldız, G., Kucukersan MK., Kucukersan, S., Onol, AG., Muğlalı, OH., Şehu, A., 2002. *Yemler, yem hijyenive teknolojisi*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık, Ankara, 465 s.
- Ewald, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., Akesson, B., 1999. Effect of

- processing on major flavanoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72, 55-63.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D'angelo, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 420-425.
- Finkel T, Holbrook N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408, 240-247.
- Frel, B., 1994. Natural antioxidants in human health and disease, Academic Press. Sandiego, 387-409.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Giacobini E., 2000. Cholinesterase inhibitors: From the Calabar bean to Alzheimer therapy. In: *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors (E. Giacibini)*, 181-226.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2213-2217.
- Gokpınar, Ş., Koray, T., Eren, A., Goksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioxidants. *Journal of Fishers and Aquatic Sciences*, 23, 87.
- Göçer, H. ve Gülçin, İ. 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 821-825.
- Göçer, H., 2013. Antioxidant properties of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) seeds. *International Journal of Academic Research*, 5, 120-124.
- Göçer, H., 2014. Sinefrin ve fenilefrin: antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoylcarbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 316-320.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. *Archivder Pharmazie*, 346, 783-792.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 821-825.
- Göçer, H., Sinefrin ve fenilefrin: antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insankarbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz

- enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2014.
- Gözükara, E.M., 1989. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd Şti., 792-795, Ankara.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114.
- Gülçin, İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents-An overview. Archives of Toxicology, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217, 213-220.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. Amino Acids, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. Chemico-Biological Interaction, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. Journal of Medicinal Food, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. Journal of Medicinal Food, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. Journal of Ethnopharmacology, 101, 287-293.
- Gülçin, İ., Beydemir, S., 2013. Fenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 13, 408-30.
- Gülçin, İ., Beydemir, S., Topal, F., Gagaa, N., Bakuridze, A, Bayram, R., Gepdiremen, A. 2012. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27, 587-594.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004e. In vitro antioxidant properties of morphine. Pharmacological Research, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu M.E., 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 613-616.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Acta Alimentaria, 34, 193-202.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu H.M., Bilsel, M., Gören, A.C. 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from

- Erzurum, Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48, 2227-2238.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Küfrevioğlu Ö.İ. 2003b. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. Journal of Pineal Research, 34, 278-281.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). Wood Sciences and Technology, 43, 195-212.
- Gülçin, İ., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. Phytotherapy Research, 21, 354-361.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., Aboul-Enein H.Y., 2012. Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. Arabian Journal of Chemistry, 5, 489-499.
- Gülçin, İ., Gagua, N., Beydemir, S., Bayram, R., Bakuridze, A., Gepdiremen, A., 2012b. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27, 528-32.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arabian Journal of Chemistry, 3, 43-53.
- Gülçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). Turkish Journal of Biology, 34, 175-188.
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C.KOCH var. Joannis. Research Journal of Biological Sciences, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004c. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006a. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. Phytotherapy Research, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chemistry, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004d. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004b. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), Italian Journal of Food Sciences, 16, 17-30.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel M., Erdoğan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). Journal of Food Science, 76, C585-C593.
- Gülçin, İ., Topal, F., Oztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel M., 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). Records of Natural Products, 5, 158-175.
- Güvercin, S., Erat, M., Şakiroğlu, H., 2008. Determination of some kinetic and

- characteristic properties of glutathione S-transferase from bovine erythrocytes. *Protein and Peptide Letters*, 15, 6-12.
- Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y., 2004. Inhibition of glutathione s transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1401-1418.
- Halliwell, B. 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drug*, 42, 569-605.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed., Clarendon Press Oxford, p.530-533.
- Han, H., 2012. Altın çilek (*Physalis peruviana*) ve keten (*Linum usitatissimum*) tohumunun antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: A Biochemical interaction study. *Toxicology*, 185, 1-8.
- Hee-Joong, P., Hyun-Young, C. and Kwang-Hoon, K., 2005. Purification and biochemical properties of glutathione S-transferase from *Lactuca sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 232-237.
- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 147-162.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Kahkonen, MP., Hopia, AI., Vuorela, HJ., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, TS., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kalkan, İ., 2007. Çeşitli pişirme yöntemlerinin sebzelerin fenolik bileşik antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Kashiwada, M., Kitada, M., Shimada, T., Itahashi, K., Sato K. and Kamataki, T., 1991. Purification and characterization of acidic form of glutathione s-transferase in human fetal livers. High similarity to placental form. *Journal Biochemistry*, 110, 743-747.
- Kawaguchi N, Kuwabara S, Nemoto Y, Fukutake T, Satomura Y, Arimura K, Osame M, Hattori T; The study group for *Myasthenia gravis* in Japan. 2004 Treatment and outcome of *Myasthenia gravis*: retrospective multi-center analysis of 470 Japanese patients, 1999-2000. *Journal of the Neurological Sciences*. 224,43-7.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, Erzurum.
- Kehre JP., Smith JV., 1994. Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; in Frei B(ed): *natural antioxidants in human health and disease*. San Diego, Academic Press, 25-62.
- Kidd, P.M., 1999. *Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical*

