



**BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTIOKSIDAN  
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ,  
AChE ve BChE ENZİMLERİ ile hCA I ve hCA II  
İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Leyla POLAT KÖSE**

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

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN  
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, AChE ve BChE  
ENZİMLERİ ile hCA I ve hCA II İZOENZİMLERİ ÜZERİNE  
İNİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Leyla POLAT KÖSE**

**KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM  
2016**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ, AChE ve BChE ENZİMLERİ ile hCA I ve hCA II İZOENZİMLERİ  
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Leyla POLAT KÖSE tarafından hazırlanan bu çalışma 07/12/2016 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 KÜFREYOĞLU

İmza

:

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

:

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

İmza

:

Üye : Doç. Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza

:

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza

:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun 22/12/2016 tarih ve 59/13 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

### BAZI DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, AChE ve BChE ENZİMLERİ ile hCA I ve hCA II İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Leyla POLAT KÖSE

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Tez kapsamında Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Dietilstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolakton (ENL), Nordihidroguaretik asit (NOR) ve  $\alpha$ -Conidendrin ( $\alpha$ -CON)'ın antioksidan ve radikal giderme kapasiteleri değerlendirildi. Bu amaçla  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH $\cdot$ ) giderme, 2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS $^{+}$ ) giderme kapasiteleri incelendi. Elde edilen sonuçlar, birer standart antioksidan olan BHA, BHT  $\alpha$ -tokoferol ve troloks'un kapasiteleri ile karşılaştırıldı. Diğer yandan, bu fenolik bileşiklerin AChE ve BChE enzimleri üzerindeki inhibisyon özellikleri incelendi. Elde edilen sonuçlar ile her bir molekül için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanarak inhibisyon türleri belirlendi. Çalışmanın son basamağında ise fenolik bileşiklerin, insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimi I ve II (hCA I ve II) üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. İlk olarak hCA I ve II izoenzimleri Sefaroz-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırıldı. Enzim saflığını kontrol etmek için, SDS-PAGE uygulandı ve tek bant gözlemlendi. Çalışma kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin hCA I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri esteraz aktivite yöntemi uygulanarak incelendi ve her bir molekül için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanarak inhibisyon türü belirlendi.

**2016, 198 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, Lignan, Karbonik anhidraz, Asetilkolinesteraz, Bütirikolinesteraz

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF SOME NATURAL COMPOUNDS AND INVESTIGATION OF THEIR INHIBITION EFFECTS ON AChE and BChE ENZYMES and hCA I and II ISOENZYMES

Leyla POLAT KÖSE

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In this thesis, antioxidant and radical scavenging capacities of Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Diethylstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolacton (ENL), Nordihydroguaretic acid (NOR) and  $\alpha$ -Conidendrin ( $\alpha$ -CON) were evaluated. For this purpose  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  reducing capacity, cuprac method and cuprac ions reducing capacity ( $Cu^{2+}$ ), FRAP method reducing capacity, DPPH· free radical scavenging capacity, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging capacity were examined. These acquired results were compared with capacities of BHA, BHT,  $\alpha$ -tocopherol and trolox, which being a standart antioxidant. Moreover, inhibition effects of these phenolic materials on AChE and BChE enzymes were studied. With these results, inhibition type were determined and  $IC_{50}$  and  $K_i$  values calculated for each molecule. In the last step of this study, inhibition effects of phenolic substances were searched on hCA isoenzymes I and II purified from human erythrocytes. For this purpose both isoenzymes were purified by using Sefaroz-4B-L-Tyrosine affinity column chromatography method. To check the purity of enzyme SDS-PAGE was applied and single band had been observed. Scope of work, inhibition effects of used phenolic materials on hCA I and II isoenzymes were examined by applying esterase activity methodology and inhibition type were defined by calculating  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for each molecule.

**2016, 198 pages**

**Keywords:** Antioxidant activity, Lignan, Carbonic anhydrase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase.

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerekleştirilmiştir.

Doktora tez çalışmam süresince ilgi, sabır, anlayış, destek ve tecrübelerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e sonsuz şükran ve minnettarlığımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümümüzün tüm imkânlarını esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOğLU'na ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Halis şAKİROğLU'na,

Çalışmalarım esnasında tecrübelerinden istifade ettiğim çalışma arkadaşlarım Sayın Uzm. Dr. Hülya AKINCIOğLU, Sayın Yeliz DEMİR, Sayın Hatice Esra ASLAN başta olmak üzere Biyokimya Araştırma grup arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına,

Doktora eğitimim süresince 2211-Yurt İçi Doktora Araştırma Bursu katkısından dolayı TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve yardımlarını esirgemeyen değerli kayınvalideme, ayrıca her zaman yanımda olan ve bana en büyük desteği sağlayan eşim Arş. Gör. Aytekin KÖSE'ye sonsuz teşekkür ederim.

**Leyla POLAT KÖSE**

**Aralık, 2016**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Serbest Radikaller ve Etkileri .....	1
1.2. Oksidatif Stres .....	4
1.3. Başlıca Reaktif Türleri .....	5
1.4. Antioksidanlar .....	13
1.5. Sentetik Antioksidanlar .....	14
1.6. Doğal Antioksidanlar .....	22
1.7. Antioksidanların Etkisi.....	33
1.8. Gıda Bileşenleri İçin Yaygın Olarak Kullanılan Antioksidan Metotlar.....	36
1.9. Fenolik Bileşikler .....	37
1.9.1. Fitoöstrojenler .....	40
1.9.1.a. İzoflavonlar.....	41
1.9.1.b. Kumestanlar.....	42
1.9.1.c. Stilbenler.....	42
1.9.1.d. Lignanlar .....	43
1.10. Fitoöstrojenlerin Sağlıktaki Etkileri .....	47
1.11. Enzimler .....	47
1.11.1. Esteraz Enzimi.....	53
1.11.1.a. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE).....	54
1.11.1.b. Bütirikolinesteraz Enzimi.....	62
1.11.2. Karbonik Anhidraz .....	64
1.12. Çalışmanın Amacı .....	74
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>79</b>

<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>86</b>
3.1. Materyal.....	86
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	86
3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar .....	86
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....	87
3.1.3.a. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	87
3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	88
3.1.3.c. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler.....	88
3.1.3.ç. ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	88
3.1.3.d. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler .....	89
3.1.3.e. Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler.....	89
3.1.3.f. Bütirikolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler ....	90
3.1.3.g. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler.....	90
3.1.3.ğ. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler.....	93
3.2. Yöntem .....	94
3.2.1. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi .....	94
3.2.2. Cu <sup>2+</sup> -Cu <sup>+</sup> indirgeme kapasitesi .....	95
3.2.3. FRAP indirgeme aktivitesi .....	95
3.2.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikallerini giderme aktivitesi..	95
3.2.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi .....	96
3.2.6. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi .....	96
3.2.7. Bütirikolinesteraz enzimi üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi .....	97
3.2.8. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırılması için kullanılacak kanın temini.....	98
3.2.9. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırma çalışmaları.....	98
3.2.10. CA enzim hemolizatının hazırlanması .....	98



3.2.11. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar ..	99
3.2.11.a. Sefaroz-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması.....	99
3.2.11.b. CNBr ile aktifleştirilmiş sefaroz-4B'ye tirozin takılması .....	99
3.2.11.c. Sülfanilamit kenetlenmesi.....	99
3.2.11.ç. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	101
3.2.11.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu .....	101
3.2.12. CA izoenzimleri aktivitesi tayini.....	101
3.2.12.a. Hidrataz aktivitesi.....	101
3.2.12.b. Esteraz aktivitesi.....	102
3.2.13. Protein Tayini .....	104
3.2.13.a Kalitatif protein tayini .....	104
3.2.13.b. Kantitatif protein tayini .....	104
3.2.14. CA İzoenzimleri için yapılan kinetik çalışmalar .....	105
3.2.14.a. $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar .....	105
3.2.15. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü .....	105
3.2.16. hCA I ve II izoenzimleri üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi .....	106
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>107</b>
4.1. Araştırma bulguları.....	107
4.1.1. Antioksidan çalışmalar ile ilgili araştırma bulguları .....	107
4.1.1.a. $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$ indirgeme kuvveti bulguları.....	107
4.1.1.b. $Cu^{2+}$ - $Cu^+$ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular .....	108
4.1.1.c. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları .....	109
4.1.1.ç. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları.....	111
4.1.1.d. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları.....	113
4.1.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine fenolik bileşiklerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları .....	116
4.1.3. Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine fenolik bileşiklerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları .....	124
4.1.4. Karbonik anhidraz enzimi ile ilgili yapılan çalışma bulguları .....	132
4.1.4.a. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	132

4.1.4.b. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemi sonuçları.....	133
4.1.4.c. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları .....	134
4.1.4.ç. SDS-PAGE sonuçları .....	135
4.1.4.d. hCA I ve II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmalara ait sonuçlar	136
4.1.4.e. hCA I ve II izoenzimleri için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmaların sonuçları .....	136
4.1.4.f. hCA I ve II izoenzimleri esteraz aktiviteleri üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan kinetik çalışma sonuçları.....	138
4.1.4.g. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler ile ilgili sonuçlar .....	138
4.1.4.h. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler ile ilgili sonuçlar .....	146
4.2. Tartışma.....	154
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>166</b>
KAYNAKLAR .....	179
ÖZGEÇMİŞ .....	199

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Å	Angstrom
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
AChE	Asetilkolinesteraz
ACh	Asetilkolin
BChE	Bütirilkolinesteraz
BCh	Bütirilkolin
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CA	Karbonik anhidraz
CAT	Katalaz
CON	Conidendrin
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH <sup>•</sup>	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)
END	Enterodiol
ENL	Enterolakton
EU	Enzim Ünitesi
E.C.	Enzim komisyon numarası
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I enzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II enzimi
I	İnhibitör
I <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K <sub>i</sub>	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K <sub>m</sub>	Maksimum hızın yarısına neden olan substrant konsntrasyonu
LOO <sup>•</sup>	Lipit peroksit radikali

LOOH	Lipit hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
NOR	Nordihidroguaretik asit
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
POD	Peroksidaz
ROS	Serbest oksijen radikali
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDG	Secoisolariciresinoldiglicoside
SECO	Secoisolariciresinol
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine
Tris	Trishidroksimetilaminometan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V <sub>max</sub>	Maksimum hız

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bazı ROS oluşum yolları ve antioksidan savunma sistemlerinin rolü .....	3
Şekil 1.2. Malondialdehit (MDA) .....	12
Şekil 1.3. Yaygın olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanlar .....	14
Şekil 1.4. Bazı standart antioksidanların açık yapıları .....	16
Şekil 1.5. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması .....	24
Şekil 1.6. C Vitamininin Tokoferoksil radikalini rejenere etme reaksiyonu diyagramı .....	24
Şekil 1.7. $\alpha$ -Tokoferolün serbest radikalleri giderme mekanizması .....	25
Şekil 1.8. Flavonoidlere ait metal şelatlama mekanizması .....	29
Şekil 1.9. Bazı karotenoitlerin kimyasal yapısı .....	32
Şekil 1.10. Hidroksibenzoik asidin açık yapısı .....	38
Şekil 1.11. Hidroksisinnamik asidin açık yapısı .....	39
Şekil 1.12. Flavonoidlerin genel yapısı .....	39
Şekil 1.13. Estradiol yapısı .....	41
Şekil 1.14. İzoflavon yapısı .....	42
Şekil 1.15. Kumestan yapısı .....	42
Şekil 1.16. Stilben yapıları .....	43
Şekil 1.17. Bitki lignan yapıları .....	44
Şekil 1.18. Memeli lignan yapıları .....	45
Şekil 1.19. Bitki-memeli lignanlarının yapıları ve barsak mikroflorasında meydana geldikleri metabolik yol .....	46
Şekil 1.20. Enzim ile substrat arasında Anahtar-Kilit Modeli .....	49
Şekil 1.21. Asetilkolinesterazın sinir hücresindeki fonksiyonu .....	55
Şekil 1.22. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı .....	56
Şekil 1.23. E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz aktif merkez oyuğunun MOE yazılımı aracılığıyla gösterimi .....	59
Şekil 1.24. Asetilkolin'in hidroliz reaksiyonu .....	60
Şekil 1.25. Asetilkolinesterazın organofosfatlarla etkileşim mekanizması .....	61

<b>Şekil 1.26.</b> Eritrositlerin kotransport sistemi ile transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan $\text{HCO}_3^-$ 'in giriş ve çıkışını sağlaması .....	65
<b>Şekil 1.27.</b> Karbonik anhidraz izoenziminin katalitik bölgeleri .....	66
<b>Şekil 1.28.</b> Karbondioksit'in CA katalizörlüğünde metabolize edilmesi .....	71
<b>Şekil 1.29.</b> CA enziminin $\text{CO}_2$ hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi.....	72
<b>Şekil 1.30.</b> Sülfamid ve Sülfonamid'in genel kimyasal yapısı.....	73
<b>Şekil 1.31.</b> Sülfonamidlerin karbonik anhidraz ile etkileşim modeli .....	74
<b>Şekil 1.32.</b> Çalışmalarda kullanılacak fitoöstrojenler .....	76
<b>Şekil 3.1.</b> Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayin reaksiyonu mekanizması.....	97
<b>Şekil 3.2.</b> CNBr Sefaroz 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	100
<b>Şekil 3.3.</b> <i>p</i> -Nitrofenilasetat'ın hidroliz mekanizması .....	102
<b>Şekil 4.1.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bazı fenolik bileşiklerin ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	107
<b>Şekil 4.2.</b> Farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kullanılan bazı fenolik bileşiklerin kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	109
<b>Şekil 4.3.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bazı fenolik bileşiklerin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	110
<b>Şekil 4.4.</b> DPPH' radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği .....	112
<b>Şekil 4.5.</b> Farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kullanılan fenolik bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, troloks ve $\alpha$ -tokoferol ile karşılaştırması .....	113
<b>Şekil 4.6.</b> $\text{ABTS}^{*+}$ giderme aktivitesi tayininde kullanılan $\text{ABTS}^{*+}$ için hazırlanan standart grafik.....	114

<b>Şekil 4.7.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) fenolik bileşiklerin ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	115
<b>Şekil 4.8.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı α(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [α(-) Conidendrin] grafiği .....	117
<b>Şekil 4.9.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı α(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	117
<b>Şekil 4.10.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Dietilstilbestrol] grafiği.....	118
<b>Şekil 4.11.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	118
<b>Şekil 4.12.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Enterodiol] grafiği.....	119
<b>Şekil 4.13.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	119
<b>Şekil 4.14.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği.....	120
<b>Şekil 4.15.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	120
<b>Şekil 4.16.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği.....	121

<b>Şekil 4.17.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	121
<b>Şekil 4.18.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği.....	122
<b>Şekil 4.19.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	122
<b>Şekil 4.20.</b> Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği .....	123
<b>Şekil 4.21.</b> Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	123
<b>Şekil 4.22.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha$ -(-) Conidendrin] grafiği.....	125
<b>Şekil 4.23.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	125
<b>Şekil 4.24.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Dietilstilbestrol] grafiği.....	126
<b>Şekil 4.25.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	126
<b>Şekil 4.26.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği .....	127



<b>Şekil 4.27.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	127
<b>Şekil 4.28.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği .....	128
<b>Şekil 4.29.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	128
<b>Şekil 4.30.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği .....	129
<b>Şekil 4.31.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	129
<b>Şekil 4.32.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği .....	130
<b>Şekil 4.33.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	130
<b>Şekil 4.34.</b> Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği .....	131
<b>Şekil 4.35.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	131
<b>Şekil 4.36.</b> Sığır serum albümini ve Bradford yöntemi kullanılarak kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	133
<b>Şekil 4.37.</b> İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,3 ve 0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO / 0,5 M	

NaClO <sub>4</sub> pH 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite- absorbans grafiği .....	134
<b>Şekil 4.38.</b> Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı.....	135
<b>Şekil 4.39.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	136
<b>Şekil 4.40.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	137
<b>Şekil 4.41.</b> hCA izoenzimlerine Enterodiol'ün muhtemel bağlanma modeli .....	138
<b>Şekil 4.42.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha$ -(-) Conidendrin] grafiği .....	139
<b>Şekil 4.43.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	139
<b>Şekil 4.44.</b> hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Dietilstilbestrol] grafiği.....	140
<b>Şekil 4.45.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	140
<b>Şekil 4.46.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği..	141
<b>Şekil 4.47.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	141
<b>Şekil 4.48.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği .....	142
<b>Şekil 4.49.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .	142

<b>Şekil 4.50.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Nordihidroguaretik Asit] grafiği .....	143
<b>Şekil 4.51.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	143
<b>Şekil 4.52.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Secoisolariciresinol] grafiği .....	144
<b>Şekil 4.53.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	144
<b>Şekil 4.54.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği .....	145
<b>Şekil 4.55.</b> hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	145
<b>Şekil 4.56.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha$ -(-) Conidendrin] grafiği .....	147
<b>Şekil 4.57.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	147
<b>Şekil 4.58.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)- [Dietilstilbestrol] grafiği.....	148
<b>Şekil 4.59.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	148
<b>Şekil 4.60.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği..	149

<b>Şekil 4.61.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	149
<b>Şekil 4.62.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği .....	150
<b>Şekil 4.63.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .	150
<b>Şekil 4.64.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği .....	151
<b>Şekil 4.65.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	151
<b>Şekil 4.66.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği .....	152
<b>Şekil 4.67.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	152
<b>Şekil 4.68.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği .....	153
<b>Şekil 4.69.</b> hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	153
<b>Şekil 4.70.</b> DPPH <sup>•</sup> radikalinin antioksidan ile DPPH-H'e indirgenmesi .....	159
<b>Şekil 4.71.</b> Askorbik asit'in DPPH <sup>•</sup> radikallerini giderme mekanizması.....	159
<b>Şekil 4.72.</b> L-Adrenalin molekülünün DPPH <sup>•</sup> radikalini gidermesi ve L-Adrenalin'in radikalik ara ürününün oluşum mekanizması .....	160
<b>Şekil 4.73.</b> ABTS <sup>•+</sup> radikalinin oluşum mekanizması.....	161
<b>Şekil 5.1.</b> Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı.....	172

<b>Şekil 5.2.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	173
<b>Şekil 5.3.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	174
<b>Şekil 5.4.</b> İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,3 ve 0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO / 0,5 M NaClO <sub>4</sub> pH 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite- absorbans grafiği .....	175



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Doğal ve sentetik antioksidanların kıyaslanması.....	17
Çizelge 1.2. Antioksidan çeşitleri ve örnekler .....	18
Çizelge 1.3. Oksidanlar ve antioksidan savunma sistemleri.....	19
Çizelge 1.4. Bazı antioksidan türleri ve buldukları besin kaynakları .....	22
Çizelge 1.5. Flavonoidlerin kimyasal yapıları .....	27
Çizelge 1.6. Karbonik Anhidraz enziminin katalizleme yaptığı reaksiyonlar .....	68
Çizelge 1.7. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin katalizlemedeki aksaklıkların sebebi olduğu hastalıklar ve bu izoenzimlerin birbirleriyle olan ilişkisi ....	69
Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz enzimine ait kinetik çalışmalarda kullanılan küvet içeriği .....	97
Çizelge 3.2. hCA izoenzimleri için Esteraz aktivitesi çalışmalarında kullanılan 3 mL'lik küvet içeriği .....	103
Çizelge 3.4. hCA izoenzimleri için Esteraz aktivitesinde kullanılan çözeltilerin kullanım sırası ve 1 mL'lik küvet içerikleri.....	103
Çizelge 4.1. 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ve kuprik ( $Cu^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin absorbans değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ - tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları.....	111
Çizelge 4.2. 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin DPPH <sup>•</sup> ve ABTS <sup>•+</sup> radikallerini giderme kapasitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları.....	116
Çizelge 4.3. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin $IC_{50}$ ve $K_i$ değerleri ile inhibisyon türleri.....	124
Çizelge 4.4. Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklere ait $IC_{50}$ ve $K_i$ değerleri ile inhibisyon türleri.....	132
Çizelge 4.5. Afinite kromatografi tekniğinden faydalanılarak, insan kanından elde edilen enzim hemolizatından enzim ünitesi, spesifik aktivite ve ayrıca	

hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı sonuçları .....	135
<b>Çizelge 4.6.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	146
<b>Çizelge 4.7.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	154
<b>Çizelge 5.1.</b> 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik (Cu <sup>2+</sup> ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin absorbans değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α- tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları .....	168
<b>Çizelge 5.2.</b> 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin DPPH <sup>·</sup> ve ABTS <sup>·+</sup> radikallerini giderme kapasitelerinin IC <sub>50</sub> değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları .....	169
<b>Çizelge 5.3.</b> Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	171
<b>Çizelge 5.4.</b> Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklere ait IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	171
<b>Çizelge 5.5.</b> Afinite kromatografi tekniğinden faydalanılarak, insan kanından elde edilen enzim hemolizatından enzim ünitesi, spesifik aktivite ve ayrıca hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı sonuçları .....	173
<b>Çizelge 5.6.</b> hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	177
<b>Çizelge 5.7.</b> hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri .....	177

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Serbest Radikaller ve Etkileri

Normal olarak atomların bünyelerindeki elektronlar orbital adı verilen ve elektronların bir anda bulunma ihtimalinin olduğu bölgede çiftler halinde zıt spinli olarak bulunurlar. Atomlar arasında meydana gelen etkileşimler sonucu bağlar oluşur ve atomik yapıdan moleküler yapı oluşumu gerçekleşir. Atomik yapılarda veya moleküler yapılarda ortaklaşmamış elektron barındıran tüm yapılara “serbest radikal” denir. Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran yüksek enerjili, kararlı olmayan bileşiklerdir. Serbest radikaller yüksek enerjili olduklarından dolayı kararsız olup, başka atom veya moleküllerle çok kolay ve hızlı bir şekilde elektron alışverişinde bulunurlar. Serbest radikallere “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROS)” denmektedir (Halliwell 1991; Gülçin 2012). Serbest radikaller özellikle reaktif oksijen türleri içermektedirler. Canlı bünyelerinde farklı sebeplerle çeşitli reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilir (Topal *et al.* 2016).

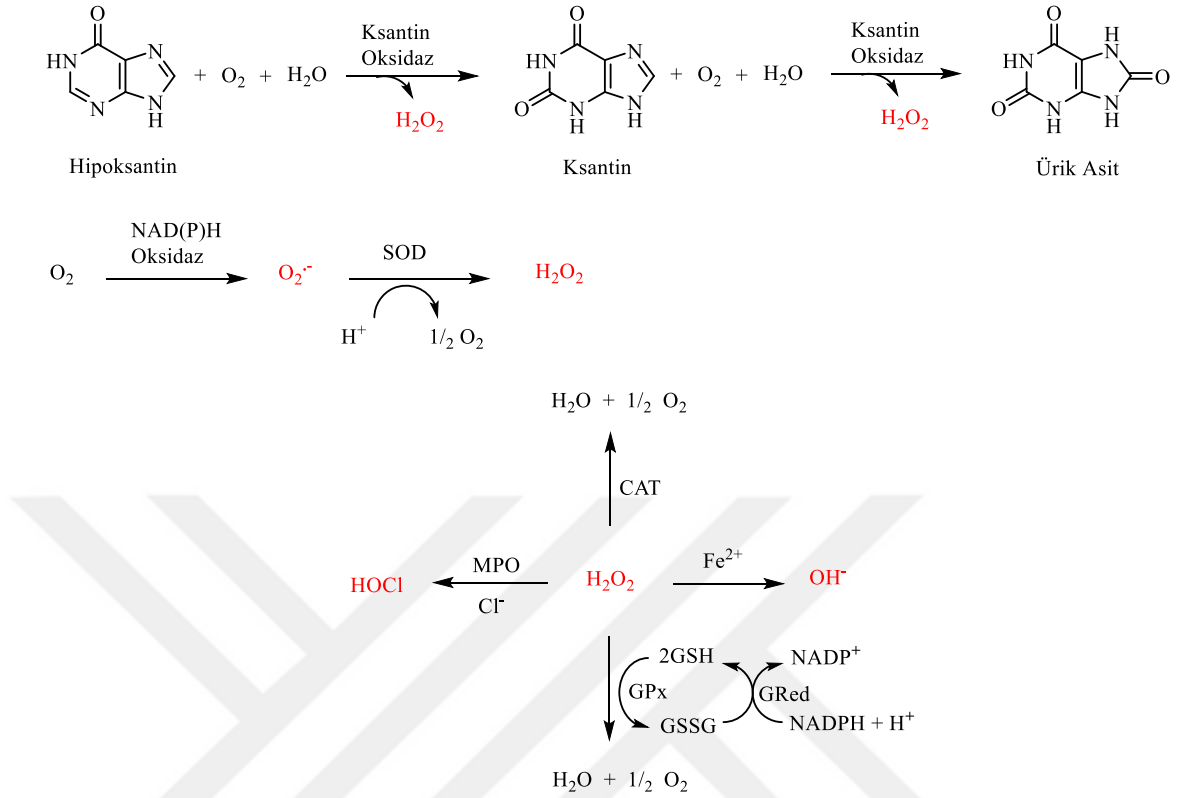
Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına rağmen, metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir. Serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülü ile karşılaştırıldığında, reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formları olarak görülmektedir (Gülçin 2011; 2012). Bunlar; süperoksit anyonu, hidroksi, alkoksi ve peroksi radikallerini içerir. ROS’lar karbohidrat, yağ ve proteinlerin oksijen ile reaksiyona girmesiyle parçalandığı ve enerjinin hazır kullanım şekli olan ATP’nin sentezi sırasında oluşmaktadır (Gülçin *et al.* 2012b).

Oksijenli solunum yapan organizmalarda, Reaktif oksijen türlerine oksidatif fosforilasyon sırasında ve aktif fagositoz gibi biyolojik açıdan çok önemli metabolik yollarda her zaman karşılaşılabilmektedir (Lichtenthaler *et al.* 2003; Gülçin *et al.* 2010). Bu metabolik olayların oluşumu sırasında meydana gelen başlıca ROS’lar; hidroksi



radikali (HO $\cdot$ ), peroksi radikali (ROO $\cdot$ ), hidroperoksi radikali (HOO $\cdot$ ), alkoksi radikali (RO $\cdot$ ) ve süperoksit anyonu (O $_2^{\cdot-}$ ) örnek olarak verilebilir. Bunların dışında hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$ ), singlet oksijen ( $^1$ O $_2$ ), peroksinitrit (ONOO $\cdot$ ) ve hipoklorözait (HClO), gibi serbest radikal olmayan oksijen türleri de mevcuttur (Aruoma 1997; Schoneich 1999; Gülçin 2012). Serbest radikaller hem vücudun içinde hem de dışındaki etkenler tarafından meydana gelir. Vücuttaki virüs ve bakterileri etkisiz hale getirmek için bağışıklık sistemi içine konulan mekanizmalardan biri de serbest radikallerin üretimidir. Oksijenli solunum, metabolizma, yağ oksidasyonu, immünolojik reaksiyonlar ve enfeksiyon gibi vücut içinden kaynaklanan olaylarla da serbest radikaller üretilmektedir (Gülçin 2012).

Doğal olarak reaktif oksijen türleri, organizmalarda bulunan özel enzim sistemleri (süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz ve katalaz), suda ve yağda çözünme özelliği gösteren bazı organik moleküller ( tokoferol) sayesinde engellenebilmektedir (Lichtenthaler *et al.* 2003; Gülçin *et al.* 2004d). Organizmalarda meydana gelen serbest radikal kaynakları sadece oksijen değildir. Bunun yanında UV ışınları, x-ışınları, ilaçlar, radyasyon, stres, sigara, alkol, yanlış beslenme şekli ve çevresel faktörler de serbest radikal oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, kalp damar hastalıkları, kanser türleri, karaciğer ve akciğer rahatsızlıkları gibi ağır hastalıkların meydana gelmesinden de serbest radikallerin rolü olduğu düşünülmektedir (Herbert 1997; Gülçin 2002; Bjelakoviç *et al.* 2007).



**Şekil 1.1.** Bazı ROS oluşum yolları ve antioksidan savunma sistemlerinin rolü (Defeng and Cederbaum 2003)

Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Mo<sup>5+</sup> gibi bazı B grubu (geçiş metalleri) elementleri ortaklaşmamış elektronlar barındırmalarına rağmen serbest radikal özelliği taşımazlar, fakat serbest radikallerin oluşumuna sebep olurlar (Daimon *et al.* 1998).

Vücutta bulunan moleküler yapıdaki oksijen her zaman ROS oluşturma eğiliminde olabilir. Serbest radikaller de vücudun her yerinde elektron alabilirler. Bu nedenle hücre, protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimlere zarar verebilirler. Sonuç olarak da ROS'lar hücrelere zarar vererek antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu durumda da hücrelerin ölmesine neden olmaktadır (Gülçin 2012).

## 1.2. Oksidatif Stres

Her şeyde bir denge olduğu gibi serbest radikallerin giderilmesinde de dengeli üretim çok önemlidir. Eğer serbest radikal üretimi fazla oluyorsa ve koruyuculukla vazifeli antioksidan moleküller de yoksa veya yeterli değilse mevcut antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez (Gülçin 2012; Polat Köse *et al.* 2015). Sonuç olarak oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar ve buna vücudun paslanması da denir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretilmesiyle biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme ya da oluşan hasarı onarma yeteneği arasındaki bir dengesizliği belirtir. Dokularda redoks safhasındaki bozukluklar, peroksitlerin ve serbest radikallerin üretilmesiyle toksik etkilere neden olabilir. Bunlar; proteinler, lipidler ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verirler (Gülçin 2012).

Üzerindeki eşleşmemiş elektron, serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller DNA moleküllerine bağlanıp onda zararlı değişikliklerin ortaya çıkmasını tetikleyerek kanserlere sebep olabilir. Reaktif oksijen türleri Pankreasta yoğunlaşırsa şeker hastalığına, gözde katarakta, kanda ise kalp damar hastalıklarına sebep olur. Serbest radikallerin vücutta tetikleyici olarak sebep olduğu hasarların ilk belirtileri; deride buruşma, sarkma ve renginde kararma şeklindedir. Ayrıca bu tür vakalarda kronik yorgunluk ve bitkinlik semptomları da görülmektedir (Gülçin 2012).

İnsanlar ister gıda maddeleri vasıtası ile olsun ister metabolik olaylar sonucu olsun, her zaman bu dejeneratif moleküllerle karşı karşıya kalırlar. Alınacak önlemler bunların vücuttaki zararlı tesirlerini en aza indirebilir veya önleyebilir.

Biyolojik sistemlerde vuku bulan tüm fizyolojik olaylar hormon, enzim ve eser elementler tarafından koordine edilen oksidasyon-redüksiyon mekanizmalarının karmaşık kombinasyonlarını barındırır. Bir atom veya molekül tarafından başka bir atom veya moleküle elektron transferine oksidasyon ya da yükseltgenme denir. Elektron veren madde yükseltgenirken elektron alan madde de indirgenir. Canlı bünyesinde bulunan karbohidratlar, lipitler, nükleik asitler ve proteinler de oksidasyona maruz kalabilmekte ve organizmalar için çok zararlı ve reaktif moleküllere dönüşebilmektedir. Bu tür kararsız moleküllerin hücre içi konsantrasyonunun artması ve bununla birlikte de hücrelerdeki antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Çetinkaya *et al.* 2012; Gülçin 2012). Organizmalarda bulunan redoks dengesinde meydana gelen en küçük değişiklik, hücre ve dokuların işlevlerini gerçekleştirememesine neden olabilmekte ve sonuç olarak ölümlere bile sebebiyet vermektedir. Oksidatif strese en çok neden olan türler reaktif oksijen ve azot türleridir (Gülçin 2012).

### 1.3. Başlıca Reaktif Türleri

**Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ):** Hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijene ( $O_2$ ) bir tane elektron transferi gerçekleşerek indirgenmesi sonucu oldukça reaktif olan  $O_2^{\cdot-}$  radikali oluşmaktadır. Bu reaktif ara ürün hücre içinde; flavin nükleotidleri, adrenalin, tiyol grubu içeren bileşikler, glukoz ile bakır ve demir gibi B grubu (geçiş metalleri) elementlerinin oksijenle muamelesiyle elde edilebilmektedir. Mitokondrilerde elektron transport zincirinde ATP sentezi sırasında moleküler oksijene elektron aktarımı, karaciğerde bulunan ve bir monooksijenaz enzim sistemi olan sitokrom  $P_{450}$  işlevi, nitrik oksitlerin yok edilmesi, adrenal medullada hormon sentezi sırasında, hücre büyümesi ve farklılaşması durumlarında oluşabilmektedir (Becker *et al.* 1999).

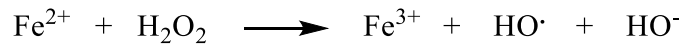
Süperoksit radikali direkt olarak zarar vermez, bu radikalın en önemli özelliği hidrojen peroksit kaynağı olması ve B grubu elementleri iyonlarının indirgenmesine sebep olmasıdır. Bu radikal hem indirgen hem de yükseltgen özellik taşımaktadır. Mesela

ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile muamelesinde indirgen olarak görev yapar ve bir elektron kaybederek moleküler oksijene yükseltgenir (Altınışik 2000).

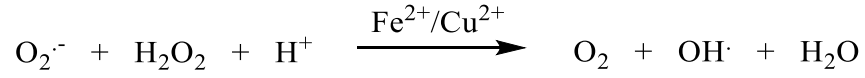
Hayvanlarda adrenalin, askorbik asit, tiyoller ve flavin koenzimlerinin otooksidasyonu sonucu süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali düşük pH'larda yüksek reaktiviteye sahiptir ve oksidan perhidroksi radikali oluşumunun kaynağıdır. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birlikte muamele edilince ise yükseltgen perhidroksi radikali protonlanarak hidrojen peroksit'e dönüşürken süperoksit radikali de moleküler oksijene yükseltgenir.

**Hidroksil (HO<sup>•</sup>) Radikali, Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları:** Oksijen molekülünün üç tane elektron alması ile oluşmaktadır. Serbest radikaller arasında en zararlı olanı bu radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS<sup>•</sup>), karbon merkezli organik radikaller (R<sup>•</sup>), organik peroksitler (RCOO<sup>•</sup>) gibi başka radikallerin de oluşmasına ve buna bağlı olarak da çok ciddi hasarlara sebep olmaktadır. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikali bir veya daha çok ortaklaşmamış elektron taşıyan ve serbest radikal özelliği gösteren geçiş metalleri ile etkileşerek ya da başka yollarla hidroksil radikalini oluşturabilmektedirler. Bunlardan bazıları aşağıda gösterildiği gibidir (Lloyd *et al.* 1997).

**Fenton Reaksiyonu:** Hidrojen peroksit'in Fe<sup>2+</sup> ya da diğer B grubu elementleri (Cu, Zn, Cr, Mn, Co, Mo, Ni) varlığında indirgenmesi ile HO<sup>•</sup> radikali elde edilir.



**Haber-Weiss Reaksiyonu:** Hidrojen peroksit'in Fe<sup>2+</sup> veya Cu<sup>2+</sup> katalizörlüğünde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ile reaksiyona girmesi ile HO<sup>•</sup> radikali elde edilir.



Su molekülleri de radyasyonla iyonizasyona maruz bırakıldığında HO<sup>·</sup> radikali elde edilir. Hidrojen peroksit UV ışığı ile muamele edildiğinde de HO<sup>·</sup> radikali elde edilir.

**Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** O<sub>2</sub><sup>·-</sup>'ye bir tane elektron aktarılması suretiyle (süperoksit dismutasyonu) veya oksijen molekülüne 2 tane elektron aktarılması (indirgenmesi) ile oluşabildiği gibi başka enzimlerce de enzimatik olarak elde edilebilmektedir. Glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz enzimleri vasıtası ile de direkt olarak elde edilebilmektedir.

Bu reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dolayı dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu reaksiyon, ya kendiliğinden olur ya da süperoksit dismutaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşir. Non-enzimatik reaksiyon pH 4,8 civarında en hızlı şekilde gerçekleşirken SOD ile gerçekleşen reaksiyon nötral ya da bazik ortamlarda daha hızlıdır. Bu yöntemlerden başka, immün sisteminde fagositoz yapan nötrofiller barındırdıkları miyeloperoksidaz enzimi vasıtasıyla süperoksit radikalinin dismutasyonu ile meydana gelen hidrojen peroksit'i, Cl<sup>-</sup> iyonu ile birleştirerek kuvvetli antibakteriyel karakterde olan HOCl'ye çevirmektedirler. Oksijen molükülündeki son yörünge elektronlarından birinin dışarıdan verilen bir enerji ile zıt spinlerden birinin spininin ters dönmesi ile farklı bir orbitale geçmesi yolu ile elde edilebileceği gibi; O<sub>2</sub><sup>·-</sup> radikalinin NO (nitrik oksit) ile reaksiyonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ClO<sup>-</sup> ile tepkimesi sonucu da elde edilebilir (Wright *et al.* 2002).

Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına rağmen ROS grubuna dâhildir ve serbest radikal biyokimyasında çok önemli görevler üstlenmiştir. Çünkü B grubu geçiş metalleri ile muamelesinde Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikali ile muamelesinde de Haber-Weiss reaksiyonu sonucu ROS'lar arasında en zarar verici ve en yüksek aktiviteye sahip hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Alkoksi radikali Cu<sup>2+</sup> gibi B grubu elementlerinin Lipid hidroperoksitlerini indirgemesi sonucu elde edilir,

yükseltgenmiş Low-Density Lipoproteinlerin oluşmasını sağlayarak hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Organizmalarda görülen en önemli reaktif nitrojen türü  $\text{NO}^\cdot$  radikalidir.

$\text{O}_2^{\cdot-}$  nin  $\text{NO}^\cdot$  ile reaksiyonu ile bir çeşit ROS olan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) oluşmaktadır.  $\text{ONOO}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$  ve  $\text{NO}_3^\cdot$  oluşumunun öncül molekülüdür ve ona göre metabolizasyona uğrar. Damarlarda da nitrik oksitin nötralizasyonu için devamlı olarak süperoksit oluşmaktadır (Massie 1993; Payzın 2000). Peroksizomlar, hücre içi hidrojen peroksitinin önemli bir kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve urat oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit radikali üretimi gerçekleştirmeden çok miktarda hidrojen peroksit üretirler. Fakat peroksizomlarda,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin suya dönüşümü reaksiyonunu katalizleyen katalaz (CAT) enzimi yüksek bir aktiviteye sahiptir ve buna bağlı olarak da peroksizomlarda üretilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin ne kadarının sitozole geçtiği belirlenememiştir.

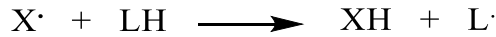
Hücrelerde büyük orandaki serbest radikal kaynağı mitokondrideki oksidatif fosforilasyon sırasında gerçekleşen reaksiyonlardır. Mitokondrinin iç zarında bulunan elektron transport zinciri bileşenleri indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikali üretilir.

Ayrıca araşidonik asit metabolizması da önemli bir reaktif oksijen türleri kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbest kalmasına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana getirir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu” denir. Metal iyonlarının serbest radikal üretimi üzerindeki en önemli sebebi lipid peroksidasyonu ile ilişkilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin ( $\text{LOOH}$ ) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (Altınışık 2000).

Serbest radikaller, hücrelerin bünyesindeki DNA, protein, lipid, enzim ve karbohidrat gibi önem arz eden moleküller üzerinde çok ciddi etkilere sahiptir. Hücrelerin sitoplâzma, nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondrilerinde lipid peroksidasyonunun başlatılmasında süperoksit ve hidroksil radikalleri rol oynamaktadır (Gülçin *et al.* 2004e; Gülçin 2012).

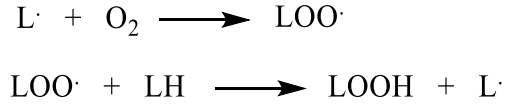
Lipidler biyomoleküller arasında serbest radikallerden en çok etkilenen gruptur. Hücre membranlarındaki yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları, serbest radikaller ile kolay bir biçimde tepkimeye girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonları kendi kendilerini devam ettirebilen zincir reaksiyonları şeklinde ilerlerler ve önemli derecede zararlıdırlar. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L<sup>·</sup>) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO<sup>·</sup>) oluşması, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna “nonenzimatik lipid peroksidasyonu” denir. Lipid peroksidasyonu genelde yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve sonuç olarak da yağ asidi zincirinin bir lipid radikaline dönüşmesi ile başlar (Altınışik 2000).

Lipidlerin oksidasyonu 3 safhada gerçekleşir; başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamaları. İlk aşamada bir başlatıcı radikal (X<sup>·</sup>) ile yağ asidi arasında bir hidrojen atomu transferi gerçekleşir ve böylece lipid radikali (L<sup>·</sup>) elde edilir.

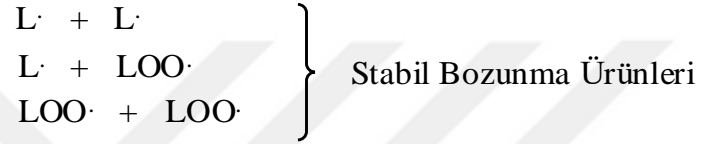


İlk aşamada elde edilen lipid radikaline moleküler oksijenin muamelesiyle lipid peroksit radikali sentezlenir. Bu lipid peroksit radikali (LOO<sup>·</sup>) de başka bir yağ asidinden (LH) bir H atomu alarak hidroperoksit (LOOH) ve yeni bir lipid radikalinin (L<sup>·</sup>) oluşumuna sebep olur. Bu iki tepkime de ilerleme aşaması olarak adlandırılır (Annakkaya 2012).

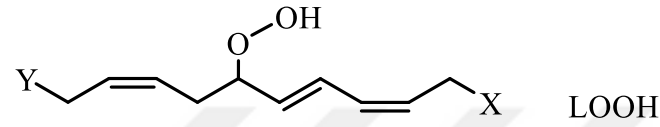
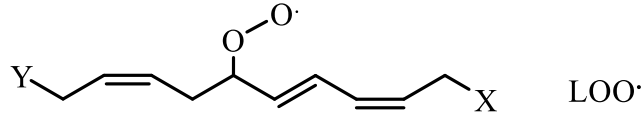




3. aşama olan Sonuç kısmında ise reaksiyonlar sırasında oluşan tüm radikal türleri birbirleri ile birleşerek aldehit, alkol, eter, ester ve keton gibi organik moleküllere dönüşmektedirler (Annakkaya 2012).



Başka bir deyişle Lipid peroksit ( $LOO\cdot$ ) radikalleri, hücre membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerine etki ederek membranlardaki lipidlerin radikal forma girmesine sebep olurken kendileri de bir H atomu alarak lipid peroksitlerine dönüşmektedirler ve reaksiyon akışı bu şekilde devam etmektedir (Altınışik 2000).

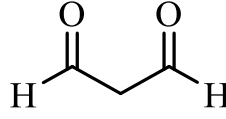


Lipid Peroksit

Organizmalarda gerçekleşen lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları sonucu ortamda bulunan lipid peroksitlerinin (LOOH) metabolize edilebilmesi için  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  gibi B grubu elementlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu tüm serbest radikallerle uyarılabilir (Kneepkens *et al.* 1994; Altınışik 2000).



Lipid peroksitleri yıkıma uğradığında, çoğunluğu biyoaktif olan aldehitlere dönüşür. Bu aktif organik moleküller ya hücre düzeyinde yıkılırlar ya da meydana geldiği an itibariyle difüze olup hücrelerin diğer bölümlerini hasara uğrattırlar. Üç ve daha çok çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (Defeng and Cederbaum 2003).



**Şekil 1.2.** Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), kanda ve idrarda ortaya çıkmaktadır, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu sebeple biyolojik materyallerde malondialdehit ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak tıpta kullanım alanına sahiptir (Altınışık 2000). Bunun yanında membran yapısının bozunmasına ve işlevinin yavaşlamasına, membran enzim ve reseptörlerinin inaktif forma dönüşmesine ve  $Ca^{2+}$  iyonlarına ait geçişlerin artmasına sebep olmaktadır (Canoruç *et al.* 2001).

Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassasiyet göstermektedirler. Proteinlerin serbest radikal hasarlarından etkilenme seviyesi, bünyesindeki amino asit sıralanışına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Çift bağ içeren triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin ve kükürt içeren sistein ile metiyonin gibi amino asitleri içeren proteinlerin serbest radikallere ilgisi daha çoktur. Bu tür etkileşimlerden dolayı karbon merkezli radikaller ve sülfür radikalleri meydana gelir. Serbest radikallerin etkilerinden dolayı yapılarında çok sayıda disülfid bağı bulunan albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulduğu için biyolojik işlevlerini yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonların etkisi altında kaldığında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilmektedirler. Böylece protein yapısında olan enzimlerin de yapıları bozulur ve buna bağlı olarak da enzimler iş göremez hale gelir. Hemoglobinin bünyesinde bulunan hem proteinleri serbest radikal etkisi altında olan proteinlerden biridir ve ciddi anlamda radikallerden etkilenmektedirler. Bilhasa oksihemoglobin,  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  ile muamele edildiğinde methemoglobin elde edilir ve oksijen taşıyamaz forma dönüşmüş olur (Altınışık 2000).

Serbest radikaller DNA üzerinde mutasyona sebep olarak hücrelerin farklılaşmasına ve ölümlere neden olmaktadır. Özellikle HO<sup>•</sup> (hidroksil radikali) bazlarla ve deoksiriboz ile reaksiyon vererek mutasyona neden olur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücre membranından kolay bir şekilde geçerek hücre çekirdeğine ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta hücre ölümlerine yol açar (Gülçin 2009). O<sub>2</sub><sup>-</sup> ise DNA'ya etki ettiğinde daha fazla antijenik özellik gösterir. Bu etki ile otoimmün bir hastalık olan sistemik lupu eritematozusta (SLE) ve romatoit artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorlar bulunur (Altınışik 2000). Serbest radikallerin pürin ve pirimidin bazlarına etki etmesi sonucu meydana gelen mutasyonlar protein sentezinde aksaklıklara neden olmaktadır (Dizdaroğlu 1991; Gülçin 2012).

Karbohidratlar üzerinde de serbest radikallerin etkisi görünmektedir. Serbest radikal hasarına uğrayan karbohidratlardan çeşitli maddeler oluşur ve meydana gelen bu maddeler bazı hastalıkların oluşmasında önemli bir yere sahiptir. Hipertansiyon, Psöriyazis, romatoit artrit, Behçet hastalığı gibi birçok deri rahatsızlıkları, diyabet ve diyabet komplikasyonları, koroner kalp hastalıkları, göz rahatsızlıkları ve kanser gibi çoğu hastalık durumunda ve yaşlılıkla beraber serbest radikal üretiminin giderek arttığı ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Altınışik 2000; Gülçin *et al.* 2006a; Gülçin 2012).

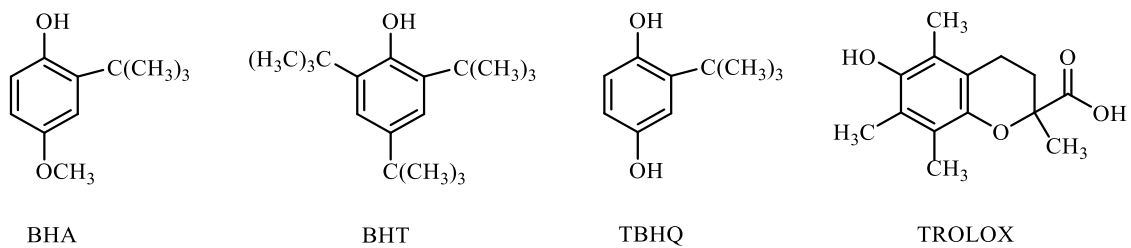
#### **1.4. Antioksidanlar**

Durmaksızın gelişen teknoloji, çevre kirliliği, radyasyon kontamine sular, tarım ilaçları ağır metaller ve canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi pek çok etken insan vücudunda kaçınılmaz olarak serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Serbest radikaller, oksijenin oldukça reaktif formları olup, hücrelerde büyük hasarlara sebep olmaktadır. Bu da kalp damar hastalıkları, katarakt, kanser, diyabet, karaciğer tahribatı ve diğer pek çok hastalığa davetiye çıkarmaktadır. Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle serbest radikallerin olumsuz etkilerini bertaraf etmek ve hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir. İnsan vücudunda bunu engelleyebilecek antioksidan savunma sistemi mevcut olsa da karşılaşılan çevresel etmenler bu savunma

direncini düşürmekte ve çoğu zaman yetersiz bırakmaktadır. Zayıflayan antioksidan savunma sistemlerimizi doğal ve dengeli beslenerek güçlendirebiliriz (Kasnak ve Palamutoğlu 2015). Doğal ve dengeli beslenme sonucunda, doğal besin kaynaklarından aldığımız antioksidanlar; serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip moleküllerdir (Elliot 1999). Antioksidanların insan sağlığına başlıca etkisi, serbest radikalleri nötralize eden ve zincir kıran mekanizmalarda aktif rol alması ile ortaya çıkar (Başer 2002). Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler; İlk olarak, reaktif oksijen türlerini tutarak reaktiviteleri azaltılmış farklı moleküllere çevirirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etkileri gösterirler. İkinci olarak, reaktif oksijen türlerine elektron ya da hidrojen transferi yaparak reaktivitelerini azaltır. Antioksidan özelliği taşıyan bileşikler bu tür işlemleri gerçekleştirirler. Ya da reaktif oksijen türlerinin bağlanması ile zincir reaksiyonlarının kırılmasını gerçekleştirerek fonksiyonlarını engelleme prosesi zincir kırıcı etki olarak meydana gelmektedir. Hemoglobin ve mineraller zincir kırıcı etkiye sahiptirler. Dördüncü ve son etki olarak, serbest radikallerin sebep olduğu bozuklukların onarılması işlemi de onarıcı etki olarak bilinmektedir. Antioksidanlar, sentetik ve doğal (endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı) olabilirler (Altınışık 2000).