- Damage. Ph.D. Alternative Medicine Review.
- Köksal, E., Bursal E., Tohma, H., Şimşek, S., Gülçin, İ., Gören, A.C., 2015. Antioxidant activity and polyphenol content of leaves of chard (*Beta vulgaris* var. *vulgaris*) monitored by LC-MS/MS. International Workshop on Determining Antioxidants as Reactive Species Scavengers, 27-28 October, Istanbul, Turkey.
- Köksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoğlu, F., Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. Journal of Medicinal Plants Research, 5, 217-222.
- Köksal, E., Gülçin, İ. 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32, 65-78.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. International Journal of Parasitology, 31, 661-668.
- Kutty KM, Annanpurna V, Prabhakaran V. 1989. Pseudocholinesterase: A protein with functions unrelated to its name. Biochemical Society Transactions, 7, 555-556.
- Kutty KM, Payne R.H., 1994. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 8:247-50.
- Lehninger, A. L. (1993). Principles of Biochemistry, New York, Worth Publishers Inc., 2th Edition., 198-239.
- Liang, Y. J., Lipscom, W. N. 1991. Substrate and Inhibitor Binding to Human Carbonic Anhydrase II: A Theoretical Study. Inhibitors In The Carbonic Anhydrase From Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. (Botré F. et al, eds). VCH Publishers, Weinheim., 50-64.
- Lionetto, MG., Giordano, ME., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. Aquatic Toxicology, 48, 561-571.
- Lizuka, M., Inoue, Y., Murata, K. And Kimura, A., 1989. Purification and some properties of glutathione s-transferase from *Escherichia coli* B. Journal of Bacteriology, 6039-6042.
- Lonnerholm, G., Selking, O., Wistrand, PJ., 1985. Amount and distribution of carbonic anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. Gastroenterology, 88, 1151-1161.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. Clinical Chemistry, 1814-1818.
- Maren, T. H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. Physiological Reviews, 47, 595-781.
- Mavi, A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.52-53.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual source. Food Chemistry, 72, 145-171
- Nar, M. 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonikanhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.

- Nizamlioğlu, M.N., Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 20-35.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of ısgın (*Rheum ribes*L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047- 3055.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, XL., Sly, WS., 1995. Carbonic anhydrase 4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 315-322.
- Oliveira, I., Valentao, P., Lopes, R., Andrade, P.A., Bento, A., Pereira, J.A., 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleracea* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*, 92, 129-134.
- Özaslan, S., 2014. Glutatyon S-transferaz enziminin Van gölü balığı (*Chalcalburnus tarichipalas*) karaciğerinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Parkkila, S., Parkkila, AK.,1996. Carbonic Anhydrase in the alimentary tract-roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31, 305-317.
- Polat Köse L., Gülçin İ., Gören A.C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A.L., Gorinstein, S., 2015.LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. *Industrial Crops and Products*, 74, 712–721.
- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*,433-446.
- Puscas, I., Puscas, C., Coltau, M., Baican, M., Domuta, G., 2000. The serum of carcinoma patients powerfully activates carbonic anhydrase II. *Experimental Oncology*, 22: 162-164.
- Raharjo, T., Chang, W., Choi, Y., Lorman, A., Verpoorte, V., 2004. Olivetol as product of a polyketide synthase in *Cannabis sativa* L. 43, 13-23.
- Raisanen, SR., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, PL., Vaananen, HK., 1999. Carbonic Anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB Journal*, 13, 513-522.
- Sağıroğlu, A., Özcan, H.M., 2007. Bitki ekstraktlarındaki flavonoid aglikonlarının tayini. 21. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Schulz, V., 2003. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients withdementia: what clinical trial and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10,74-79.
- Scozzafava, A., Kalın, P., Supuran, C.T., Gülçin, İ., Alwasel S., 2015. The impact of hydroquinone on acetylcholine esterase and certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 941-946.

- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., 2006. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 16, 1627-1664.
- Scozzafava, A., Passaponti, M., Supuran, C.T., Gülçin, İ., 2015. Carbonic anhydrase inhibitors: Guaiacol and catechol derivatives effectively inhibit certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 586-591.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzyme kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.
- Sehitoglu, M.H., Han, H., Kalin, P., Gülçin, İ., Ozkan, A., Aboul-Enein, H.Y., (2015). Pistachio (*Pistacia vera* L.) Gum: A potent inhibitor of reactive oxygen species. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 264-269.
- Shahidi, F. ve Naczki, M., 1995. *Food phenolics sources chemistry effects applications*. Technomic Publication, 235-277.
- Sherwin, E. R., 1990. *Food Additives*. Ed. by L. Branen, 139-193. Marcel Dekker, New York.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.
- Sivritepe, N., 2000. Asma, uzum ve şaraptaki antioksidanlar. *Gıda, Dünya Yayınları*, 12, 73-78.
- Smirnoff, N., 2001. L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitamin and Hormon*, 61, 241-66.
- Soreq, H., Zakut, H., 1993. Human acetylcholinesterases and anticholinesterases. *The American Society of Human Genetics*, 55: 593-594.
- Supuran, C.T. Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23, 146-189.
- Swenson, E.R., Leatham, K.L., Roach, R.C., Schoene, R.B., Mills, W.J., Hackett, P.H., 1991. Renal carbonic-anhydrase inhibition reduces high-altitude sleep periodic breathing. *Respiration Physiology*, 86, 333-343.
- Şahin, H., Yazıcı, T., Alzheimer hastalığı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun. Klinik Gelişim Dergisi*; 48- 52, 2007.
- Şehitoğlu, M., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum*.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan A., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 3207-3211.
- Şerbetçi Tohma, H., Gülçin, İ., 2010. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *International Journal of Food Properties*, 13, 657-671.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic-anhydrases. *Advances In Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine*, 30, 321-356.