### 1.5. Sentetik Antioksidanlar

Yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlara örnek olarak aromatik fenol halkası ihtiva eden BHA, BHT, TBHQ ve Trolox verilebilir (Gülçin 2012).



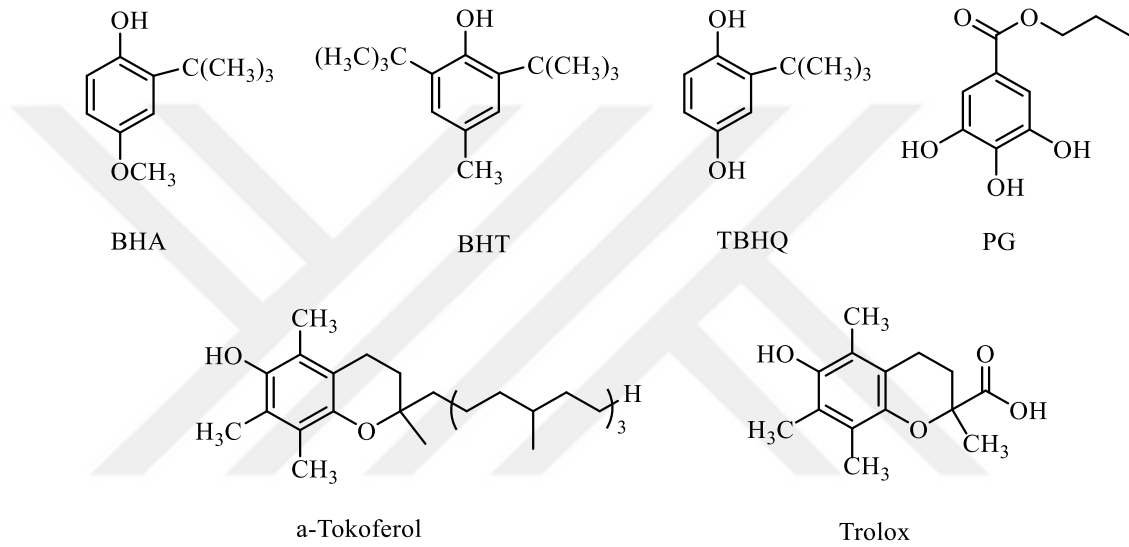
**Şekil 1.3.** Yaygın olarak kullanılan bazı sentetik antioksidanlar

Açık yapıları yukarıda verilmiş olan sentetik antioksidanlar farmakolojik uygulamalarda ve gıda sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Katı ve sıvı yağlarda çözünürlüğü arttırmak amacıyla tercihen sentetik antioksidanlar kullanılır (Hudson 1990). Bununla birlikte Bütillenmiş hidroksianisol ve Bütillenmiş hidroksitoluen'nin zehirli ve kanserojen etkileri olduğu hakkında bazı şüphelere varıldığından dolayı gıda sektöründe kullanımları yasaklanmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu sebeple, günümüzde gıda uygulamalarında güvenli ve doğal antioksidanlara olan ilgi giderek artmaktadır. Böylece tüketicilerin de doğal antioksidanları tercih etme girişimi, doğal antioksidanların keşfedilmesine ve tanınmasına olanak sağlayarak kayda değer gelişmelerin hızlanmasına katkı sağlamaktadır (Gülçin 2006b; 2007).

Gıda sektöründe kullanılan bu dört antioksidanın kullanım oranları yağ ve gıda içeriği %0,02 olarak sınırlandırılmıştır (Simic 1981). Bitki kaynaklı yağlar için kullanılan antioksidan TBHQ iken kızartılmış yağ ve gıdaları içeren ürünlerde ise BHA ve BHT sabitleştirici olarak kullanılır. Sentetik antioksidan olan BHA ve BHT gibi antioksidanlar beraber kullanıldıklarında sinerjik etkiler gösterebilmektedirler (Sherwin 1972; Omura 1995). Gösterdikleri bu sinerjik etkinin yanında sergiledikleri antioksidan kapasitelerinde de artış olur (St. Angelo 1996). BHA ayrıca propil gallat ile birlikte kullanıldığında da yine sinerjik etki gösterir. Bununla birlikte, sentetik antioksidanlar için toksik davranışları büyük oranda test edilerek elde edilen çalışma sonuçlarına göre uzun vadede kullanımlarının zararlı olduğu belirlenmiş ve bu nedenle de tavsiye edilmemektedir. Bu sebeptendir ki doğal ürünler ve bünyelerindeki doğal antioksidanlar daha güvenilir ve daha sağlıklı olduğu düşünülerek daha çok tercih edilmektedirler (Valenzuela and Nieto 1996). Yaklaşık son 40 yıldır doğal antioksidanların kullanımları artarak, sentetik antioksidanların yerini almaya başlamış ve daha çok önemsenmiştir.

Endüstri sektöründe gıdaların raf ömrünü uzatmak için genel olarak kullanılan antioksidanlar sentetik antioksidanlardır. Fakat yapılan birçok araştırma sonuçlarına göre endüstri alanında besinlerin işlenmesi sırasında kullanılan BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanların organizmalarda teratojenik ve karsinojenik etkiler sergilediklerine dikkat çekmiştir (Gülçin *et al.* 2003). Bitkisel kaynakların içeriğindeki

fenolik bileşikler serbest radikalleri giderdikleri ve metal iyonları ile kompleks oluşturabildikleri için antioksidan etki göstermektedirler (Sherwin 1990; Wanasundara and Shahidi 1998; Fernandez Lopez *et al.* 2005; Gülçin *et al.* 2005b; 2006a). Bu sebeple de uzun zamandır, besinlerdeki tat ve koku özelliklerini arttırmada katkı maddesi olarak doğal aromatik bitki ve baharatların kullanımını giderek artmaktadır. Yani tüketicilerin tercihi sentetik antioksidanlardan değil doğal antioksidanlardan yana olmaktadır.



**Şekil 1.4.** Bazı standart antioksidanların açık yapıları (Gülçin 2012)

**Çizelge 1.1.** Doğal ve sentetik antioksidanların kıyaslanması (Gülçin 2012)

<b>Sentetik Antioksidanlar</b>	<b>Doğal Antioksidanlar</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maliyeti azdır</li> <li>• Uygulama alanı geniştir</li> <li>• Kullanımları giderek azalmaktadır</li> <li>• Bazı çeşitlerinin kullanımı yasaktır</li> <li>• Düşük çözünürlüğe sahiptirler</li> <li>• Bu antioksidanlara ilgi azalmaktadır</li> <li>• Bazıları adipoz dokuda depolanmaktadır</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maliyeti fazladır</li> <li>• Kullanım alanı sınırlıdır</li> <li>• Zararsız ve güvenilir oldukları düşünülmektedir</li> <li>• Kullanım ve uygulama alanları artmıştır</li> <li>• Yüksek çözünürlüğe sahiptirler</li> <li>• Bu antioksidanlara ilgi artmaktadır</li> <li>• Tamamı metabolize olmaktadır</li> </ul>

Serbest radikallerin sebep olduğu zararlı reaksiyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve onları stabilize etme kapasitesine sahip maddeler antioksidan maddeler olarak adlandırılmaktadırlar (Elliot 1999). Antioksidan sistemler mekanistik olarak iki grupta incelenmektedir. Bunlar, birincil ve ikincil antioksidan sistemler olarak adlandırılır. Birincil antioksidanlar olarak adlandırılan grup, ortamda bulunan radikaller ile reaksiyona girer ve bu zararlı moleküllerin zararlı özelliklerini azaltarak meydana gelebilecek yeni serbest radikallerin oluşmasını engelleyen sistemlerdir (Diplock 1998).

İkincil antioksidan grubunda ise; reaktif olan oksijen radikalini yakalayarak radikal zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyen E vitamini, C vitamini, bilirubin, ürik asit, polifenolik bileşiklerdir (Ou *et al.* 2002b). Antioksidanların başka bir sınıflandırması da vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlardır (Ak 2006).



**Çizelge 1.2.** Antioksidan çeşitleri ve örnekler (Gülçin 2002; 2012)

<b>Antioksidanlar</b>			
<b>Enzimler</b>	<b>Küçük moleküller</b>	<b>Sentetik</b>	<b>Doğal</b>
• CAT	• Glutasyon	• BHA	• C Vitamini
• POD	• Melatonin	• BHT	• Flavonoidler
• GPx	• Metal	• TBHQ	• Karotenler
• GR	bağlayıcılar	• Propilgallat	• Tokoferoller
• SOD	• (Hmg, Myg vb.)		

İnsan vücudunda çok önemli antioksidan enzim sistemleri mevcuttur. Bunlar Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidazlardır. Bu antioksidan enzim sistemlerinin bünyelerinde bazı metal iyonlarının varlığı önemlidir. Mesela; Süperoksit dismutaz bünyesinde bakır, çinko ve manganez; Glutasyon peroksidaz yapısında da selenyum bulunmalıdır ki bu enzimler katalizleme yapabilsin. Bünyelerinde metal iyonu bulundurması gereken bu tür enzimlere metaloenzim de denir. Hücre dışı ortamların antioksidan savunma sistemleri ise, tokoferoller, askorbik asit, ferritin, transferrin, bilirubin, melatonin, seruloplazmin, hemoglobin, glutasyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin,  $\beta$ -karoten, koenzim Q<sub>10</sub>,  $\alpha$ -Lipoik asit ve  $\alpha$ -1 antitripsin gibi moleküllerden oluşmaktadır (Halliwell 1991; Altınışık 2000; Kasnak ve Palamutoğlu 2015). Organizmalardaki bu farklı ve doğal antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin kontrolünü sağlayarak vücudu bu zararlı moleküllerden korumaktadır. Ayrıca organizmalarda doğal olarak bulunan bu antioksidan moleküller hem farklı hücrelerde lokalizedirler hem de farklı serbest radikaller üzerinde etki gösterdikleri için hepsi birden tamamlayıcı özellik taşırlar (Diplock 1998).

**Çizelge 1.3.** Oksidanlar ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998)

Oksidan Kaynaklar	Antioksidan sistemler
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sigara dumanı</li> <li>• Aşırı egzersiz</li> <li>• Çevresel kirlilikler</li> <li>• Yüksek ateşli rahatsızlıklar</li> <li>• Radyasyon</li> <li>• Çift bağ içeren bazı yağ asitlerin metabolizması</li> <li>• İskemi</li> <li>• Karsinojenler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Süperoksit dismutaz</li> <li>• Katalaz</li> <li>• Glutatyon peroksidaz</li> <li>• Glutatyon</li> <li>• Ubikinon</li> <li>• Selenyum</li> <li>• A vitamini</li> <li>• C vitamini</li> <li>• E vitamini</li> </ul>

İnsan vücudundaki antioksidan dengesi, kişinin yaptığı diyetle değiştirebilir. Yanlış beslenme nedeniyle ortaya çıkan besin yetersizliğine bağlı olarak vücuttaki savunma sistemlerinde tahribat söz konusu olduğu zaman hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak da serbest radikal miktarındaki artış ve buna karşın vücuttaki antioksidan savunma sistemlerindeki yetersizlik nedeniyle ortaya çıkan bu dengesizlik ile oksidatif stres meydana gelir.

Vücuttaki bu doğal antioksidan savunma sistemlerinin etkili olabilmesi için; karotenoidler, C ve E vitaminleri gibi molekülleri ihtiva eden gıdaların yeterli miktarda alınması gerekmektedir (Duthie *et al.* 1989).

E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol) çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde yer alan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturmaktadır. E vitamini süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Ayrıca lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu da E vitamini vasıtası ile sonlandırılabilir (Altınışık 2000).

Tokoferoller, yağda çözünen bir antioksidan olmasının yanında hücre membranlarında lokalize olmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı koruyabilen moleküllerdir (Diplock 1998). Diyetle alınan yüksek miktarlardaki E vitamini, LDL seviyelerini önemli bir biçimde arttırdığı ve serbest radikallere karşı da güçlü bir biçimde koruduğu bildirilmektedir (Reaven *et al.* 1993; Gülçin 2012).

C vitamini (askorbik asit) ise, vücutta ekstraselüler sıvıda yer alan ve suda çözünen bir antioksidandır. Askorbik asit hem indirgen bir ajandır hem de E vitamini rejenere etmektedir (Diplock 1998; Gülçin 2012). C vitamini organizmalarda birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak işlev görmektedir. Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için elzemdir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin  $\beta$ -hidroksilaz basamağında görev alır. Tirozin yıkımında ise *p*-hidroksi fenil pürivatın homogentizata oksidasyonunda rol almaktadır. Safra asitlerinin sentezindeki 7- $\alpha$ -hidroksilaz başlangıç basamağında rol alır. Lizinden karnitin sentezinde rol alır. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak rol oynar, midede ferri demiri ferro demire indirger. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkilidir. Askorbik asit, süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdaki uzaklaştırıcı etkiye sahiptir. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayıdır ki C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidanı olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği belirtilmiştir (Altınışık 2000).

A vitamininin ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü belirlenmiştir (Altınışık 2000). Gıdalarda bulunan bazı karotenoidler  $\beta$ -karoten, likopen ve luteindir.  $\beta$ -karoten sarı, turuncu sebzelerde ve meyvelerde ayrıca

yeşil sebzelerde bulunur. Likopen ise domateste bol miktarda bulunur. Lutein de brokolide ve lifli olan yeşil renkli sebzelerde bulunur (Diplock 1998; Gülçin 2012).

Bitkisel kaynaklarda bulunan fenolik bileşikler önemli bir antioksidan sınıfındadırlar. Bu bileşikler antioksidan özelliklerini hidrojen verici olmalarından, tekli oksijen yakalayıcı olmalarından, indirgen ajan olarak davranmalarından ve metal şelatlama gibi fonksiyonlara sahip olmalarından almaktadırlar (Rice-Evans *et al.* 1995).

Çinko, bakır, selenyum ve manganez gibi mineraller de antioksidan enzimlerin yapılarında bulunarak katalizlemede yardımcı oldukları için antioksidan savunma sistemi için büyük öneme sahiptir (Diplock 1998). Çinkonun antioksidan etkisi serbest radikal oluşumunu engelleyici ve oksidatif stresten koruyucu rolünden kaynaklanır. Redoks stabil olan çinko, kritik selüler ve ekstraselüler bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif olan metallerin yerine geçer. Ayrıca çinko antioksidan özellikli bir enzim olan süperoksit dismutazın ve dokuları serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan metalotiyoneinlerin yapılarında bulunmaktadır (Belgemen and Akar 2004). Bakır biyolojik sistemlerde hem antioksidan hem de peroksidan olarak etki göstermektedir. Bu sebeple de vücuda optimum düzeyde alınması gerekmektedir. Bakır alımının yetersizliğinde vücutta antioksidan denge bozulmakta ve buna bağlı olarak da lipid peroksidasyonu ve hücre tahribi artış göstermektedir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan karakterli enzimlerin miktarı bakır yetersizliğinde azalmakta ve sonuç olarak vücudun antioksidan savunma sistemi çökerek oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Velioğlu 2000). Selenyum insan beslenmesinde çok önemli bir mikrobeseleyici olarak kabul edilmiştir. Bunun sebebi vücuttaki dokulardan oksidatif hasarı önleyen bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazın ayrılmaz bir parçası olmasıdır. Selenyumun çeşitli deneysel modellerde tümör oluşumunu azalttığı görülmüştür. Yapılan hayvan modelli çalışmalarının üçte ikisinde selenyum eklenmesi ile tümör insidansında düşme saptanmıştır. Antioksidan etkisi, immün fonksiyonları arttırması, karsinojen metabolizmasını değiştirmesi, yüksek selenyum varlığında metabolitlerin yüksek toksisitesini sağlaması ve testosteron üretimini baskılaması gibi

selenyumun antikanserojenik etkisini açıklamada ileri sürülen çok sayıda potansiyel mekanizma vardır (Sunay 2010).

**Çizelge 1.4.** Bazı antioksidan türleri ve buldukları besin kaynakları (Diplock 1998)

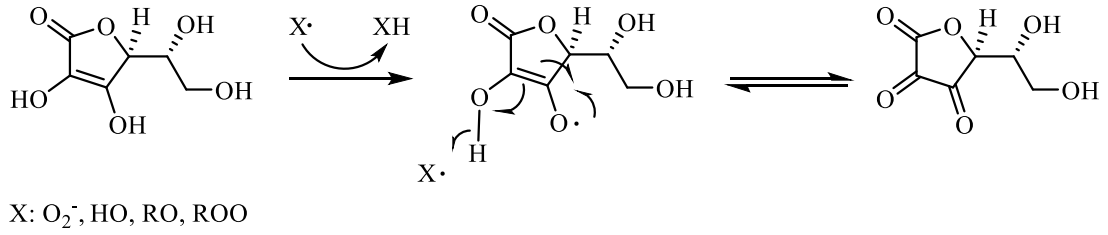
Antioksidanlar	Antioksidan İçeren Bazı Besinler
• Askorbik asit (C vitamini)	Maydanoz, yeşilbiber, ıspanak, asma yaprağı, brokoli ve benzeri yeşil sebzeler
• Tokoferol (E vitamini)	Bitkisel yağlar, sebzeler, yağlı tohumlar, tahıl taneleri, kuru baklagiller
• Polifenolik bileşikler	Soğan, patates, lahana, brokoli, ıspanak, erik, siyah üzüm, turunçgiller, yeşil çay
• Karotenoidler (likopen, lutein ve karoten)	Havuç, domates, portakal, ıspanak, brokoli, lahana ve benzeri yeşil ve sarı sebze ve meyveler, balık, süt, yumurta
• Selenyum	Tahıl ürünleri, baklagiller, et ve balık

### 1.6. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar ya organizma tarafından sentezlenen ya da dışarıdan besinlerle alınan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak organizmalarda sentezlenen antioksidanların sentezi yaş ilerledikçe azalmaktadır. Uzmanlar bu açığın kapatılabilmesi için bitkisel antioksidanların iyi bir alternatif olduğunu düşünmektedirler (Taner 2005). En önemli kaynağı meyve ve sebze olan bitkisel antioksidanlar anormal hücre çoğalmalarını engelleyen ve oksidasyondan dolayı zarar gören hücreleri koruyan bir görev üstlenirler (Brown 1999). Diyetle alınan doğal antioksidanların en önemlilerine askorbik asit, tokoferoller, flavonoidler ve karotenoidler örnek olarak verilebilir. Askorbik asit dışındaki saydığımız bu doğal antioksidan grubunda yapısal olarak çok çeşit bileşik bulunmaktadır. Örnek olarak; karotenoid grubunda 600'den fazla farklı bileşik yapısı mevcuttur, ancak bunların sadece %50'si karakterize edilmiştir (Sies and Stahl 1995; Rice-Evans and Miller 1996;

Gülçin 2012). Bunlara ilaveten bitkisel kaynaklı bu antioksidanlar vücut içerisinde bir araya geldiğinde sinerjik etki oluşturabilmektedirler (Diplock *et al.* 1998; Gülçin 2012).

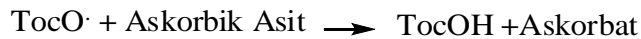
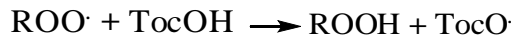
Askorbik asit oldukça basit yapıda bir vitamin olup, beyaz kristal halde bulunan bir tozdur. En az zararlı doğal antioksidan olma özelliğine sahip askorbik asit suda çözünen bir yapıya sahiptir. Askorbik asit özellikle meyve ve sebzelerde bulunur. Limon, portakal, çilek, kivi, kiraz, brüksel lahanası, beyaz lahanası, domates, yeşil biber fazla miktarda askorbik asit ihtiva etmektedirler. Aynı zamanda birçok memeli türü karaciğerindeki glukozdan C vitamini sentezleme yeteneğinde olmasına rağmen insanlar için bu durum mümkün değildir (Kasnak ve Palamutoğlu 2015). Bunun sebebi insanlarda askorbik asit sentezi için esansiyel olan gulonolakton oksidaz enziminin olmayışıdır (Nishikimi *et al.* 1994; Nishikimi and Yagi 1996). C vitamini insanlarda hastalıklara yol açabilecek potansiyele sahip birçok türü okside edebilmektedir (Buettner 1993; Halliwell 1999). Bu türler oksijen radikalleri (süperoksit radikali, hidroksil radikali ve peroksi radikali), sülfür radikalleri ve nitrojen-oksijen radikalleri, hipokloröz asit, nitrozaminler, nitroz asit bileşikleri, ozon gibi radikal olmayan reaktif bileşiklerdir (Neuzil *et al.* 1997). C vitamini kollojen doku sentezinde, metal iyonlarının metabolizmasında, anti-histamin reaksiyonlarında ve bağışıklık sisteminin geliştirilmesinde gereklidir. Bunun yanında kalp damar hastalıkları, çeşitli kanserler ve sinirsel rahatsızlıklar gibi dejeneratif hastalıkların riskini azaltmada, serbest radikallerin indüklediği DNA hasarlarını önlemede ve katarakt gelişimine yol açan oksidanları yok etmede önemli bir rol oynamaktadır. Askorbik asidin N-nitroso bileşiklerin oluşumunu inhibe ederek kanseri önlediği ve bağışıklık sistemini uyardığı ileri sürülmektedir (Koca ve Karadeniz 2005). Askorbik asit bir oksidan ile reaksiyona girdiği zaman bir elektron transfer ederek radikal zincir reaksiyonlarının sona ermesini sağlamaktadır. Askorbik asit bir tane elektron transferini sağlayan önemli bir antioksidandır. Askorbik asit redükleyici etkisi ile konjuge bir sistem oluşturur ve böylece güçlü bir antioksidan özelliği gösterir. Bu durumu açıklayan mekanizma aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Gülçin 2012).



**Şekil 1.5.** Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması

Askorbat, reaktif oksijen türleri ile muamele edildiğinde dehidroaskorbik asit molekülü askorbik asite okside olur. Bu kademede katalizleme yapan enzim ise dehidroaskorbat redüktaz enzimidir ve dönüşümlü bir katalizleme gerçekleştirir.

Yakın dönemlerde, Bursal (2009) tarafından, liyofilizasyon tekniği ile kivi meyvesinden sulu ortamda elde edilmiş 100 g ekstraktında (*Actinida deliciosa*) 105 mg askorbik asit (C vitamini) bulunduğu saptanmıştır. Tokoferol lipid peroksidasyonu sırasında tokoferolsil radikaline dönüşebilmektedir (Niki *et al.* 1982; 1985; Gülçin 2012). Yapılan bazı çalışmalar, *in vitro* ortamda C vitamininin tokoferoksil radikalini rejenere etmesiyle tokoferole çevirme kapasitesinin olduğunu ortaya koymuştur.

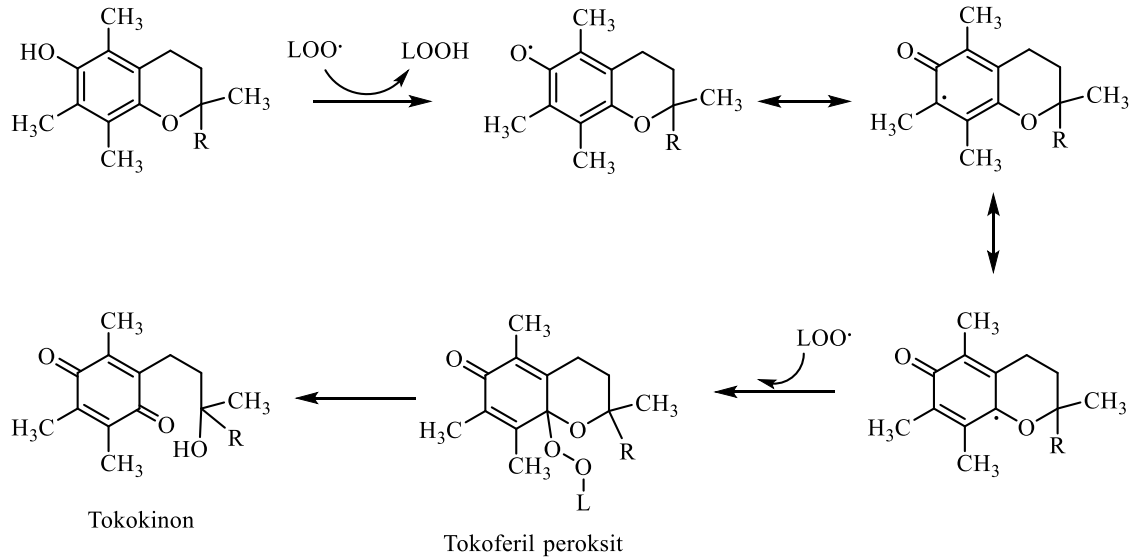


**Şekil 1.6.** C Vitamininin Tokoferoksil radikalini rejenere etme reaksiyonu diyagramı

E vitamini etkisi gösteren bileşikler, kimyasal olarak tokoferoller olarak adlandırılırlar (Gülçin *et al.* 2005a; Gülçin 2012). Yaygın olarak kullanılan antioksidanlar arasında en iyi antioksidan etkisi gösteren bileşiklerin tokoferoller olduğu belirlenmiştir (Pokorny 1988). Tokoferoller de tokoferol ve tokotrienol olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Tokoferoller  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ - şeklinde yapılarına sahip olduğu ve toplamda da 2 gruba ayrıldığı için 8 tane farklı bileşik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında E vitamini aktivitesi en yüksek olan tokoferol ise  $\alpha$ -Tokoferoldür (Shadidi 2000). Tokoferoller eser miktarda da olsa tüm besinlerde bulunmaktadır.

Besinlerde özellikle mısır, soya, buğday ve pamuk yağında bulunmaktadır. Hücre içi ve hücre dışı ortamlarda bulunabilen bir vitamin olan  $\alpha$ -Tokoferol yağda çözünebilen ve hücre membranını oksidasyonlardan koruyan bir özelliğe sahiptir (Godbout *et al.* 2004). Yaygın bir biçimde  $\alpha$ -Tokoferol Avrupa’da,  $\gamma$ -Tokoferol ise Amerika diyetlerinde yer almaktadır (Jiang *et al.* 2001).

E vitamini dokularda bulunan eksojen kaynaklı en önemli lipofilik antioksidandır. E vitamini serbest radikal ve tekli oksijen tutucu olarak görev yapan çok aktif bir yapıdadır. Ultraviyole, radyasyon gibi serbest radikal üreten faktörlere karşı cildi korur (Di Mambroa *et al.* 2003). E vitamininin bazı hastalıkların tedavisinde yararlı olduğu tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyonunu önleyerek vücuttaki biyolojik sistemi korur. Ayrıca oksitleyici ajanların neden olduğu kemikteki kalsiyum kaybını önler. E vitamininin tokotrienol türevinin göğüs kanserinin ilerlemesini önlediği ve kanda kolesterolü indirgeyici etki gösterdiği belirtilmiştir (Al-Attar 2011). Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması Şekil 1.7’de gösterilmiştir.

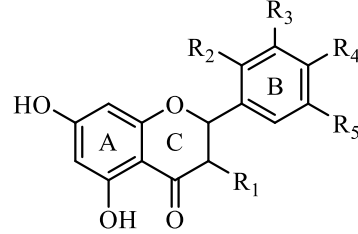


**Şekil 1.7.**  $\alpha$ -Tokoferolün serbest radikalleri giderme mekanizması

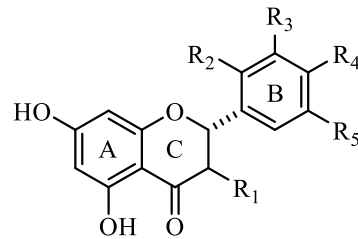


Mantarlar, miokroorganizmalar ve hayvan dokuları doğal antioksidanlar bulundurlar. Bitkisel kaynakların sekonder metabolitleri olan fenolik bileşikler de doğal antioksidanlardır. Bu aromatik antioksidan bileşikler hem insanlar hem de hayvanlar için büyük öneme sahiptirler (Gülçin 2006b; 2012). Polifenolik bileşikler hemen hemen tüm meyve ve sebzelerde az veya çok miktarda bulunurlar. Fakat polifenoller bakımından meyveler sebzelere göre daha zengindir. Polifenollerin bir kısmı ürünlerin lezzetine ağızda buruk bir tat bırakma yönünde etkilidirler. Diğer taraftan polifenollerin bir kısmı renkli olduklarından, meyve ve sebzelerin renkleri üzerinde etkilidirler. Bütün bunlara ilaveten polifenoller, fenol oksidaz enzimleriyle enzimatik renk esmerleşmesine neden olan önemli bir madde grubudur (Cemeroğlu ve Acar 1986). Polifenollerin antioksidan aktivitesi serbest radikalleri bağlama kapasitesi veya demiri indirgeme gücüne dayanmaktadır (Yoshino and Murakami 1998; Pulido *et al.* 2000). Polifenoller olarak isimlendirilen antioksidanlar en zengin biyoaktif bileşiklerdir ve bu bileşiklerin diyetdeki günlük 1 g'nın tüketimi, C vitamini tüketimine göre 10 kat daha değerlidir (Scalbert *et al.* 2005). Bu sebeple de polifenoller güçlü antioksidanlar olarak görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda polifenollerin *in vivo* şartlarda endotelial fonksiyon artırıcı (Caton *et al.* 2010), hücrel sinyal iletimine katkı sağlayıcı ve iltihap önleyici özellikleri gibi pek çok önemli etkilerinin olabileceği ortaya konulmuştur (Williams *et al.* 2004; Sies *et al.* 2005; Ramos 2008). Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle biyoflavonoid ve kılcal dolaşım sisteminde geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncı düşürücü etkisi göz önünde tutularak P faktörü (Permeabilite Faktörü) veya P vitamini adıda verilmektedir (Anonim 2006). Fenolik bileşikler antioksidan karakterlidir ve bu tür moleküllerin en önemlileri tokoferol, flavonoid ve fenolik asitlerdir (Gülçin 2012). Tüm bitkisel kaynaklarda ortak olarak bulunan moleküllerden olan flavonoidler, çeşitli bitki türlerinin kök, gövde, yaprak ve tohumlarından izole edilmiş 4 000'den çok flavonoid olmakla birlikte totalde 8 000'e yakın polifenolik bileşik belirlenmiştir (Harborne *et al.* 1999). Flavonoidler genel olarak üç halkalı ve 15 karbonlu flavan yapısından oluşmaktadır. Çizelge 1.5'de A, B ve C olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 1.5. Flavonoidlerin kimyasal yapıları (Gülçin 2012)

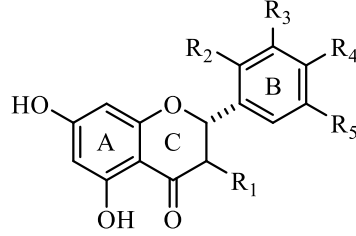


		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Flavonlar</b>	Apigenin	H	H	H	OH	H
	Cyrsin	H	H	H	H	H
	Luteolin	H	H	OH	OH	H
<b>Flavanoller</b>	Datiscetin	OH	H	OH	OH	H
	Quercetin	OH	H	OH	OH	H
	Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
	Morin	OH	OH	H	OH	H
	Kaempferol	OH	H	H	OH	H

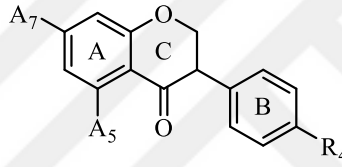


		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Flavanonlar</b>	Hesperetin	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
	Naringenin	H	H	H	OH	H

Çizelge 1.5. (devam)



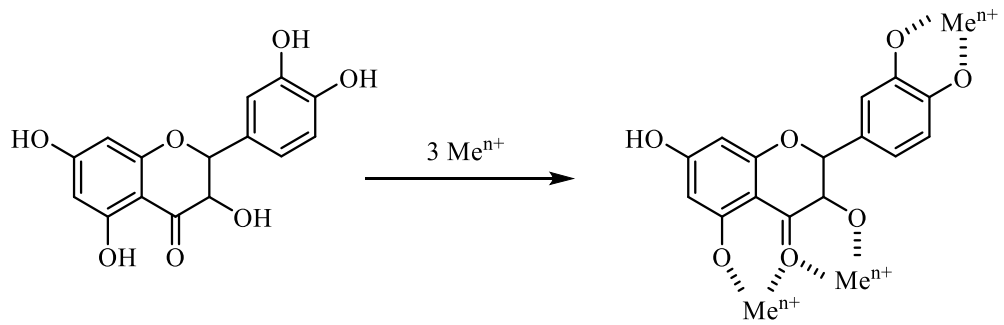
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Flavanonol</b>	Taksifolin	OH	H	OH	OH	H



		A <sub>5</sub>	A <sub>7</sub>	R <sub>4</sub>
<b>İzoflavon</b>	Genistein	OH	OH	OH
	Genistin	OH	Oglc	OH
	Daidzein	H	OH	OH
	Daidzin	H	Oglc	OH
	BiochaninA	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	Formononetin	H	OH	OCH <sub>3</sub>

Flavonoidler güçlü antioksidan özelliğine sahip olan bileşiklerin başında gelir ve LDH'nin oksidasyonunu azaltması sayesinde kalp damar hastalıklarına karşı koruma sağlamış olur. Bu nedenle de insan diyetinde yer alması gereken bir besin kaynağı olarak nitelendirilmektedir. Flavonoidlerin günlük alınması gereken düzey 100 mg'ın üzerindedir (Dragsted *et al.* 1997). Flavonoidler önemli düzeyde antioksidan ve

şelatlama özelliklerine sahip difenilpropanoidler olup genellikle bitkilerde bulunmakta ve insan vücudunda sentezlenememektedir. Flavonoidler bitki ekolojisinde farklı rollere sahiptirler. Örnek olarak, çiçeklerdeki ve meyvelerdeki sarıdan kırmızıya ve hatta koyu mor rengine kadar çeşitli renklerden sorumlu moleküllerdir. Flavonoidlerin serbest radikal savar olmaları, enzim aktivitelerini düzenleyici, hücre çoğalmasımı inhibe edici antibiyotik ve antiallerjen özellik taşımaları, ishal, ülser ve iltihap önleyici ilaçlar gibi davranmaları önem taşımaktadır (Çapanoğlu ve Boyacıoğlu 2009). Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar ile flavonoidlerin oksidatif DNA hasarını serbest radikal tutulması dışındaki mekanizmalar ile de önlediği gösterilmiştir. Bu mekanizma vücut tarafından üretilen Glutasyon-S-Transferaz (GST) gibi antioksidan enzim sistemlerinin korunup ve güçlendirilmesi yoluyla da gerçekleştirilebilmektedir. Flavonoidlerin çoğu GST enzimlerini aktive etme yeteneğine sahip ve istatistiksel olarak da ciddi anlamda GST aktivitesini arttırarak etki göstermektedir. GST'nin mutajenik potansiyeli bulunan ksenobiyotikleri detoksifiye ederek etkili olduğu düşünülür (Coşkun 2005). Antioksidan kapasitesi bakımından en önemli flavonoidler; Antosiyaninler, Proantosiyanidinler, Kateşinler (Flavanoller)'dir. Flavonoidler oksidatif hasara karşı korumada ve yine bazı antioksidan enzim sistemleri ile spesifik olarak etkileşmeleri sonucu bu enzimlerin aktivitelerinde artış sağlayarak önemli bir antioksidan yararı sağlamaktadırlar (Middleton and Kandaswami 1992; Rice-Evans and Miller 1996; Williams *et al.* 2004). Flavonoidler özellikle metal şelatlama kapasitesi ve radikalleri gidermeleri sayesinde antioksidan özellik sergilemektedirler. Aşağıdaki şekilde (Şekil 1.8) metal şelatlama ile ilgili mekanizma verilmiştir (Gülçin 2012).



**Şekil 1.8.** Flavonoidlere ait metal şelatlama mekanizması

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, doğal antioksidan kaynaklı besinlerin kanser, kardiyovasküler ve katarakt gibi hastalıkların meydana gelme riskini azalttığını ortaya koymaktadır. Bu önleyici etkileri sayesinde sebze ve meyvelerin yapısında yer alan ve antioksidan özellik gösteren karotenler ilgi odağı olmuştur (Baysal and Ersus 1999; Göçer and Gülçin 2011).

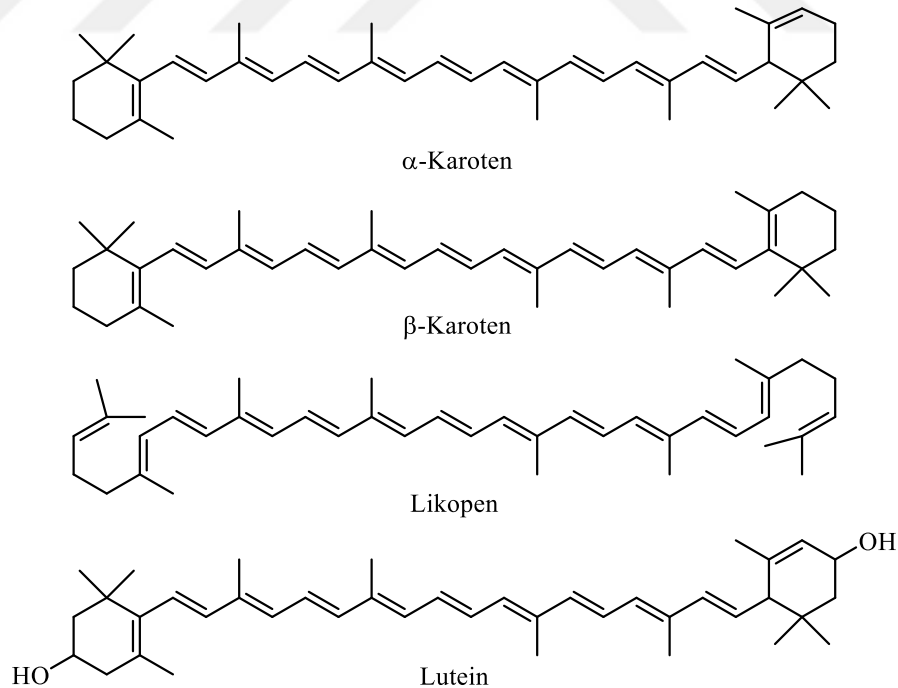
Karotenoidler algler, fitoplankton, bazı mantar türleri ve bakteriler ayrıca bitkiler tarafından sentezlenebilmektedirler. Pigment kaynağı olan karotenoidlerin 700'den fazla yağda çözünebilir yapıları mevcuttur. Karotenoidler sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunan sarı, turuncu ve kırmızı renkteki pigmentlerdir. Suda erimezler ve genellikle bitkisel yağlarda çözünebilir bir yapıya sahiptirler (Cemeroğlu ve Acar 1986). Doğada en yaygın olarak bulunan pigment maddeleri karotenoidlerdir. Karotenoidler isimlerini ilk kez karakterize edildikleri havucun latince isminden (*Daucus Carrota*) almışlardır. Karotenoidler metil grupları ihtiva eden, konjuge çift bağ içeren bir yapıya sahiptir. Karotenoidler lipoproteinler ile taşınırlar. Karotenoidlerin yararlı etkilerini destekleyici birçok çalışma yapılmıştır, sonuç olarak karotenoidlerin kalp rahatsızlıkları riskini azaltması açısından önemli antioksidanlar olabileceğini göstermesine rağmen daha fazla deneysel ve epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır (Palace *et al.* 1999).

Gelişen dünyamızda, beslenme imkânlarının artması ile insanlar, coğrafi koşullar, iklim şartları gibi engelleri aşarak yeni beslenme alışkanlıkları edinmişlerdir. Yanlış beslenme alışkanlıkları ve bunların ortaya çıkardığı tıbbi problemler arttıkça, sağlıklı yaşamın ve hastalıklarla mücadelenin en temel kurallarından birinin sağlıklı beslenme olduğu ortaya çıkmıştır. Böylece besinler ve vücuda etkileri, en önemli araştırma konularından biri haline gelmiştir. Bir yandan ideal diyetler ve mutfak kültürleri, diğer yandan kalori hesapları ve tıbbi tedavi edici veya hastalıkları önleyici etkileri olan gıda maddeleri, birçok bilim dalı ve adamı tarafından araştırılmıştır. Epidemiyolojik incelemeler meyve ve sebze tüketimi ile özellikle kanser sıklığı arasındaki ilişkinin sürekli olarak negatif olduğunu göstermektedir. Bu ilişki karotenoidler için de geçerlidir (Baysal and Ersus 1999; Gülçin 2012). Besinlerde bulunan karotenoidler 8 adet 5 karbonlu izoprenoid biriminden oluşmuştur. Tümüyle trans formudur. Bazıları tamamen doğrusal (likopen

gibi) ve bazıları da  $\gamma$ -karotende olduğu gibi iki uçtan halkalı bir yapıya sahip olabilmektedirler. Karotenoidler, fotosentetik mikroorganizmaların ya da bitkilerin metabolizma için temel rol oynayan kısımları tarafından sentezlenirler. Yaşayan organizmalardaki pek çok pigment (karotenoidler, klorofiller, antosiyaninler ve porfirinler) çok çeşitli renk oluşumundan sorumludurlar. Açık sarıdan koyu kırmızıya varan farklı tonlarda renk oluşumundan sorumlu olan karotenoidler, proteinler ile kompleks oluşturduklarında mavi yeşil renk verirler. Uzun hidrokarbon zinciri içeren karotenoidler apolar lipofilik moleküllerdir. Ancak organik çözücülerde bir dereceye kadar, katı ve sıvı yağlarda çözünürler. Karotenoidlerin antioksidan özellikleri, onların kimyasal yapılarının tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40C ününün kuyruk kuyruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucudur. Bu yapının sağladığı radikal toplama özelliği, çoğu epidemiyolojik olmak üzere, yapılan araştırmalarda bazı kanser tipleri, kalp rahatsızlıkları ve dejeneratif göz hastalıklarında koruyucu etkisinin tespitiyle ortaya konmuştur (Bramley 2000; Khachik *et al.* 2002). Karotenoidler oksidasyondan ve buna bağlı olarak da kanserlerden koruyan bir özelliğe sahiptirler. Antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu düşünülen en önemli karotenoidler;  $\beta$ -Karoten, Likopen ve Lutein'dir.  $\beta$ -Karoten bitkilere sarı, kırmızı ve turuncu rengini verir. Özellikle havuç gibi turuncu renkli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan  $\beta$ -Karoten ısıya, oksijene ve ışığa son derece duyarlıdır. Ayrıca  $\beta$ -Karoten A vitamininin provitaminidir. Vücutta A vitamini bakımından eksiklik olduğu durumda  $\beta$ -Karoten A vitaminine dönüşür.  $\beta$ -Karoten çift bağ içeren doymamış yağların oksidasyonunu önlemesi sayesinde serbest radikal oluşumuna olanak vermemektedir, bu nedenle de önemli bir antioksidan olarak bilinir (Gülçin 2012).

Karotenoidlerin doğada bol miktarda bulunması, hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplara sahip olması, kanserlere karşı koruyucu özellikte olması ve provitamin A aktivitesi göstermesi sayesinde gıda endüstrisi alanında da çok önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda da sentetik gıda boyar maddelerinin kullanımındaki sınırlandırmalar doğal renk maddesi olarak kullanılabilen karotenoidlere ilgiyi arttırmıştır (Gülçin 2012).

Üzerinde en çok durulan ve araştırma odağı olan karotenoid  $\beta$ -karotendir. Daha önce de bahsedildiği gibi provitamin A olan  $\beta$ -karoten bağırsaklarda epitel hücrelerinde A vitamini dönüşür ve karaciğerde de palmitik asit esteri olarak depolanır. Kimyasal yapısı bakımından karotenoid olan ve terpenoid grubunda yer alan  $\beta$ -karoten genelde havuçta ve yeşil yapraklı bitkilerde bulunur. Kardiyovasküler hastalıklardan ve kansere karşı koruma, antioksidan etki gösterme, tümör gelişmesini engelleme, fotosentez sırasında zararlı ışıklara karşı koruyucu etki gösterme ve immün sistemi güçlendirme gibi özellikleri olduğu belirtilmektedir. Bu sebeplerle de  $\beta$ -karoten ilaç ve gıda endüstrisinde çok büyük öneme sahiptir (Gülçin 2012). Karotenoidlerden doğada en çok bulunanı Luteindir. Lutein ise sadece bitkiler tarafından sentezlenen, ıspanak, lahana gibi yeşil sebzelerde bol miktarda bulunan bir karotenoiddir. Singlet oksijenin ve serbest radikallerin giderilmesini sağlayarak hücreleri oksidatif stresten korurlar (Tee 1992). Önemli karotenoidlerden olan  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, Likopen ve Lutein'in açık yapıları aşağıda verilmiştir (Gülçin 2012).



**Şekil 1.9.** Bazı karotenoidlerin kimyasal yapısı

Karotenoidlerden olan likopen de  $\beta$ -karoten gibi antioksidan aktivite sergilemektedir. Likopen'in kimyasal yapısı 11 konjuge çift bağı (trans formda) asiklik karotenoid olarak açıklanır. Likopen aynı zamanda konjuge karbon-karbon çift bağları sayesinde antioksidan özellik göstermektedir. Likopen 8 tane izopren birimlerinden meydana gelen ve kırmızı renk veren bir pigmenttir. Likopence en zengin kaynak domatestir bunun yanında, karpuz, pembe greyfurt, kuşburnu ve papayada bulunan ve onlara rengini veren en önemli karotenoiddir (Giovanucci *et al.* 1995). Bitkilerin yapısında bulunan diğer karotenoid çeşitleri ise neoksantin, zeaksantin, violaksantin ve  $\beta$ -kriptoksantin'dir. Bitkilerin içeriğindeki karotenoidler birçok parametreden etkilenirler. Etki eden faktörlerden biri olgunlaşmadır. Örneğin, domatesin olgunlaşmasıyla içeriğindeki likopen miktarının da hızlı bir şekilde artışı ve hasattan sonra da bu artışın devam etmesi dikkat çekmektedir. Tıbbi çalışmalar sonucu, likopenin solunum ve sindirim yolu kanserleri, prostat kanseri, rahim kanseri ve akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinin meydana gelmesini engellediği belirtilmiştir (Fennema 1997; Gülçin 2012).

### 1.7. Antioksidanların Etkisi

Fonksiyonel gıdalar, normal diyetin bir parçası olarak tüketilebilen geleneksel gıdaya benzer olan ancak basit beslenme gereksinimlerinin sağlanmasının ötesinde değişik etkenlerle hastalık oluşma riskini azaltıcı, sağlığı ve buna bağlı olarak iyi hali geliştirici özelliklere sahip gıdalar olarak tanımlanmaktadır (Erbaş 2006). Antioksidan fonksiyonel gıdalar ise insanların normal fizyolojik faaliyetleri sırasında ortaya çıkan veya beslenme yoluyla alınan serbest radikallere elektron veya hidrojen vererek onların indirgenmesini sağlayan ve bu şekilde sağlığın bir şekilde olumsuz etkilenmesini önleyen besin maddeleridir (Erbaş vd 2008). İnsan vücudunda koruma işlevi gösteren bu moleküller kendi üzerlerindeki elektronları verip serbest radikalleri giderirken kendileri de serbest radikal formuna geçmezler (Prior and Cao 2000; Çetinkaya *et al.* 2012). Canlılarda antioksidan etki gösteren bileşik ya da sistemlerin yer alması yaşam için oldukça önem arz eden bir ihtiyaçtır. Bu antioksidan moleküllerin antikarsinojenik,



antimutajenik, antiaging gibi pek çok biyolojik işlevden sorumlu olduğu bilinmektedir (Cook and samman 1996).

Antioksidan maddelerin etki mekanizmaları 4 kademede gerçekleşmektedir. ROS'ları etkileyerek onları tutarak ya da daha zayıf farklı bileşiklere çevirmesi topalayıcı etkidir. Bu etkiyi gösteren gruba antioksidan enzim sistemleri örnek verilebilir. ROS'lar ile etkileşerek bir elektron ya da hidrojen transferi gerçekleştirerek aktivitelerini düşürme ya da inaktif forma dönüşmelerini sağlaması bastırıcı etkidir. Antioksidan aktiviteye sahip moleküller bu gruba örnek verilebilir. ROS'ları bağlayarak zincir reaksiyonlarının kırılmasını gerçekleştirerek fonksiyonlarını engellemesi ise zincir kırıcı etki olarak bilinir. Hemoglobun ve mineraller zincir kırıcı etkiye sahiptirler. Serbest radikallerden dolayı meydana gelen hasarların onarılması ise onarıcı etkidir (Annakkaya 2012).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, antioksidanların sistemleri oksidatif strese karşı koruduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar beslenme, farmakoloji, fizyoloji ve gıda işleme alanlarında olmak üzere pek çok alanda yapılmış ve bu durum desteklenmiştir (Magalhaes *et al.* 2009). Bitkiler için, yapılarında bulunan antioksidan moleküller acılaşmayı engelleyen, tazeliğini koruyan ya da bitkinin oksitlenmesini engelleyen sıradan bir molekül olarak tanımlanabilir. Antioksidan molekülleri içeren gıdalar veya takviyeler, besinlerin acılaşmasını önler veya geciktirirler (Gülçin 2012).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirini tamamlayıcı nitelik taşımaktadır. Antioksidanların serbest radikaller üzerindeki etki mekanizmalarına göre; birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Birincil antioksidanlar, mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz (CAT) gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğine sahiptirler (Gülçin 2012). Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, protein ve lipidler gibi hücresel

bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedir. İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikallerini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran E vitamini, C vitamini ve fenol gibi bileşiklerdir. Zincir reaksiyonlarının kırılması ile, serbest radikal bir elektron aldığıında, ikinci bir radikal oluşur. Bu molekül aynı şekilde üçüncü bir radikali de oluşturur ve daha çok kararsız ürünler oluşarak zincir bu şekilde devam eder. Bu prosesi C veya E vitamini ya da  $\beta$ -karoten gibi zincir kıran antioksidanlar elektron transferi ile durdururlar. Antioksidan moleküllerin gösterdikleri antioksidan kapasiteleri üzerinde yapısal özellikleri ve üzerinde etkili olduğu reaksiyonların yanında sıcaklık, konsantrasyon, sistemin yüzey özellikleri, ışık seviyesi, fiziksel durum gibi pek çok faktör etkilidir (Gülçin 2012). Yani iyi bir antioksidan yüksek sıcaklık ve UV ışınının olduğu bazı durumlarda zincir reaksiyonları sırasında oksidan olarak davranarak serbest radikal oluşumunu tetikleyebilir.