- Taslimi, P., Gulçin, İ., 2017. Antidiabetic Potential: In vitro Inhibition Effects of Some Natural Phenolic Compounds on α -Glycosidase and α - Amylase Enzymes. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2017, 31, <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>.
- Taslimi, P., Gulcin, İ., Ozgeris, B., Goksu, S., Tumer, F., Alwasel S.H., Supuran, C.T. 2016. The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31, 152-157.
- Taslimi, P., Osmanova, S., Gulçin, İ., Sardarova, S., Farzaliyev, V., Sujayev, A., Kaya, R., Koc, F. Beydemir, S., Alwasel, S.H., Kufrevioglu, O.I. 2017c. Discovery of potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes inhibitors: the new amides and thiazolidine-4-ones synthesized on an acetophenone base. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, <https://doi.org/10.1002/jbt.21931>.
- Taslimi, P., Sujayev, A., Garibov, E., Nazarov, N., Huyut, Z., Alwasel, S.H., Gülçin, İ. 2017b. The synthesis of new cyclic thioureas and evaluation of their metal-chelating activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibition profiles. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2017; 31(7), e21897.
- Taslimi, P., Sujayev, A., Mamedova, S., Kalın, P., Gulcin, İ., Sadeghian, N., Beydemir, S., Küfrevioglu, Ö.İ., Alwasel, S.H., Farzaliyev, V., Mamedov, S. 2017a. Synthesis and bioactivity of several new hetaryl sulfonamides. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 137-145.
- Taslimi, P., Nadaroglu, H., Adiguzel, A., Bozoglu, C., and Gulluce, M., 2013. Removal of Some Textile Dyes from Aqueous Solution by Using a Catalase-Peroxidase from *Aeribacillus pallidus* (P26). journal of pure and applied microbiology, 7: 2629-2640.
- Teke, D., 2016. Filoretin: Biyolojik aktivitesi ve yapı-aktivite ilişkisi. Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Temur N., 2006. Cam, kavak, soğut ve armut ağaçları üzerinde yetişen okse otu (*Viscum album* L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- Topal, F., 2009. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine bazı kemoterapi ilaçlarının etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Topal, M., 2014. Bazı kinizarin türevleri: Antioksidan kapasiteleri ve karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Topal, M., Gülçin, İ., 2014. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. Turkish Journal of Chemistry, 38, 894-902.
- Tuovinen, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. Toxicology, 196: 31–39.
- Türkan, F., 2015. Karayemiş meyvesinden (*Prunus Laurocerasus* L.) glutatyon S-transferaz enziminin saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tüzün, C., 1996. Organik Kimya. Ankara: Palme Yayıncılık, 597-598.
- Uçar, E.Ö., Karagöz, A., Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp.

- album. *Fitoterapia*, 77, 556-560.
- Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 66, 649-652.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Vince, J.W., Reithmeier, R.A.F., 2000. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl-/HCO₃-anion exchanger AE1. *Biochemistry*, 39, 5527-5533.
- Wen, L., Wrolstad, RE., Hsu, VL., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2959-2962.
- Wilbur, K.M., Anderson, NG., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wilchek, M., Chaiken, I., 2000. An Overview of Affinity Chromatography. In: *Affinity Chromatography-Methods and Protocols*, P. Bailon, G.K. Ehrlich, Wen-Jian Fung and W. Berthold (Editors), Humana Press, pp. 1-6, New Jersey.
- Wilson, I.B., Nachmansohn, D., 1954. In ion transport across membranes. Academic Press Inc., New York. 35s.
- Yıldırım, A., Atmaca, U., Keskin, A., Topal, M., Çelik, M., Gülçin, İ., Supuran, C.T. 2015. N-Acylsulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrase isoenzymes I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 2598-2605.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 4083-4089.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S., Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 190-194.
- Zhang, Z., Fu, Y., Ma, J., Zhang, C., Wang, P. 2014. Isolation and characterization of soybean chalcone reductase cDNA, which encodes the key enzyme for the biosynthesis of 4,2',4'-trihydroxychalcone in legumes. *Molecular Breeding* 34:2139–2149
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İran'ın Maragheh şehrinde doğdu. İlköğrenimi Ohadi İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini ise Moderres Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında girdiği Tonekabon İslamik Azad Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü'nden 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.