Bilindiği gibi organizmalarda metabolizma sırasında serbest radikaller oluşmaktadır. Ve bu radikaller de kanser türleri başta olmak üzere Parkinson, Alzheimer gibi nörolojik bir çok hastalığın meydana gelmesinden sorumludurlar (Davies 2000; Finkel and Holbrook 2000; Gülçin 2012). Bu nedenlerle organizmalarda sürekli olarak antioksidan sistemlere ihtiyaç vardır. Bunun yanında vücutta hali hazırda oksidan-antioksidan dengesi söz konusudur. Fakat bu denge oksidan lehine olursa oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar. Böyle bir durumda da antioksidan takviyesi gerekmektedir. Bu sebeptendir ki günümüzde antioksidan takviyeler oldukça ilgi görmektedir.

Antioksidanlar sentetik ve doğal antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Gerek endüstride gerekse günlük yaşantımızda olsun ilk önceleri sentetik antioksidanlara olan rağbet oldukça fazla sayılırdı. Ancak sentetik olmalarından dolayı zararlı olabileceği düşüncesiyle karotenoidler, flavanoidler,  $\alpha$ -tokoferol, A, C ve E vitaminleri gibi doğal antioksidan kaynaklarına yönelim giderek artmaktadır (Gülçin 2012). Bu doğal antioksidanların kapasiteleri hakkında hem *in vivo* hem de *in vitro* alandaki çalışmaları ile kayda değer sonuçlar elde edilmiştir. *In vitro* ortamda yapılan önemli antioksidan kapasitesi belirleme yöntemleri için; ABTS radikal giderme metodu, DPPH radikal



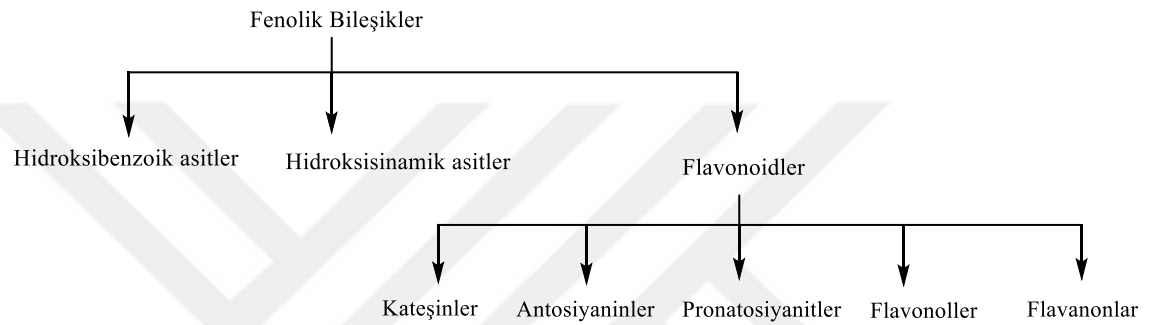
## 1.9. Fenolik Bileşikler

Fenolik maddeler meyve ve sebzelerde genellikle çok az miktarlarda bulunurlar. Bitkisel kaynakların hem rengine hem de lezzetlerine etki ederek ağızda buruk bir tat bırakan önemli bir madde grubudur. Fenolik maddeler kimyasal olarak, aromatik benzen halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi and Nacz 1995). Bu bakımdan en basit fenolik maddenin bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik maddelerin de fenolden türediği bilinmektedir (Cemeroğlu ve Acar 1986). Kristal yapıda ve renksiz olan fenolik bileşikler hava ile temaslarında kırmızı renkli olurlar. Hem suda hem de organik çözücülerde çok iyi çözünmektedirler. Fenolik bileşikler hem toksik hem de korozif etkiye sahiptirler. Hatta seyreltik hazırlanmış çözeltileri dezenfektan işlevi görür. Çoğu polimerin de (Polifenol) monomeridir.

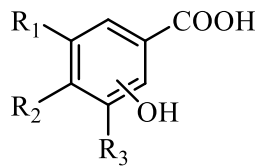
Tüm bitkilerin dış ortandan gelebilecek olan zararlılara karşı kendilerini korumaları için bitkilerde sekonder metabolit olarak sentezlenirler (Anonymous 1984). Hemen hemen her meyve ve sebze az ya da çok miktarlarda bulunan fenolik bileşikler en önemli antioksidanlar grubunu teşkil ederler (Shahidi *et al.* 1992; Moure *et al.* 2001). Bitkilerde sekonder metabolit olarak karşımıza çıkan fenolik bileşikler hem çok yaygın bir kullanıma sahip hem de çok sayıda yapısı aydınlatılmış moleküllerdir (Kafkas vd. 2006). Her geçen gün de bunlara yenisi eklenmektedir.

İçeriğinde fenolik maddeler bulunduran bitkisel kaynaklardan özellikle de meyveler, bu fenolikler sayesinde sergiledikleri antioksidan ve antimikrobiyal gibi etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak görülmektedirler (Pehlivan and Güler 2004). Beslenme alanında olumlu etki sergileyen fenolik bileşiklere biyoflavonoidler de denilmektedir. Hatta bazı kaynaklarda da P vitamini olarak bahsedilmektedir (Cemeroğlu *et al.* 2004; Saldamlı 2007). Şimdiye kadar en az 5 000 tane fenolik bileşik tanımlanmış olup, bunların 2 000'den fazlası doğal flavonoidlerdir. Genelde bitkilerin yaprak, çiçek ve meyve gibi canlı dokularında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler (Shahidi and Nacz

1995). Fenolik maddeler basit fenolik maddeler ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla beraber meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler Hidroksibenzoik asitler, Hidroksisinnamik asitler ve Flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenmektedirler. Fenolik maddelerin antioksidan aktiviteleri kimyasal yapılarıyla ilişkilidir. Yani aromatik benzen halkasına bağlı olan hidroksil veya diğer fonksiyonel grupların sayısı ve pozisyonları önem arz etmektedir (Gülçin 2012).

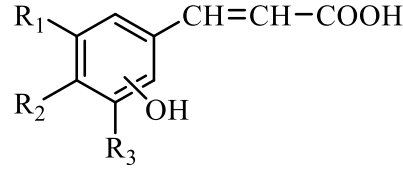


Fenolik asit grubunda olan hidroksibenzoik asitler fenil metan yapısına sahip olmakta ve bitkisel gıdalarda ya eser (10  $\mu$ M) miktarda bulunurlar ya da hiç bulunmazlar. Hidroksibenzoik asitlere örnek olarak salisilik asit, gallik asit, vanilik asit ve *m*-hidroksibenzoik asit verilebilir. Hidroksisinnamik asitler bir dizi reaksiyon sonucu Hidroksibenzoik aside dönüşürler (Gülçin 2012).



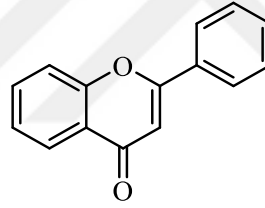
**Şekil 1.10.** Hidroksibenzoik asidin açık yapısı

Hidroksisinnamik asit ise kimyasal olarak fenilpropan yapısındadır. Aromatik fenilpropan halkasına bağlı olan hidroksil grubunun pozisyonuna bağlı olarak türevlendirilebilmektedir. Örnek olarak ferulik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitler verilebilir. Hidroksisinnamik asitler genelde ester, asit glikozitleri ve amidleri halde bulunurken, çok az miktarda da serbest halde bulunurlar (Gülçin 2012).



**Şekil 1.11.**Hidroksisinnamik asidin açık yapısı

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu and Harmandar 1999; Gülçin 2012). Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan fenollerdir. Yaklaşık 6 500 farklı flavonoid bilinmektedir (Saldamlı 2007).



**Şekil 1.12.** Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler de bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır ve biyolojik aktif maddelerin en önemli sınıfını oluşturan bir polifenolik bileşik grubudur. Bu bileşiklerin insan vücudu üzerinde çok önemli ve çok faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Carlo 1999). Flavonoidlerin güçlü antioksidan, serbest radikal giderici ve metal indirgeyici aktivitelerinin olduğu geniş bir biçimde araştırılmıştır (Saija *et al.* 1998). Literatürde, flavonoidlerin antiinflamatuvar, antimutajenik ve antialerjik özellikleri de bildirilmiştir (Middleton and Kandaswami 1992; Hollman *et al.* 1996).

Flavonoidler, boya endüstrisinde, dericilikte tabaklama bileşimine katılma, kozmetikte güneş kremlerinde, merhemlerde, uranyum, titan, zirkonyum metallerinin tayininde, et

konserveliğinde proteoliz hızlandırıcı olarak kullanılmaktadırlar (Sağiroğlu and Özcan 2007).

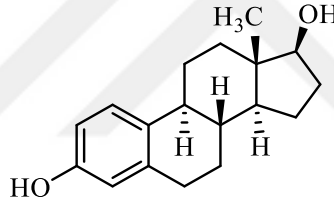
Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini; ksantin oksidaz, lipooksigenaz ve siklooksigenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek, ayrıca süperoksit anyonları, lipid peroksi kökleri ve hidroksil kökleri gibi serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler (Disilvestro 2001).

Fakat fenolik bileşiklerin aşırı tüketiminin toksik etki gösterdiği ve özellikle de gırtlak kanserine sebep olduğu söylenmektedir. Bununla birlikte dengeli ve doğru bir şekilde alındığı zaman ise vücudun antioksidan savunma mekanizmasına yardımcı olarak kanser riskini azalttığı da belirtilmiştir.

### **1.9.1. Fitoöstrojenler**

Bitki kökenli östrojenler veya östrojene benzer etkiye sahip olan bileşikler “fitoöstrojenler” olarak adlandırılır. Bitkilerde doğal olarak bulunurlar ve fenolik gruplar içerirler (Golberg 2001; Magee and Rowland 2004). Potansiyel mekanizmalarının sadece bir bölümü östrojen reseptörlerine bağlanma yeteneği ile ilişkilidir. Değişen derecelerde östrojenik etkinliğe sahip olan ve doğal östrojenlere hem yapı hem de şekil yönünden benzerlik gösteren fitoöstrojenler organizmada bulunan doğal östrojenlerle yarışa girerek reseptörlere bağlanıp direkt etki gösterebilirler. Ayrıca fitoöstrojenler östrojen metabolizmasında rol oynayan bazı enzimlerin etkinliğini değiştirebilirler (Bingham *et al.* 1998; Golberg 2001; Rowland *et al.* 2003). Fitoöstrojenler değişik kaynaklara göre farklı alt sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar; izoflavonlar, kumestanlar, stilbenler ve lignanlar olmak üzere dört sınıfta toplanabilir. Her sınıf kendi arasında farklı bileşiklerden oluşmakta ve bu bileşiklerinde diyetdeki kaynakları farklılıklar göstermektedir. İzoflavonlar daha çok soya ve soya ürünlerinde ve diğer kurubaklagillerde, lignanlar; en çok keten tohumu, çavdar kepeği, kiraz, çilek gibi meyvelerde, stilbenler; yer fıstığı ve kırmızı şarapta, kumestanlar ise

kurubaklagillerde bulunur. Fitoöstrojenler, östrojenik ve antiöstrojenik, antioksidan, antiproliferatif ve antianjiogenetik, antiinflamatuvar özellikler gösterebilmektedir. Östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri ile daha çok menopoz veya osteoporoz ile ilişkili iken, antioksidan özellikleri ile de kanserle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wilson and Temple 2001; Cornwell *et al.* 2004; Magee and Rowland 2004). Fitoöstrojenler, izoflavon ve lignan gibi pekçok bileşikleri içerirler. Bu bileşikler hayvanlarda hormonal ve hormonal olmayan aktivitelerde yaygın bir oranda kullanılırlar. Ayrıca insanlarda diyetle alınan bu bileşiklerin psikolojik etkilere sahip olabildiği düşünülmektedir (Setchell and Cassidy 1999). Kadınlarda yaşa bağlı olarak meydana gelen hastalıkları önlemede ve sağlığı sürdürmede diyetle alınan fitoöstrojenlerin potansiyel bir rolü olduğu öngörülmektedir. Lignanların fitoöstrojen olarak ele alınmasının sebebi bir östrojen olan estradiole benzemeleridir.

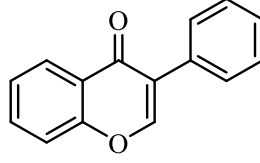


**Şekil 1.13.** Estradiol yapısı

### 1.9.1.a. İzoflavonlar

Soya fasulyesi ve soya ürünlerinde en çok fitoöstrojenik etkiye sahip üç tane izoflavon vardır. Bunlar; daidzein, genistein ve glisiteindir. Vücutta genistein, östrojen reseptörü beta (ER $\beta$ ) ile etkileşime girdiğinde östrojenin gücünün üçte biri kadar etkili olmaktadır. Genistein göğüs, ovaryum, endometrium, prostat, vasküler ve kemik dokularında östrojene benzer etkiler oluşturmaktadır (Wilson and Temple 2001; Cornwell *et al.* 2004). Çeşitli kuru baklagillerde bulunmasına rağmen esas kaynağı soya fasulyesidir.

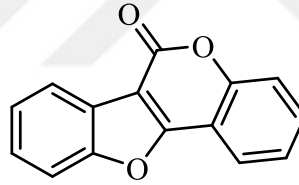




**Şekil 1.14.** İzoflavon yapısı

### 1.9.1.b. Kumestanlar

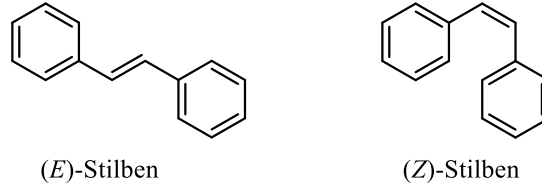
Kumestanların geniş bir serisi olmasına rağmen sadece az bir bölümü östrojenik aktiviteye sahiptir (Cornwell *et al.* 2004). Bunların içinde sadece kumestrolün östrojenik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Boker *et al.* 2004). Kumestrollerin diyetteki temel kaynağı kurubaklagillerdir. Bununla beraber brüksel lahanası ve ıspanakta çok düşük seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir (Albertazzi and Purdie 2002).



**Şekil 1.15.** Kumestan yapısı

### 1.9.1.c. Stilbenler

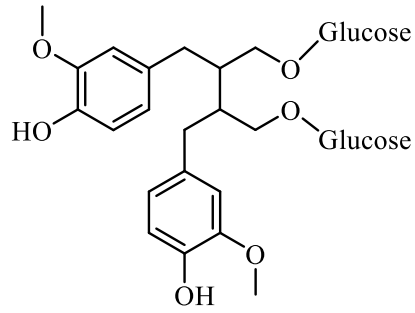
Fitoöstrojenik stilbenlerin temel kaynağı yer fıstığı ve üzumdür. Şarapta bulunan stilben türü resveratroidir. Resveratrol üzümün et kısmında bulunmaz ancak kabuğunda bulunur. Şaraptaki resveratrol içeriği botrital mantarının bulunuşuna, mevsime, coğrafik bölge ve yetiştirmeye bağlıdır. Daha uzun fermantasyon süresi ile son üründe daha fazla trans-resveratrol oluşmaktadır (Cornwell *et al.* 2004). Resveratrol, yüksek biyoyararlılığa, yararlı fizyolojik ve farmakolojik etkilere sahiptir. Vücutta antioksidan olarak görev yapar, bunun dışında nitrik asit üretimini artırır, platelet agregasyonunu önler ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyelerini artırması nedeniyle kalbi koruyan bir ajan olarak kabul edilir (Wilson and Temple 2001).



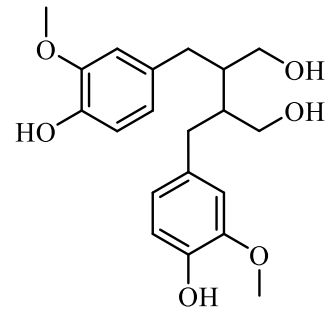
**Şekil 1.16.** Stilben yapıları

### 1.9.1.d. Lignanlar

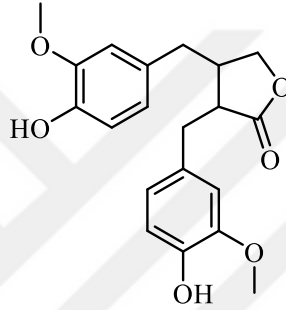
Yenilebilen bitkiler, hormon benzeri fitoöstrojen diye adlandırılan difenolik bileşikler içerirler. Bunlar ikiye ayrılır; İzoflavonlar ve lignanlar. İzoflavonlar, flavonoidlerin geniş ve çok farklı bir alt sınıfıdır. Lignanlar 2,3-dibenzilbütan iskeleti ile tanımlanır ve bütün damarlı bitkilerde glikozit formda bulunurlar. Bitkilerde bulunan temel lignanlar matairesinol, secoisolariciresinol, lariciresinol ve pinoresinol olup, bunlar insanlarda östrojenik aktivite gösteren iki temel bileşiği, enterolakton ve enterodiölü vermektedirler. İzoflavonlar gibi enterolakton ve enterodiöl de barsak mikroflorasının bitki lignan öncüleri üzerindeki aktivitesi sonucu oluşurlar. Enterolaktonun bunun dışında enterodiöl'ün oksidasyonu ile de oluştuğu bilinir (Davis *et al.* 1999). Lignanlar, bazı bitkilerde az olduğu bilinir ki orada onlar bitki hücre duvarlarında lignin oluşumu için yapıtaşlarını oluştururlar. Fitolignanlar keten tohumunda, tahıl, tam buğday tanesinde, sebzelerde, bazı meyvelerde ve çayda yüksek miktarlarda bulunur (Golberg 2001; Magee and Rowland 2004). Keten ürünleri özellikle iyi bir lignan kaynağıdır. Bitki lignanları ve izoflavonlar, zayıf bir östrojen aktivitesi ile memeli metabolizmasını biyolojik olarak aktive etmek için barsak bakterileri tarafından metabolize edilir. Lignanlar ayrıca enzimler, protein sentezi, hücre çoğalması (proliferation), anjiyogenez (angiogenesis), büyüme faktörü ve hücre farklılaşması üzerinde etkileri vardır. Ayrıca flavonoidler gibi lignanlar da antioksidan, antikarsinojenik ve antimikrobiyal özellik gösterirler (Puupponen-Pimia *et al.* 2002).



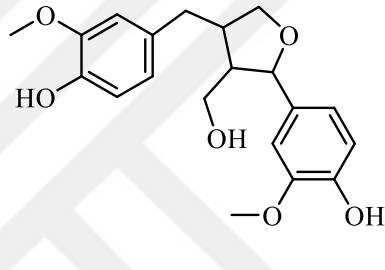
Secoisolariciresinol diglucoside  
(SDG)



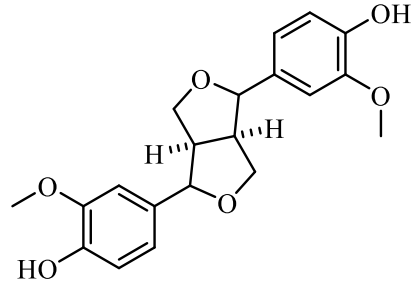
Secoisolariciresinol  
(SECO)



Matairesinol  
(MAT)

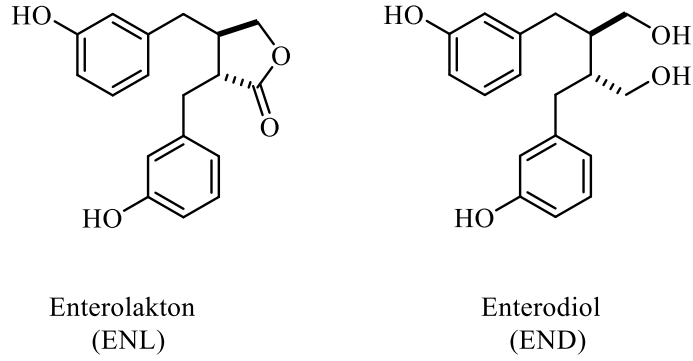


Lariciresinol  
(LAR)



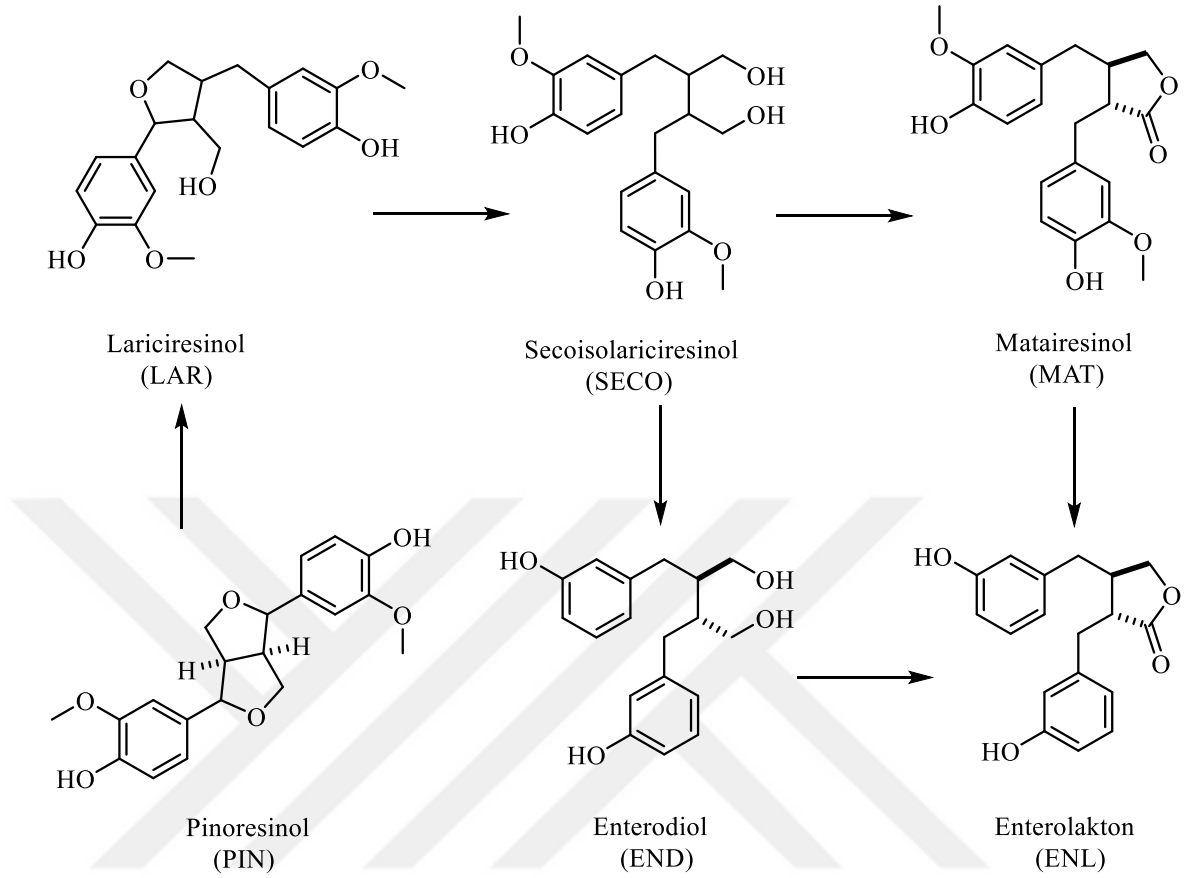
Pinoresinol  
(PIN)

Şekil 1.17. Bitki lignan yapıları



**Şekil 1.18.** Memeli lignan yapıları

Enterolignan olan enterolakton ve enterodiol, insan barsağında mikroorganizmalar tarafından bitki lignanlarından oluşan fitoöstrojenlerdir. Lignanlar, meyvelerin çeşitli yerlerinde bulunan difenolik bileşiklerdir. Önemli bitki lignanları Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Matairesinol (MAT), Lariciresinol (LAR) ve Pinoresinol (PIN)'dir. Secoisolariciresinol ve Matairesinol aslında östrojenik olmayan iki lignan türüdür, fakat barsak florasında östrojenik aktivite gösteren enterolakton ve enterodirole dönüştürülür (Golberg 2001; Cornwell *et al.* 2004). İnsan barsağında, bitki lignanları sindirimden sonra deglikolizasyona uğratılır, daha sonra mikroorganizmalar tarafından enterolignan olarak da adlandırılan memeli lignanlarına yani enterolakton ve enterodirole dönüştürülürler.



**Şekil 1.19.** Bitki-memeli lignanlarının yapıları ve barsak mikroflorasında meydana geldikleri metabolik yol

Lignanlar bir östrojen olan estradiole benzer yapılar gösterir ve bu yüzden fitoöstrojen ailesine dâhil edilirler. Enterolignanlar antioksidan ve antitümör içeren çok geniş bir biyolojik aktiviteye ve zayıf olarak da östrojenik ve anti-östrojenik özelliklere sahiptirler. Lignanlar insan vücudunda idrar, plazma, tükürük, sperm ve prostatik sıvıda bulunurlar (Slanina and Glatz 2004). Epidemiyolojik çalışmalar enterolakton ve enterodiolün bazı kanserler, kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporoz karşıtı koruyucu etkilerini sunar. Bitki lignanlarınca zengin gıdalar in vitro çalışmalar ve hayvan deneylerinde test edildiğinde mide-barsak sistemlerindeki kanserlere karşı koruyucu etkilere sahip olduğu görülmüştür (Guus *et al.* 2005).

Lignanlar izoflavonların aksine doğada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Ancak izolasyonlarının ve analizlerinin zorluklarından dolayı nispeten daha az çalışılmıştır. En zengin tanımlanmış öncül kaynağı olan keten tohumu (*Flax seed*) gibi bazı bitkiler yüksek oranda Secoisolariciresinol içerirler (Setchell *et al.* 1981). Lignanlar bol lifli gıdalarda çokça bulunurlar. Kişisel gıdalar genellikle daha az seviyede lignan içermesine rağmen, onların bitkilerin her yerinde bulunabilirliği önemli bir fitoöstrojen kaynağı olması anlamına gelir (Cassidy 2004).

Yüksek lifli gıdalarda bulunan ve memeli lignanı öncüsü olan SDG, farelerdeki meme tümörlerinin gelişmesine karşı koruma sunduğu ortaya çıkmıştır. Keten tohumundan izole edilen SDG yüksek bir yağ diyeti ve meme tümörü içerdiği bilinen bir kimyasalla muamele edilen farelere 20 hafta boyunca verilerek tümörlerin toplam sayısı ve tümürlü fare sayısı %40 ve %50 oranında azaldığı görülmüştür.

### **1.10. Fitoöstrojenlerin Sağlıktaki Etkileri**

Besinlerle veya supplement olarak alınan fitoöstrojenlerin sağlıktaki etkilerini sorgulayan birçok klinik ve epidemiyolojik çalışma vardır. Çalışmaların çoğunda, genellikle premenopozal ve postmenopozal kadınlarda fitoöstrojenlerin etkileri incelenmiştir (Cornwell *et al.* 2004). Östrojenik ve antiöstrojenik, antioksidan, antiproliferatif, antianjiogenetik ve antinflamatuar özellikler gösterebilen fitoöstrojenler bu özelliklerinin her biri ile farklı etkiler meydana getirmektedirler. Östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri daha çok menopoz semptomları veya osteoporoz ile ilişkili iken, antioksidan özelliklerinin kanser ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Büyüktuncer 2000).

### **1.11. Enzimler**

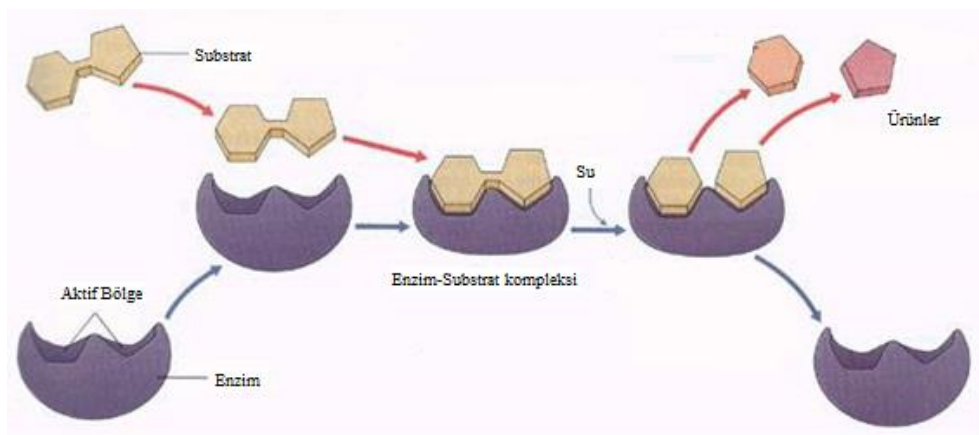
Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Bu biyolojik katalizörlerin çoğu protein yapısında olup meydana gelen kimyasal

reaksiyondan etkilenmezler. Yani reaksiyon sonucu enzimlerin yapısında bir değişiklik meydana gelmesi söz konusu değildir. Bunun yanında enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen makro moleküllerdir (Berg *et al.* 2014). Ayrıca düzenleyici özelliklere de olan enzimler, optimal şartlarda maksimum aktivite sergileyerek reaksiyonların meydana gelmesinde rol oynarlar. Enzim katalizi kimyasal katalizden çok daha üstündür. Katalizleme görevi olup protein yapısında olmayan katalitik RNA molekülleri (Ribozimler) hariç, enzimlerin tamamı protein yapısında olan maddelerdir. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş gurubunu teşkil ederler (Nelson and Cox 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014)

Protein yapısına sahip enzimler DNA tarafından şifrelendiği için hücrelerdeki bütün olaylar DNA seviyesinde düzenlenip kontrol edilir. Enzimler spesifik çalışır ve kataliz yönünden üç öneme sahiptirler; Özgöl, kemoselektif ve son derece hızlıdır. Biyokimyasal reaksiyonlar düşük enerji ve vücut ısısında gerçekleşmektedirler. Bu yönleriyle enzimler diğer katalizörlerden ayrılırlar. Enzimlerin üzerinde etkili oldukları maddelere “substrat” denir. Hücrelerde meydana gelen sentez ve yıkım olayları, sindirim, kasların kasılması, solunum gibi hayatsal faaliyetler metabolik reaksiyonların sonucu ile vukuu bulmaktadır. Bahsi geçen reaksiyonların meydana gelmesi ancak enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin katalitik etki gösteren kısmı proteinin polipeptit zinciri üzerindeki küçük bir bölgesidir. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla meydana getirebilirlerken, bazıları ise protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. Bu gruplar metal iyonu, protein olmayan organik bir bileşik ya da her ikisi de olabilir. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak “kofaktör” adı verilir. Organik bileşik, enzime sıkı bağlanmış ve ayrılmıyorsa “prostetik grup”, çok sıkı bağ yapmamış ve ayrılabiliyorsa “koenzim” adını alır. Koenzimi ile birleşik halde bulunan Apoenzim-Koenzim bütününe “holoenzim” adı verilir. Yani holoenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdadır. Koenzimler enzimin aktif bölgesine bağlanır enzimin aktive olmasını sağlar. Koenzimler, suda çözünen B grubu vitaminleridir. Vitaminler bu nedenle, metabolik olayların enzimler aracılığıyla kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için

ve organizma açısından son derece önem arz etmektedirler (Nelson and Cox 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2013).

Substrat aktif bölgeye bağlandıktan sonra aktif bölge değişikliğe uğruyor ve substrata uyum sağlıyor. Aktif bölge içerisinde polar ve apolar karakterler substratın cinsine göre bağlanma gücünü etkiler. Aktif bölgeye bağlanan substrat moleküllerinin bağ enerjileri oldukça düşüktür ve anahtar kilit ya da substrata uyum modeli ile çalışırlar. Birincisi, 1894'te Emil Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelidir ve enzimin aktif bölgesi ve substrat yapı itibariyle birbiriyle uyum içerisinde olup anahtar kilit gibi birbirlerine bağlandığı kabul edilir. İkincisi ise 1958'de Daniel Koshland tarafından ileri sürülmüş olan indüklenmiş-uyum (induced-fit) modelidir. Bu modelde ise enzim, ortamda substrat bulunmadığında serbest halde bulunur. Ortamda substrat bulunduğu zaman ise, enzim substratı katalize uygun biçimde bağlayacak forma dönüşür. Reaksiyon tamamlandığında ise enzimin yapısında herhangi bir değişim olmadan enzim ayrılır (Nelson ve Cox 2005; Megep 2006).



**Şekil 1.20.** Enzim ile substrat arasında Anahtar-Kilit Modeli

Protein yapıları farklı, ancak katalizledikleri reaksiyon aynı olan enzimlere “izoenzim” ya da “izozim” adı verilmektedir. İzoenzimlerin kofaktörlerine, substratlarına ve inhibitörlerine olan alakaları farklılık gösterir. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında dokuya özgü olmaları, farklı amino asit sayı ve sırasına sahip olmaları sebebiyle farklı



genlerin ürünü olmaları ve buna bağlı olarak da aktif bölgelerinde farklılıklar olması, izoelektrik noktalarının farklı olması ve elektriksel alandaki hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörler etki ederek enzimlerin katalizleme hızlarını değiştirebilirler. Enzimler protein yapısında olduğu için, ortamdaki sıcaklık değişmelerinden etkilenir. Enzimler belirli sıcaklıkta çalışırlar. Bir enzimin en iyi çalışabileceği sıcaklığa optimum sıcaklık denir ve bu değerler genellikle 30-40 °C arasındadır. Daha düşük ve daha yüksek sıcaklık, enzimlerin çalışma hızını olumsuz etkiler. Enzimlerin yapısı yüksek sıcaklıkta tamamen bozulurken, düşük sıcaklıkta bozulmaz. Bundan dolayı dondurarak besin maddeleri saklanılabilmektedir (Nelson and Cox 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Her enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu bir pH aralığı vardır ve bu pH'ya "optimum pH" denilmektedir. Enzimler çoğunlukla fizyolojik pH civarında yüksek aktivite gösterirler ancak bazı enzimlerde bu durum farklılık gösterebilir. (Nelson and Cox 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005) Mesela, insanlarda proteinleri parçalamada görev alan enzimlerden pepsin pH 2.0'de, tripsin pH 8.5'ta maksimum aktivite sergilemektedir. Ortamdaki substrat miktarında reaksiyonun hızını etkilemektedir. Yani yeterli konsantrasyonda substrat varsa, enzim miktarı arttıkça tepkimenin hızı da artar, ancak tepkime hızı maksimum noktaya eriştikten sonra sabit kalır. Çünkü enzim substrat ile iyice doymuştur. Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki ederken, bazı enzimler ise bir grubu oluşturan substratlara etki ederler. Bunlara ilaveten bazı enzimlerde stereo özgüllük gösterirler. Bu tür enzimler substratlarının stereo izomerlerine etki etmezler. Örneğin arginaz sadece L-arginini hidroliz ederken, D izomerine etki etmez. Proteolitik enzimlerin etki özgüllüğünü tayin eden özellik, substrat molekülündeki amino asitlerin özel konfigürasyonları ve diziliş sırasındadır. Enzimler için bazı spesifiklikler belirtilmiştir. Bu özellikler;

**Mutlak spesiflik:** Bu özellik enzimin, sadece spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalizleme özelliğidir. Enzimlerin çoğu mutlak spesiflik özelliği gösterirler.

**Grup spesifliği:** Bu özelliğe sahip enzimler, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıdaki substratlar ile reaksiyona girebilirler. Örneğin glikozidazlar glikozidler üzerinde, alkol dehidrogenaz ise alkoller üzerinde etkilidir.

**Bağ spesifliği:** Enzimlerin, proteinlerdeki peptid bağı, karbohidratlardaki glikozid bağı gibi belli bağ tipleri üzerinde etkili olma özelliğidir. Mesela Kimotripsin, peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli bir enzimdir.

**Stereo spesiflik:** Bu gruptaki enzimler, substratların sadece tek izomeri üzerinde etkili olabilmektedirler. Örneğin arginaz sadece L arginini hidroliz eder ancak D arginin izomerine etki edememektedir.

Hücre içerisindeki metabolik olaylar hücrelerin farklı organellerinde meydana gelmektedir. Bu nedenle de metabolik reaksiyonları katalizlemede görev alan enzimlerin hücre içerisindeki lokalizasyonu da farklılık gösterir. Örneğin glikoliz reaksiyonları hücrelerin sitoplâzmasında gerçekleşirken, solunum zinciri ise mitokondrielerde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla glikoliz reaksiyonlarında görevli olan enzimler sitoplazmada, solunum zincirinde görevli olan enzimler ise mitokondride lokalize olmuşlardır (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Hücrede sentezlendikten sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere “Hücre dışı enzimler”, etkisini sentezlendikleri hücrede gösteren enzimlere ise “Hücre içi enzimler” denilmektedir. Genellikle enzimlerin sentezi hücre içerisinde gerçekleşir ve daha sonra büyük bir kısmı hücre içi metabolik olaylar için kullanılır. Fakat pepsin ve tripsin gibi bazı özel sindirim enzimleri, sentezlendikleri hücrenin dışına salınırlar. Biyolojik sistemlerde bazı enzimler inaktif ön bileşikler halinde sentezlenmekte ve daha sonra bir veya birkaç peptid bağının proteolitik enzimler tarafından hidrolizlenmesi

sonucu aktif hal kazanmaktadırlar. Bu tür enzimlerin inaktif ön bileşik haline “zimojen” bu aktifleşme şekline de “zimojen aktifleşmesi” denilmektedir. Zimojenler yapıldığı yerde inaktif halde sentezlenip, inaktif olarak kana karışırlar. Katalizleme yapacağı yerde aktif olurlar (Nelson and Cox 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005). Bu tür enzimlere örnek olarak; besinlerdeki proteinleri hidrolizleyen sindirim enzimleri mide ve pankreasta zimojen olarak sentezlenirler. Pankreastan sentezlenen kimotripsinojen’in aktif hali tripsin’dir. Bu enzim ilk sentezlendiği yerde yani pankreasta aktif olsaydı pankreası parçalardı. Bu nedenle kimotripsinojen ince barsağa salınıp tripsin tarafından proteolitik olarak parçalanıp aktif formu olan tripsin’e dönüşüyor.

Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler altı ana gruba ayrılır (Keha ve Küfrevioğlu 2005) bunlar sırasıyla;

**Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında yükseltgenme-indirgenme (redoks) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu gruba dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar ve peroksidazlar gibi enzimler girer. NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub> bu gruptaki enzimlerin koenzimleridir.

**Transferazlar:** İki substrat arasında Hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir. Glukoz, fosfat, aldehit, keton ve açıl fonksiyonel grupları bu sınıftaki enzimlerin transfer ettiği bazı gruplardandır.

**Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozid ve anhidrit gibi moleküllere veya P-N, C-X gibi bağlara bir su molekülü katılmasıyla hidrolizi katalizleyen enzim grubudur. Lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz, nükleaz ve bütün proteinaz enzimleri bu gruba girer.

**Liyazlar:** Hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir mekanizma ile komşu karbonlardan grupları uzaklaştırıp çift bağ (eliminasyon) oluşturan veya çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Çalışmalarımızda kullandığımız karbonik anhidaz (Karbonat hidroliyaz) enzimi de ileride daha detaylı bir şekilde anlatılacağı gibi bir adet çift bağ içeren

karbonik asitten ( $H_2CO_3$ ) bir su molekülü uzaklaştırarak iki adet çift bağ içeren karbon dioksitin ( $CO_2$ ) oluşumunu katalizler.

**İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümlerini katalizleyen enzimlerdir. Mutazlar, epimerazlar, rasemazlar bu gruba girerler.

**Ligazlar (Sentetazlar):** ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden, fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımı ile iki molekülün bağlanması (C-O, C-S, C-N ve C-C arasında) reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimlere sentetazlar da denir ve bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir.

Enzimler üzerinde en çok araştırma yapılan önemli alanlardan biri de enzimlerin inhibisyon özellikleridir. Enzim-substrat kompleksinin oluşmasına olanak sağlayan bölge enzimin yalnızca belirli bir bölgesini içermektedir. Çünkü enzimler büyük, buna karşılık substratlar küçük moleküllerdir. Bu durumda enzim üzerinde substratın bağlandığı ve son olarak da ürüne dönüştürüldüğü bir bölgeye ihtiyaç duyulmaktadır ki bu bölgeye de “aktif bölge” adı verilmektedir. Aktif bölgede en az bir aminoasit spesifik bir rol oynamaktadır. Enzim-substrat kompleksinin oluşmasını etkileyen, enzim aktivitesini azaltan maddelere “Enzim İnhibitörleri”, bu olaya ise “Enzim İnhibisyonu” denir. Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörler etki ederek katalizleme olayını olumlu ya da olumsuz etkileyebilirler (Keha ve Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014).

### 1.11.1. Esteraz Enzimi

Esterlere bir su molekülü girişini katalizleyerek asit ve alkol oluşumunu sağlayan enzimler hidrolazlar sınıfına giren esterazlardır. Esterazların biyolojik işlevleri, substrat ve protein yapıları farklılık göstermektedir (Oakeshott *et al.* 1993). Esterazlar katalizledikleri reaksiyon tipine göre dört ana gruba ayrılarak incelenebilmektedirler:

**Asetil esterazlar:** Bu grup esterazlar genellikle alifatik substratlar üzerine etkilidirler. Örn. Asetik asit.

**Aril esterazlar:** Bu grupta yer alan esterazlar sülfhidril grubu taşıyan inhibitörler tarafından inhibisyona uğrar ve aromatik substratlar üzerinde etkilidirler.

**Karboksil esterazlar:** Organofosfor'lar (OP) tarafından inhibisyona uğrar ve asetik asitten daha uzun zincirli alifatik gruplar üzerine etkilidirler. Örn. Bütanoik asit.

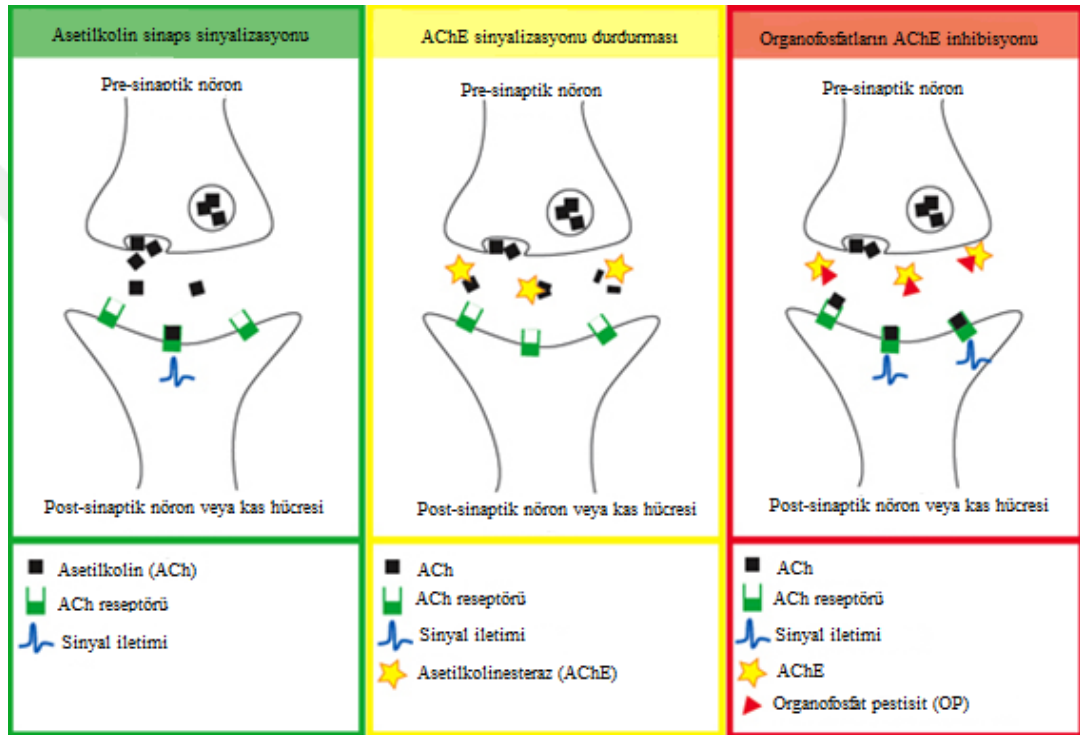
**Kolinesterazlar:** Organik fosfor bileşenleri kolinesterazı irreversibl olarak baskılar. Bulgular asetilkolinin sinir uçlarında birikiminin yansımasıdır. Alifatik esterlerin yanında birde kolin esterleri substrat olarak seçerler.

#### **1.11.1.a. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE)**

Enzimler, organizmalardaki metabolik reaksiyonların dönüşümünü katalizleyen protein yapıdaki biyolojik moleküllerdir. İnsan vücudunda karbohidrat, lipid, protein ve nükleik asitler dışında büyük önem arz eden bazı organik yapıya sahip moleküller bulunur. Bu organik moleküller vücutta bazı hayati fonksiyonları gerçekleştirmektedir. Bilhassa 20. yüzyılda bilimde elde edilen ilerlemeye paralel olarak söz konusu organik bileşiklerin de vücuttaki işlevlerinin ne olduğu konusunda da oldukça araştırma yapılmıştır. Bu moleküllerin tanınması, vücuttaki miktarları hastalıkların teşhis ve tedavisi için önemli rol oynamasının yanında yan etkileri daha da aza indirecek yeni ilaçların sentezine ışık tutması bakımından da yardımcı olmuştur (Göçer *et al.* 2013).

Asetilkolin, otonomik gangliyonların sinapslarından ve iskelet kasını döşeyen sinir telciklerinin uçlarından salgılanan kolinin asetil esteri olan nörotransmitter bir maddedir. Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), dokularda serbest veya fosfolipidlerle birleşik halde bulunan lipotrofik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen nonspesifik bir enzimdir. Asetilkolin sinir uçlarından etkelediği organa veya sinir ucundan ikinci bir sinir hücreğine, sinir impulsu taşıma görevinin yanında sinir ve kas lifleri boyunca

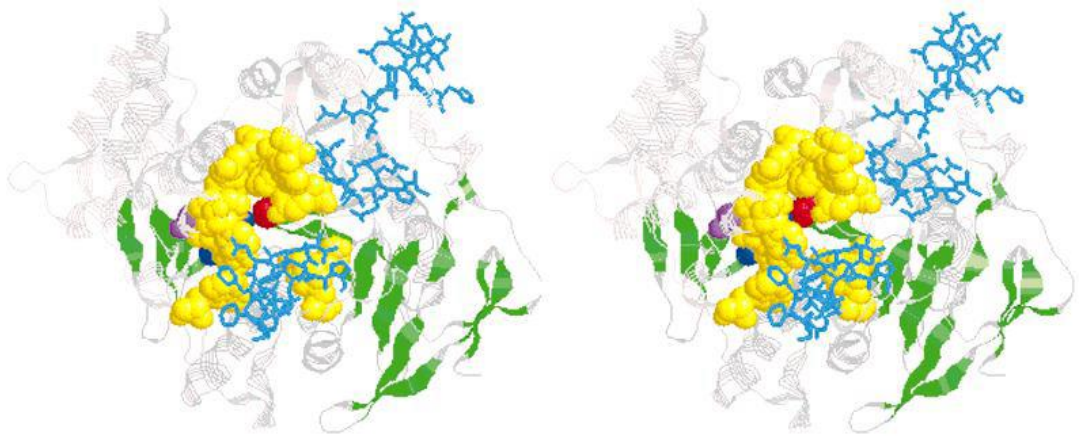
biyoelektriksel akımın oluşmasını da sağlayan biyolojik önemi büyük olan bir esterdir (Güven 2000). Asetilkolinesteraz (AChE), sinaptik aralıktaki asetilkolini inaktive eder. Yani asetilkolinesteraz sinir ucu önünde biriken kimyasalları parçalayıp oradan uzaklaştırarak ortalığı süpürmektedir. Böylece sinir iletiminde olası bir aksaklık meydana gelmez (Göçer *et al.* 2013).



**Şekil 1.21.** Asetilkolinesterazın sinir hücresindeki fonksiyonu

İnsan bedeninden milyarlarca kat küçük olan ve vücudun her yerine dağılmış ve her daim faaliyet gösteren enzimlere bağlı olarak yaşamımızı devam ettirmekteyiz. Asetilkolinesteraz (AChE) ile bu durumun ciddiyeti kanıtlanmaktadır. Bünyemizdeki yüzlerce enzimden yalnızca asetilkolinesteraz eksik olursa yaşamamız mümkün olmamaktadır. Çünkü bahsi geçen enzim eksikliği vücudun tüm elektriğinin kesilmesi anlamına gelir. Asetilkolinin (ACh) güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur (Nacmansohn 1952). Önceleri asetilkolin'in, sadece sinir uçlarından etki ettiği organa veya sinir ucundan başka bir sinir hücresine, impuls taşınması sağladığı zannedilse de, son zamanlarda elde edilen verilere göre durumun bununla kalmadığı, asetilkolin'in

ayrıca sinir hücreleri ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da rol aldığı belirlenmiştir. Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik olan ve olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip olan enzimlerdir. Kolinesterazlar hücre yenilenmesi ve farklılaşmasında, bununla birlikte çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt vermede rol oynarlar (Wilson and Nachmansohn 1954; Carlson 1992). Kolinesterazlar iki grupta ele alınır. İki grup substrat özgülüğü, doymun substrat varlığındaki durumlarda sergiledikleri davranışları ve inhibitörlere gösterdikleri afiniteye göre belirlenmiştir. Bu iki tanımlama ise, asetilkolinesteraz (gerçek kolinesteraz) (AChE; EC 3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (psödokolinesteraz) (BChE; EC 3.1.1.8) olarak yapılmıştır (Neşe 2003). Her iki kolinesterazın lokasyonları ve substratları farklılık gösterir. Asetilkolinesteraz; beyinin gri maddesinde, sinir uçlarında, kasta, akciğerde, dalakta ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonda bulunur ve en önemli fizyolojik rolü de sinir uçlarından salınarak sinaps içinde nöral impulsun iletimini sağlayan asetilkolinin hidrolizidir. Bütirilkolinesteraz ise; serum, kalp, pankreas, karaciğer ve beynin beyaz maddesinde (santral sinir sisteminde) bulunur özellikle enzim hayvanlar âleminde de oldukça yaygındır (Wilson and Nachmansohn 1954; Allam *et al.* 2007).



**Şekil 1.22.** AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı (Oakeshott *et al.* 1999)

Asetilkolinesteraz, aktif bölge ve katalizleme mekanizması açısından başka enzimlerden farklıdır (Şekil 1.22). Oakeshott ve arkadaşları asetilkolinesterazın ilk kez üç boyutlu yapısını detaylı bir şekilde aydınlatmışlardır (Oakeshott *et al.* 1999).

Enzim  $\alpha$  heliks ve  $\beta$  tabakalarından oluşur. Sarı renkli bölge 14 aromatik aminoasit içeren rezidü aktif bölgenin etrafını sarmaktadır. Aktif bölgede lokalize olmuş Serin, Histidin ve Glutamat amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Şekle göre, enzim üzerinde substratın bağlanacağı bölge mavi renk ile gösterilmektedir (Oakeshott *et al.* 1999).

Asetilkolinesteraz ilk kez 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından saflaştırılmıştır. Diğer esterazlardan da asetilkolini hidrolizleme spesifikliğinden dolayı ayırt edilerek saflaştırılmaktadır. Bu sebeple de asetilkolinesteraz adını almıştır (Phillips 1996). Asetilkolinesteraz başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferel dokularda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. AChE'in temel yapısal ve katalitik birimi 70-80 kDa aralığına sahip bir glikoproteindir. AChE bulunduğu dokuya göre monomer, dimer ya da tetramer halde bulunmaktadır (Massoulié *et al.* 1993). Asetilkolinesteraz'ın aktif bölgesinde 5 alt bölge tarif edilmiştir (Sussman *et al.* 1991, Massoulié *et al.* 1993).

**Periferel Anyonik Bölge:** Aktif bölge oyuğunun ağzında olup Tyr 70, Trp 121 ve Trp 279'dan meydana gelmiştir. Ligandlar ilk bu bölgeye bağlanır sonra da aktif merkeze yönlendirilirler (Radic *et al.* 1993, Barak *et al.* 1994).

**Kolin Bağlama Bölgesi:** Bu bölgede bulunan Trp 84 ve Phe 330 rezidülerinin elektron bakımından zengin aromatik halka sistemleri, substrat ve inhibitörlerin katyonik ucu ile katyon- $\pi$  elektronları etkileşimi meydana getirirler.

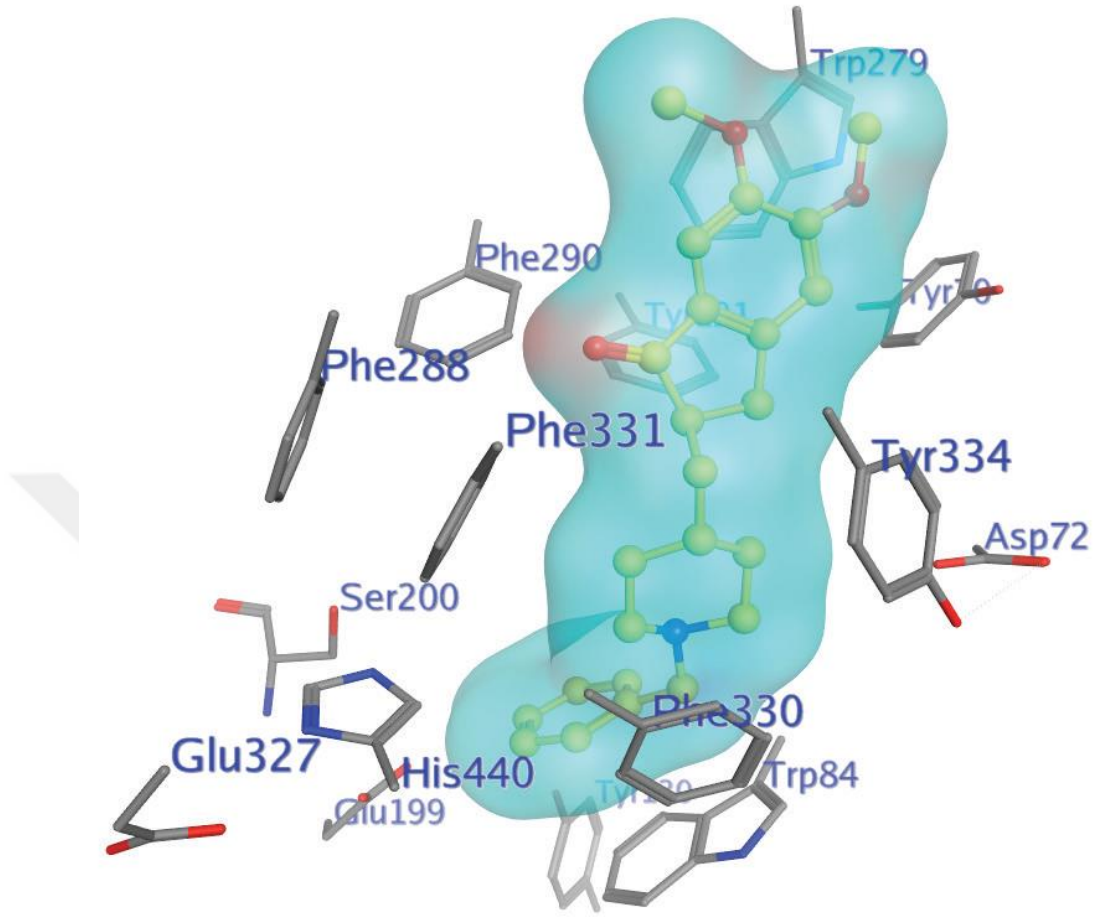
**Oksi-Anyon Deliği (OAD):** Kolin bağlama bölgesinin yanında bulunan oksii-anyon deliği Gly 118, Gly 119 ve Ala 201 rezidülerini içermektedir. Bu bölge sayesinde hem geçiş durumları stabilize olur hem de aktivasyon enerjisi bariyeri azalır. Substrat dikey



pozisyondan yatay pozisyona döndürülerek katalitik Ser 200'ün etkisine girmesi sağlanır (Zhang *et al.* 2002).

**Açıl Bağlama Cebi:** Substrat yatay olarak döndürüldüğünde, substratın açıl kısmı açıl bağlama cebine bağlanır. Asetilkolinesteraz'ın açıl bağlama cebinde Phe 288 ve 290'ın aromatik halkaları, substratın hareketini kısıtlar ve asetilkolin gibi küçük açıl gruplara sahip substratların katalizini hızlandırır (Radic *et al.* 1993; Pezzementi *et al.* 2003).

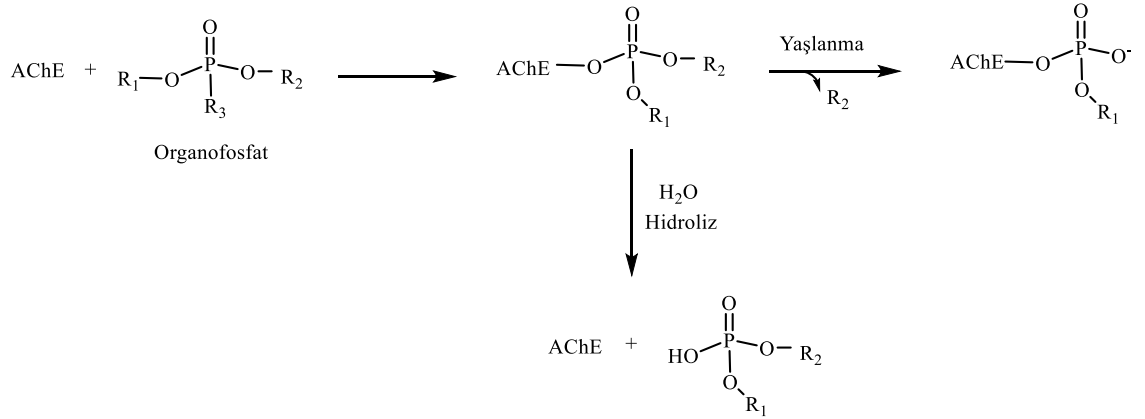
**Katalitik Triad:** OAD ve açıl bağlama cebiyle yaptığı etkileşimler sonucu stabilize olan substrat, aktif merkezin esteratik bölgesinde yer alan ve Ser 200, His 440 ve Glu 327'den meydana gelen katalitik triad'ın etkisine girer. Katalitik triad bir yük dağıtım sistemi olup, ilk aşamada Ser 200'ün OH grubundan His 440-Glu 327 ikilisi yönünde proton aktarımı sonucunda Ser 200 nükleofilik özellik kazanmaktadır. Ser 200 oksijeninin substrat olan asetilkoline atağı sonucu Açıl-enzim ara ürünü oluşur. Akabinde elektron dağılımının ters dönmesi sonucu bu ara üründen alkol biriminin uzaklaşması katalizlenir. İkinci ürün olan karboksilli asidin açığa çıkması ve son olarak Ser 200'ün His 440'den bir proton alarak serbest kalması ile enzim ilk haline dönmüş olur (Koellner *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2002; Tüylü Küçükkinç 2014).



**Şekil 1.23.** E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz aktif merkez oyuğunun MOE yazılımı aracılığıyla gösterimi (Protein data bank kodu: 1eve)

Kısacası AChE'in katalizleme mekanizması iki kademede gerçekleşmektedir. Birinci kademede enzim aktif bölgesinde barındırdığı aromatik aminoasit rezidüleri sayesinde güçlü bir nükleofilik özellik kazanmıştır ve bu şekilde atak yapar. İkinci kademede ise yine aktif bölgede bulunan ve ürünün oluşmasına olanak sağlayan serin rezidüsü bünyesindeki hidroksil grubu sayesinde hidrolizleme işlemi gerçekleşmektedir (Demir and Turkoglu 2005). Asetilkolinesteraz'ın en önemli fizyolojik rolü sinir uçlarından salınıp sinaps içerisinde nöral impulsun iletimini sağlayan asetilkolinin hidrolizini katalizlemektir (Vale 1998; Pope *et al.* 2005), ancak Bütirilkolinesterazın fizyolojik rolü hala bilinmemektedir (David *et al.* 2004; Temel 2008).





**Şekil 1.25.** Asetilkolinesterazın organofosfatlarla etkileşim mekanizması

Nörolojik bir rahatsızlık olan Alzheimer, AChE'in sistemli çalışmamasından kaynaklanır. Bu hastalıkta asetilkolin olması gerekenden çok daha hızlı bir biçimde ortadan kaldırılır ve böylece sinir uyarıları ya çok zayıf olur ya da sinir hücreleri arasında iletim tam olmamaktadır (David *et al.* 2004). Asetilkolin, Kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi katalizörlüğünde kolinerjik nöronlarda Asetil KoenzimA'daki (CoA) asetil grubunun kolin ile birleşmesiyle meydana gelmektedir. Asetil CoA ise, glikoliz yolunda oluşan pürivattan pürivat dehidrogenaz enzim kompleksi katalizörlüğünde sentezlenmektedir. Kolin de hem besinlerdeki hem de hücre membranlarında mevcut olan fosfolipitlerden elde edilmektedir. Bunun yanında asetilkolinesterazın hidrolizini katalizlediği asetilkolinden de açığa çıkmaktadır. Sinapslardaki asetilkolin miktarı kolinasetiltransferaz ve asetilkolinesteraz miktarına bağlıdır. Sentezlenen asetilkolinler presinaptik nöron veziküllerinde depolanıp, nöronlara sinir uyarıları geldiği zaman sinaptik boşluğa salınır. Sinaptik boşluktaki asetilkolinlerin büyük bir kısmı postsinaptik reseptörlere bağlanır. Açıkta kalan yani reseptörlere bağlanmayan asetilkolinler ise asetilkolinesteraz tarafından hidrolize uğrayarak yıkılır. Postsinaptik nöronlara bağlanmış olan asetilkolin sinir uyarısının iletimini sağladıktan sonra ayrılarak asetilkolinesteraz tarafından hidrolize uğrar ve bu yolla elde edilen kolin de tekrar kullanılmak amacıyla presinaptik nöronlara aktarılır (Nelson ve Cox 2005).

Günümüzde yaygın olarak ortaya çıkan bir çeşit demans rahatsızlığı olan Alzheimer aynı zamanda nörodejeneratif bozukluktur. Bu türlü demans rahatsızlıklarında beyinde

bellek üzerinde fonksiyonlarının aksaması şeklinde tanımlanmaktadır. Alzheimer rahatsızlığının en önemli sebeplerinden biri beyindeki asetilkolinin miktarında meydana gelen azalmadır (Akıncıoğlu *et al.* 2013). Daha önce de belirtildiği gibi bir çeşit demans rahatsızlığı olarak ortaya çıkan Alzheimer hastalığı ile birlikte; sosyal ve öğrenme fonksiyonlarının giderek azalması sonucu olarak bellekte, algılamada, soyut düşünme, problemleri çözme, konuşma yetisinde ve yargılama kapasitesi gibi yaşamın kaliteli bir biçimde sürdürülmesi için oldukça önemli olan fonksiyonlarda aksaklıklar görülmektedir (Şahin and Yazıcı 2007).

Alzheimer'in de Parkinson hastalığında olduğu gibi kesin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Günümüzdeki mevcut tedavi yöntemleri sadece hastalığın belirtilerini en aza indirmeye yöneliktir. Hastalığı tamamen gidermeye yönelik bir tedavi şekli şu an için mevcut değildir. Hastalık tamamen giderilemese de, Alzheimer hastalarının olduğunca kaliteli bir yaşam sürdürebilmesi için AChE inhibitörleri (Donepezil, Rivastigmin) yaygın olarak kullanılır (Göçer *et al.* 2013). Fakat inhibitör etkisi gösteren bu tür ilaçlar da gastrointestinal bozukluklar ve hepatotoksisite gibi yan etkilerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu sebeple, son zamanlarda hem etkin hem de güvenli olan ve bunun yanında özellikle de doğal olan AChE inhibitörler daha da önem ve ilgi odağı olmuştur. Çoğu pestisit ve herbisit AChE inhibitörü olarak aktivite göstermektedir. Tıp ve ziraat alanlarında yaygın olarak AChE inhibitörler kullanılabilir. Her iki alanın da canlılarla doğrudan bağlantısı olması sebebiyle yan etkilerin ortadan kaldırılması açısından doğal ürün yapısındaki inhibitörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Akıncıoğlu *et al.* 2013).

#### **1.11.1.b. Bütirikolinesteraz Enzimi**

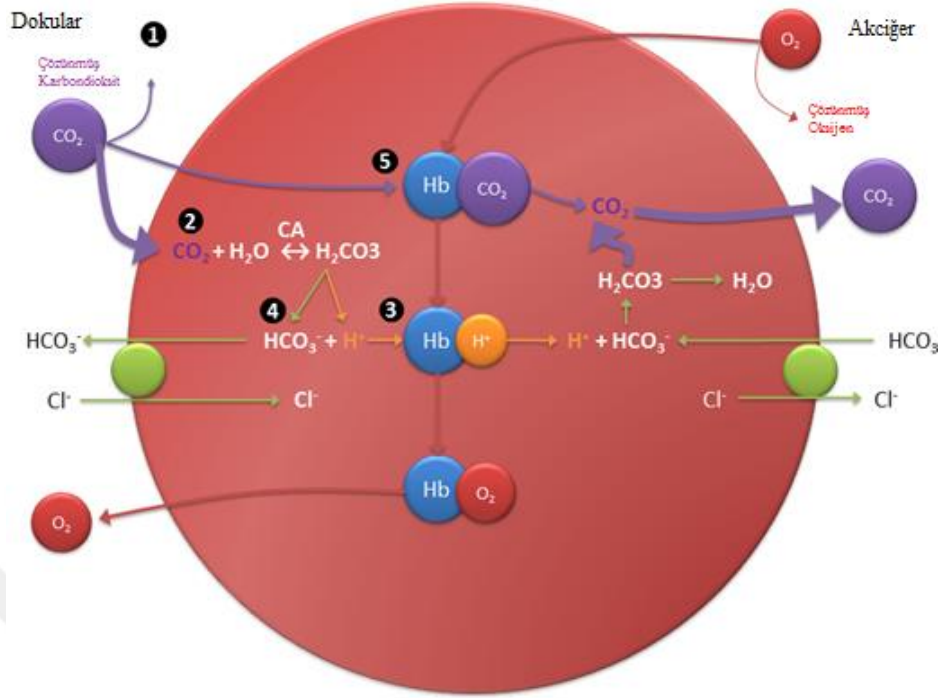
Kolinesterazlar, kolin esterlerini hidroliz eden enzimler olarak tanımlanmışlardır. Farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleştirilen araştırmalar sonucu kinetik olarak farklı özellikte iki çeşit kolinesteraz enzimi olduğu tespit edilmiştir (Brown *et al.* 1981). Bunların ilki, düşük substrat derişimlerinde yüksek aktivite sergileyen fakat yüksek substrat konsantrasyonlarında ise inhibisyona uğrayan ve insan eritrositlerinde lokalize

olan gerçek (Asetilkolinesteraz) kolinesterazdır. İkinci enzim ise, substrat konsantrasyonu arttıkça aktivitesinde de artış olan ve insan serumunda lokalize olmuş Psödokolinesteraz (Bütirilkolinesteraz)'dır (La Du and Dewal 1970; Brown *et al.* 1981; Massoulié *et al.* 1993). İlerleyen zamanlarda yapılan incelemeler sonucu eritrositlerde bulunan gerçek kolinesterazın sadece kolin esterlerini hidrolizlediği, serumda bulunan psödokolinesterazın da kolin yapısında olmayan ester moleküllerini de hidroliz ettiği tespit edilmiştir (Layer *et al.* 2005). Neticede kolinesterazlar, bir nörotransmitter olan asetilkolinin kolinerjik sinapslardan salınmasıyla yıkımını gerçekleştirerek kolinerjik sistemini kontrol altına alırlar (Brown *et al.* 1981; Massoulié *et al.* 1993). Bütirilkolinesteraz, hem bütirilkolini hem de asetilkolini hidroliz eder, ancak bütirilkolini daha hızlı bir şekilde hidroliz etmektedir. Kolinesterazların en iyi aktivite gösterdiği pH aralığı fizyolojik pH aralığıdır. Reaksiyon mekanizması enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsü vasıtası ile gerçekleşir (Alles and Hawes 1940; Massoulié *et al.* 1993). Diisopropilflorofosfat bileşiklerinin kolinesteraz enzimlerinin aktif bölgesindeki serin rezidüsünü alkillemesiyle birlikte geri dönüşümsüz bir inhibisyon meydana gelmektedir (Lockridge 1990; Massoulié *et al.* 1993). İnsektisitler ve sinir gazları olarak bilinen organofosfatlar da kolinesteraz enzimlerinin spesifik inhibitörleri olmaktadır (Brown *et al.* 1981; Darvesh *et al.* 2013). AChE ve BChE dokularda farklı konsantrasyonlarda lokalize olmaktadır (Massoulié *et al.* 1993). Yetişkinlerde serum AChE enzimi miktarı 8 ng/mL iken BChE enzimi konsantrasyonu ise 3 300 ng/mL seviyelerinde bulunmaktadır (Chatonnet and Lockridge 1989). AChE kaslarda ve sinir sisteminde yüksek oranda bulunurken, BChE enzimi de bu dokularda az miktarda bulunmaktadır (Massoulié *et al.* 1993). BChE karaciğerde sentezlenir ve kana karışır. Ayrıca, adipoz doku, ince barsak, akciğer ve beyin beyaz maddesinde de lokalize olmaktadır. Kolinesteraz enzimlerinin substrat seçicilikleri birbirinden farklıdır. AChE asetilkolini uzun zincirli kolin esterlerine göre daha hızlı hidroliz ederken, BChE enzimi de bütirilkolin ile sentetik yapıdaki substratların hidrolizini hızla gerçekleştirmektedir (Chatonnet and Lockridge 1989). BChE enzimi 342 kDa ağırlığında olan ve tetramerik yapıya sahip bir glikoproteindir (Arısoy Ağırğöl vd 2008). BChE, kardeş enzimi olan AChE enzimine benzer şekilde 3 farklı katalitik bölgeye sahiptir. Bunlar; esteraz, aril açilamidaz ve peptidaz (proteaz) aktivitesi gösteren bölgelerdir. AChE enziminin kolinerjik etkileri net bir biçimde açıklanmış

olmasına karşın, BChE enziminin fizyolojik rolü ve önemi hali hazırda tam olarak açıklanamamaktadır (Masson *et al.* 1998). Her iki enzim de farklı dokularda lokalize olan benzer işlevlere sahiptirler. BChE enzimi, etkili inhibitörleri olarak bilinen organofosfat ve karbamat yapısındaki moleküllerinin AChE'a ulaşmasını engellemek için dolaşımında hidroliz etmektedir. AChE eksikliğinde kolinerjik sinir iletiminin kontrolü sırasında, anestetik bir molekül olan süksinilkolinin hidrolizi, aspirin, eroin ve amitriptilin gibi bazı ilaçların metabolize edilmesinde, bambuterol'ün aktifleştirilmesi gibi reaksiyonları katalizleme etkisi olduğu da tespit edilmiş ve oldukça önem kazanmıştır (Massoulié *et al.* 1993; Darvesh *et al.* 2013 ). Bu sebeple de BChE birçok molekülü detoksifiye eden enzim olarak nitelendirilmektedir (Massoulié *et al.* 1993).. Örneğin, insanlar için kas gevşetici bir molekül olan süksinilkolinin hidrolizi gerçekleşmediği için anestezi ile uykuda kalma süresinin artması BChE enziminin aktivitesinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Brown *et al.* 1981; Massoulié *et al.* 1993). Daha önce de bahsedildiği gibi organofosfat molekülleri kolinesteraz enzimlerinin güçlü inhibitörleridir (Masson *et al.* 1997). Kimyasal savaş silahları da olarak kullanılan bu tür inhibitörler kolinesteraz enzimlerinin aktif bölgesindeki Ser 198 rezidüsünün fosforillenmesine ya da fosfonillenmesine sebep olarak kademeli bir şekilde inhibisyona neden olmaktadır. Fosforillenen enzim hidrofobik bir forma geçerek substratlarının hidrolizini gerçekleştirememektedir (Masson *et al.* 1997a). Fakat oksimler gibi güçlü nükleofilik etki gösteren moleküller sayesinde yeniden aktif hale geçebilmektedirler (Wong *et al.* 2000).

### **1.11.2. Karbonik Anhidraz**

Karbonik anhidraz (CA; Karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1), bünyesinde metal iyonu bulunduran ve CO<sub>2</sub>'in hidrasyonunu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in dehidrasyonunu tersinir olarak katalizleyen bir metaloenzimdir (Oktay *et al.* 2015). Karbonik anhidraz ilk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2001).



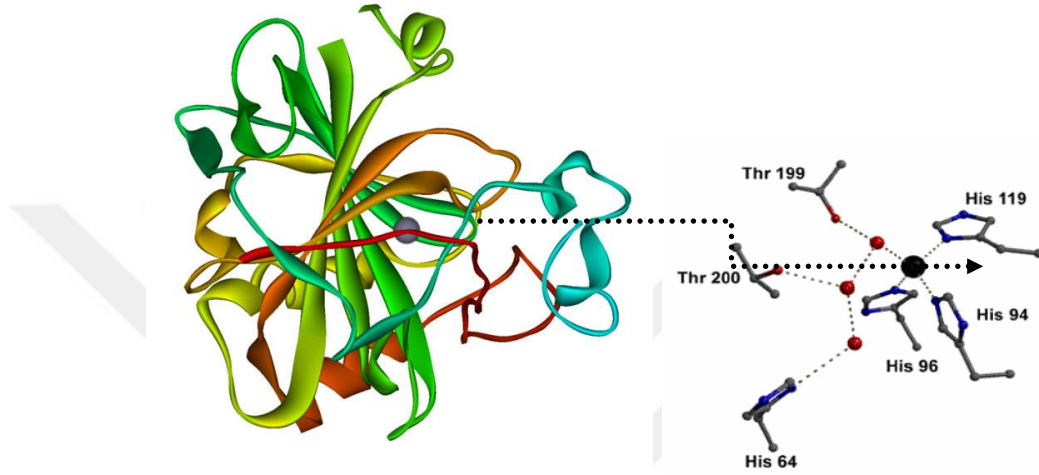
**Şekil 1.26.** Eritrositlerin kotransport sistemi ile transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan  $\text{HCO}_3^-$ 'in giriş ve çıkışını sağlaması

İlk olarak omurgalılar ve memelilerde daha sonra ise yüksek bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde karbonik anhidraz enzimi bulunduğu tespit edilmiştir (Krungrai *et al.* 2001).

CA insanlarda, mide, bağırsak sistemi, sinir sistemi, üreme sistemi, akciğerler, böbrekler, deri ve göz gibi dokularda mevcuttur (Supuran 2008). 1940'lı yıllarda Keilin ve Martin sülfonamidlerin karbonik anhidrazı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Buna rağmen karbonik anhidrazın izolasyon çalışmaları dört yıl sonra sonuç vermiştir. Bu enzim doğada bulunan en aktif enzimlerden birisidir ve sadece memelilerde değil diğer hayvan ve bitkilerde de bulunmaktadır. İnsanlarda beyin, akciğer, mide, pankreas, karaciğer, böbrekler, kas dokusu ve özellikle de alyuvarlar gibi dokularda bulunmaktadır. İnsan vücudunda bulunan en önemli tampon sistemlerindedir. CA asıl olarak solunum sırasında oluşan  $\text{CO}_2$ 'in suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan atılmasını sağlamakla beraber, asit-baz dengesini, iyon değişimini, kardiyovasküler sistemin düzenlemesi gibi pek çok fizyolojik olayda da rol alan çok önemli bir enzimdir



(Supuran 2013). CA, CO<sub>2</sub> molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri ve ayrıca siyanatın (ROCN) karbamata (R<sub>3</sub>NCO<sub>2</sub>) veya ürenin (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O), aldehitin (RCHO) geminal diole (R<sub>2</sub>C(OH)<sub>2</sub>) hidratasyonu reaksiyonları da bu enzim tarafından katalizlenir.



**Şekil 1.27.** Karbonik anhidraz izoenziminin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119)  
\*Büyük küre Zn<sup>+2</sup> iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir

CA ile ilgili çalışmalar ilerledikçe enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır lökositleri, sığır kemiği, kaslar, tükürük bezleri, sinir miyelin kılıfı, prostat, pankreas, beyin ve endometrium dokularından, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

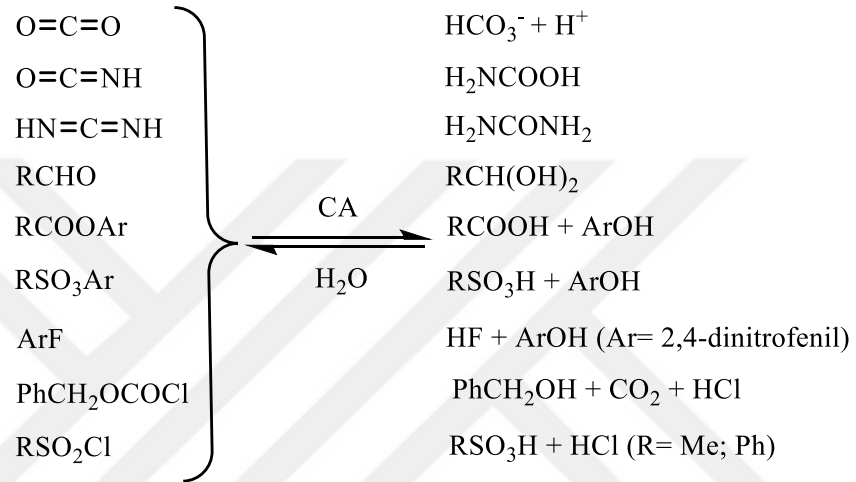
CA' nın  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - ve  $\eta$ -CA'lar şeklinde altı farklı genetik ailesi bilinmektedir (Scozzafava *et al.* 2015a; 2015b). İlk tespit edilmiş ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış izoenzimleri bünyesinde bulunduran  $\alpha$ -sınıfındaki enzimler monomerik yapıdadır. Çok az sayıda prokaryotik  $\alpha$ - sınıfı karbonik anhidraz da tespit edilmiştir. Şimdiye kadar CA enziminin 16 tane izoenzim tespit edilmiştir (Alterio *et al.* 2012; Ceruso *et al.* 2014). Bu izoenzimlerin hücre içi lokalizasyonu, inhibitörleri, katalitik

aktivite ve ilgileri farklılık gösterebilir. Bu izoenzimlerden beş tanesi sitozolde (CA I, CA II, III, VII ve XIII), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), bir tanesi mitokondride (V), bir tanesi (CA VI) salgı enzimi ve üç tanesinin de nonkatalitik (CA VIII, VIII, X ve XI) olduğu tespit edilmiştir (Supuran and Scozzafava, 2002; Supuran *et al.* 2003; Beydemir and Gülçin 2004; Bozdağ *et al.* 2015). Canlı sistemlerde çok yaygın bir şekilde bulunan CA enziminin, bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyaçlarına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Zamanla elde edilen verilere göre sürekli olarak yeni izoenzimleri ortaya çıkartılmış olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi tanımlanmıştır (Göçer and Gülçin 2011). Ayrıca CA bitkilerde de fotosentez olayı sırasında önemli görevler üstlenmiştir. Karbonik anhidrazın bitki hücrelerindeki lokalizasyonu ise çoğunlukla kloroplastlarda ve az miktarda da sitozolde bulunması şeklindedir. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve elektron transport zincirine elektron vericisi olan bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) iyonlarını sağlar.

Kloroplastlarda lokalize olmuş CA, tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde, bağlı CA olarak, stroma sıvısında ise çözülmüş CA olarak bulunmaktadır. Bitkilerdeki CA enzimlerinin fonksiyonları lokalizasyonu ile ilişkilidir. Üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak bulunan izoenzimleri ise CA I ve II'dir. Bu izoenzimler disülfid bağları ya da fosfat grupları bulundurmazlarken diğer tüm izoformları disülfid bağları ve fosfat grupları içermektedirler. Saflaştırması en rahat olan ve kullanımı yaygın olan izoformu CA II'dir (Akıncıoğlu *et al.* 2013). İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA II enzimi miktarı, 1 g hemoglobinin içerisinde 2 mg olarak hesaplanmıştır ve bu değer hCA I'e oranla daha azdır. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 °C'de  $10^6 \text{ s}^{-1}$  olarak bulunmuştur. hCA II ve IV izoenzimleri ise göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda bol miktarda bulunmaktadır. Genel olarak insandaki CA izoenzimleri incelenmiş, daha sonra da izoenzimlerin varlığı zamanla tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerin en önemli temel fonksiyonları, dokulardaki kılcal damarlardan metabolik bir ürün olan  $\text{CO}_2$ 'i,  $\text{HCO}_3^-$ 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{HCO}_3^-$ 'ın  $\text{CO}_2$ 'e dönüşüm reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında görev almasıdır (Göçer and Gülçin 2011). hCA I izoenziminin turnover sayısı da  $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$  olarak belirtilmiştir

(Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001). CA'nın katalizlediği reaksiyonlardan bazıları aşağıdaki çizelgede sunulmuştur (Supuran and Scozzafava 2001).

**Çizelge 1.6.** Karbonik Anhidraz enziminin katalizleme yaptığı reaksiyonlar (Supuran and Scozzafava 2001)



Tanımlanan hCA izoenzimlerinin birçok hastalıkla ilgisi vardır ve bunlar CA X ve XI hariç literatürde yer almaktadır.

**Çizelge 1.7.** Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin katalizlemesindeki aksaklıkların sebep olduğu hastalıklar ve bu İzoenzimlerin birbirleriyle olan ilişkisi (Alterio *et al.* 2012)

<b>İzoenzimler</b>	<b>İlgili Olduğu Hastalık</b>	<b>Diğer hCA İzoenzimleriyle Olan İlişkisi</b>
<b>CA I</b>	Retinal ve beyin ödemi	Bilinmiyor
	Glukoma	hCA I
<b>CA II</b>	Ödem	Bilinmiyor
	Epilepsi	Bilinmiyor
	Mide bulantısı	Bilinmiyor
<b>CA III</b>	Oksidatif stres	Bilinmiyor
<b>CA IV</b>	Glukoma	hCA I
	Retinitis Pigmentosa	Bilinmiyor
	Felç	Bilinmiyor
<b>CA VA/VB</b>	Obezite	hCA I ve II
<b>CA VI</b>	Karsinogenez	hCA II
<b>CA VII</b>	Epilepsi	Bilinmiyor
<b>CA VIII</b>	Nörodejenerasyonu	Bilinmiyor
	Kanser	Bilinmiyor
<b>CA IX</b>	Kanser	hCA I ve II
<b>CA XII</b>	Kanser	hCA I ve II
	Glukoma	Bilinmiyor
<b>CA XIII</b>	Kısırlık	Bilinmiyor
<b>CA XIV</b>	Epilepsi	Bilinmiyor
	Retinopati	Bilinmiyor

a: CA X ve XI için literatürde herhangi bir veri mevcut değildir (Alterio *et al.* 2012)

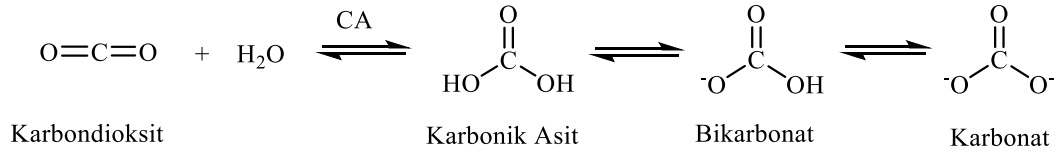
Son zamanlarda yapılan çalışmalarla mitokondriyal CA (hCA IV) enziminin inhibitörü olan sülfonamidlerin de üre sentezini azalttığı belirtilmiştir. Çünkü bu enzim, üre devrindeki sitrulin sentezinde kullanılan  $\text{HCO}_3^-$  iyonunu, sitrik asit devrinde açığa çıkan  $\text{CO}_2$ 'den sağlayarak üre devrinin ilerlemesini sağlar. Dokuların mitokondri

matrikslerinde bulunan hCA V izoenzimi de, karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağladığı için, üre devri ve glukoneogenez reaksiyonlarında rol oynadığı bilinmektedir. hCA V izoenzimi aynı zamanda lipogenez reaksiyonlarında da görev almaktadır (Hazen *et al.* 1996).

Tükrük bezinde ise CA enzimi olarak CA VI ve VII izoenzimleri bulunmaktadır. hCA VI izoenziminin tükrüğün pH dengesini sağladığı, hCA VII izoenziminin ise tükrükte bikarbonat salgılanmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Lakkis *et al.* 1996).

CA enziminin hidrataz aktivitesi reaksiyonu katalizlemesinin yanında, elektrofilik merkezlere sahip olan pirüvat, aldehit ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi reaksiyonlarını nükleofilik ataklar ile katalizlemektedir (Jabusch and Deutsch 1989; Lindskog 1997).

Karbonik anhidraz enzimi  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  ya da ortamın pH derecesine göre  $\text{CO}_3^{2-}$  ve  $\text{HCO}_3^-$  iyonları arasındaki dönüşümleri katalizlemektedir (Göçer and Gülçin 2013).  $\text{CO}_2$  difüzyonla kırmızı kan hücrelerine geçtiğinde, alyuvar hücrelerinde bulunan bu enzim sayesinde çok hızlı bir şekilde karboniksite dönüştürülür. Karbonikasit ise, proton ve bikarbonat iyonlarına ayrışarak tekrar kana geçer ve kanın pH'sını 7,4'e dengelemeye çalışarak doğal bir tampon çözeltisi olarak görev yapar. Hibritleşmesi sp olan karbon atomundan dolayı çizgisel yapıya sahip  $\text{CO}_2$ 'in,  $\text{sp}^2$  hibritleşmesine sahip karbon atomu içeren ve üçgen düzlem yapıya sahip olan  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'e kendiliğinden dönüşümü çok yavaş bir şekilde gerçekleşmektedir. Ancak bahsi geçen dönüşüm reaksiyonu CA katalizörlüğünde oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir ve bu dönüşüm sırasında  $\text{Zn}^{2+}$  iyonunun büyük etkisi vardır (Lindskog 1997). Karbonik anhidraz bu reaksiyonun hızını ileri derecede arttırarak saniyede  $10^4$ - $10^6$  reaksiyon hızına ulaştırır. Fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Bu sayede organizmanın asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol üstlenir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, örneğin göz içi tansiyonunda, karbonik anhidraz enzim aktivitesine müdahale sıklıkla uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu açıdan karbonik anhidraz inhibitörleri klinik olarak önemli bileşiklerdir (Puscas *et al.* 2000).

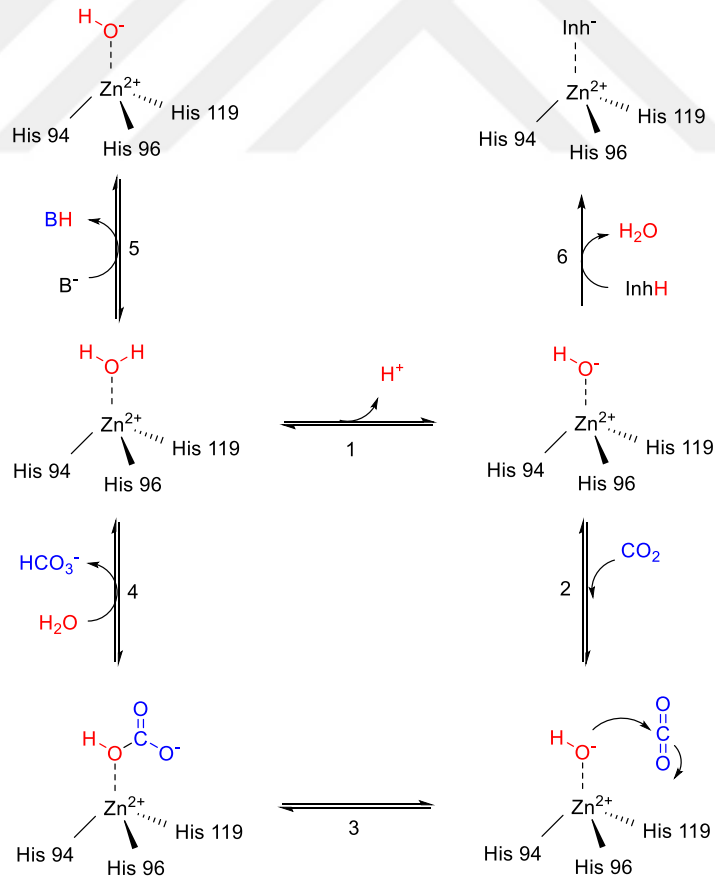


**Şekil 1.28.** Karbondioksit'in CA katalizörlüğünde metabolize edilmesi

X-ray kristalografi çalışmalarının sonuçlarına göre CA bünyesindeki metal iyonunun bir H<sub>2</sub>O molekülü veya OH<sup>-</sup> iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96 ve His 119) tarafından koordine edilen, enzimin aktif bölgesindeki 15 Å derinliğine sahip bir yarığın tabanında yer almaktadır. Kinetik çalışmalar bütün karbonik anhidraz izoenzimlerinde iki basamaklı bir mekanizmanın olduğunu göstermiştir. İlk basamakta çinko metal iyonuna bağlı hidroksit iyonunun CO<sub>2</sub>'ye nükleofilik saldırısı gerçekleşmektedir. İkinci basamakta ise çinko metal iyonuna bağlı H<sub>2</sub>O molekülünün iyonlaşması ve protonun uzaklaştırılmasıyla aktif bölgenin tekrar oluşturulması olayları gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada reaksiyonun üçüncü basamağında, protonun çözücü ortamına aktarılması için enzimin aktif bölgesindeki bir amino asit birimi proton taşıyıcı birim olarak rol almaktadır. Proton taşıyıcı birim, aldığı protonu ortamdaki tampon çözeltisine aktarmaktadır. CA II'nin katalizlediği enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması basamağıdır. Bu sebeple aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip amino asit birimleri aktivitede önemlidir. Ayrıca aktivitede çinkonun dördüncü ligand pozisyonuna yakın bölgede bir hidrojen bağı yapmak için hidrojen alıcısının olması da ayrı bir öneme sahiptir.

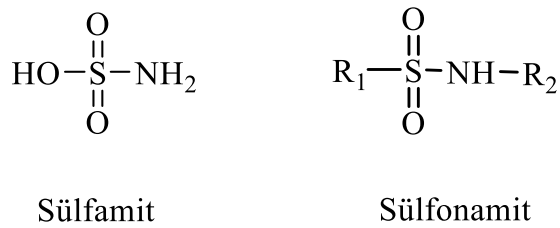
Çinko metalinin bağlı olduğu H<sub>2</sub>O molekülü, Glu 106'nın karboksil grubu ile sırasıyla köprü oluşturan Thr 199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı oluşturmak suretiyle tutunmaktadır. Bu etkileşimler sayesinde, çinkonun bağlı olduğu H<sub>2</sub>O molekülünün nükleofilik karakteri arttırılmakta ve uygun mesafedeki elektrofilik merkeze sahip olan CO<sub>2</sub>'e doğru hareket ederek nükleofilik olarak atak yapmaktadır (Arslan 1994; Akbaba *et al.* 2014). Karbonik anhidraz enziminin aktif formu hidroksil grubunun Zn<sup>2+</sup> iyonuna bağlanmasıyla oluşur (1. Kompleks). Enzim aktif hale geldikten sonra, sahip olduğu nükleofilik formu ile elektrofilik yapıdaki CO<sub>2</sub> molekülüne saldırır (2. Kompleks).

Böylece,  $Zn^{2+}$  metal iyonuna bağlı bikarbonat iyonunun oluşumu sağlanır (3. Kompleks). Takiben,  $HCO_3^-$  iyonu da ortamdaki bir  $H_2O$  molekülü ile yer değiştirerek çözelti ortamına geçer. Son olarak da,  $Zn^{2+}$  metal iyonuna  $H_2O$  molekülü bağlanmış olur (4. Kompleks) ve böylece enzimin asit formuna dönüşmesi sağlanır (Lindskog 1997; Akıncioğlu *et al.* 2013; Akbaba *et al.* 2014). Kompleks 1'in rejenerasyonu için de aktif formdan ortama bir proton transferi olur. Bahsi geçen proton transferi ya çözeltinin aktif kısmındaki proton mekiği, ya da ortamdaki mevcut tampon sistemi yardımcılığı ile olur (Scozzafava and Supuran 2002a; Çetinkaya *et al.* 2012). CA enziminin  $CO_2$ 'i hidrasyon reaksiyonunun katalizleme mekanizması için önerilen şema Şekil 1.4'te verilmiş (Lindskog 1997; Akıncioğlu *et al.* 2013). CA, biyofiziksel, biyoanalitik, biyoorganik ve özellikle ilaç tasarımı çalışmaları için oldukça elverişli bir enzimdir. CA, tek zincirli bir protein yapıya sahip olan, ortalama moleküler ağırlığına sahip olan bir enzimdir (Akıncioğlu *et al.* 2013).



**Şekil 1.29.** CA enziminin  $CO_2$  hidrasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi

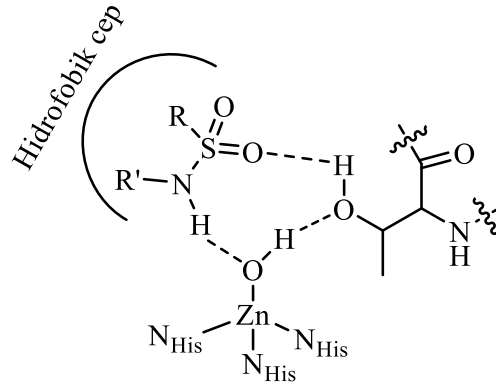
Gösterilmiş olan bu enzimatik katalizleme mekanizmasında reaksiyonun hızını belirleyen kademe protonun aktif bölgeden uzaklaştırıldığı kademedir. Bu sebeple de aktif bölgedeki proton taşıyıcı özelliğe sahip His aktivitede önemli bir rol oynamaktadır (Sly and Hu 1995). Yapılan çalışmalar Lys 91 ve Tyr 131 birimlerinin de proton transferi sırasında rol oynadığı bildirilmiştir. Enzim üzerindeki inhibisyon etkileri ya CA'nın aktif bölgesinde yer alan  $Zn^{2+}$  metal iyonuna bağlı olan  $H_2O$  molekülü ile yer değiştirmek suretiyle ya da  $Zn^{2+}$  metal iyonuna ek bir ligand bağı ile bağlanarak inhibisyon gösteren inhibitörler, mononegatif anyonlar (Halojenürler,  $N_3^-$ ,  $NCO^-$ ,  $SCN^-$  ve  $CN^-$  gibi) ve sülfonamidler gibi bazı nötral organik bileşikler enzime sıkı bir biçimde bağlanarak dönüşümlü bir inhibisyona sebep olmaktadır. Bu inhibitör türleri daha çok deneysel inhibisyon çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Karbonik anhidraz inhibitörleri göz hastalıkları tedavisinde kullanılan göz içi basıncını düşürücü etkisi en kuvvetli ilaçlar arasında yer almaktadır. Son zamanlarda göz içi basıncını azaltmada topikal ve sistemik olarak kullanılmaktadır. Karbonik anhidrazın sistemik bir inhibitörü olan asetazolamid ilk kez 1954 yılında Becker, Grant, Trotter, Breinin ve Gürtz tarafından glukom rahatsızlığında göz içi basıncını azaltmak amacı ile kullanılmıştır (Becker 1954). Ayrıca asetazolamid karbonik anhidraz enziminin en çok kullanılan inhibitörüdür.



**Şekil 1.30.** Sülfamid ve Sülfonamid'in genel kimyasal yapısı

Sülfonamidler karbonik anhidrazların spesifik ve etkili inhibitörlerindedir. Alkoller, organik çözücüler ve amitler gibi diğer nötral yapıda olan inhibitörler ise CA'ya gevşek bağlanmak suretiyle zayıf bir inhibisyon meydana getirmektedirler (Liang and Lipscom 1991).





**Şekil 1.31.** Sülfonamitlerin karbonik anhidraz ile etkileşim modeli

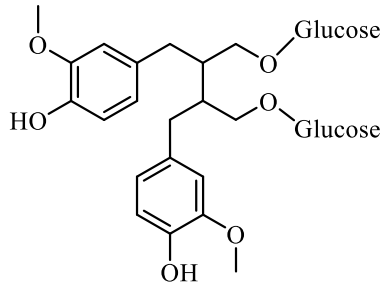
CA'nın en etkili organik yapıya sahip olan inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamitlerdir. Sülfonamitlerin kimyasal olarak genel yapısı  $RSO_2NH_2$  şeklindedir. Yapıdaki R grupları, genelde aromatik ya da heteroaromatik sistemlerine sahiptir. hCA II'nin  $K_i$  değerleri  $10^{-5}$  ile  $10^{-10}$  arasında yer almaktadır. Sülfonamitler kolay bir biçimde iyonik yapıya dönüşebilmektedir. Bu dönüşüm, karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için büyük bir önem arz etmektedir. Sülfonamitler ile karbonik anhidrazın etkileşmesi, ilk basamakta  $RSO_2NH^-$  bileşiğinde bulunan azot atomunun karbonik anhidrazın aktif bölgesinde yer alan  $Zn^{2+}$  metali ile iyonik bağlanması şeklinde olurken, ikinci basamakta ise hidrofobik etkileşimler sonucu inhibitör ile enzim arasındaki etkileşme gerçekleşmiş olur (Maren 1987; Arslan 2001).

Son zamanlarda hCA izoenzimleri için sülfonamitlerin dışındaki yapılarda inhibitör arayışına girilmiştir. Bilhassa ilaç tasarımı geliştirmede kullanmak için inhibitör geliştirme ve sentezleme çalışmaları artmıştır. Gülçin ve grubu tarafından da bu tür çalışmalar geliştirilmiş ve hatta ilk kez sentezlenerek literatüre kazandırılmış inhibitör potansiyelli bileşikler bulunmuştur (Oktay *et al.* 2015).

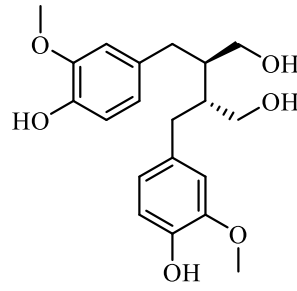
### 1.12. Çalışmanın Amacı

Endüstrileşme ve teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, doğal yaşamdan uzaklaşan insanların en büyük ve başa çıkamadıkları sorunu kronik hastalıklar olmuştur.

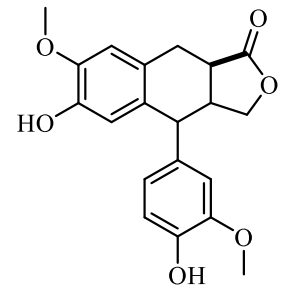
Günümüzdeki birçok kronik hastalığın oluşmasında serbest radikallerin çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. İnsan hayatına yer etmiş bu hastalıklara çözüm bulmak için, öncelikle bu hastalıklara sebep olan durumları ortadan kaldırarak, hastalıkların meydana gelmesini engellemek gerekir. Bunun için de önemli olan doğal ve dengeli bir biçimde beslenmek gerekir. Böyle bilinçli bir beslenme şekli ile antioksidanlarca zengin besin alımı sayesinde somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran serbest radikallerin etkileri minimuma indirgenerek yaygın olan çoğu kronik hastalıklardan korunmuş olunur. Ayrıca yaşlanma ile vücudun antioksidan savunma sisteminde meydana gelen azalma da doğru ve dengeli beslenme sayesinde güçlendirilebilir. Yaşam boyunca sağlığı ve iyi hali korumak, hasta olduktan sonra tedavi olmaktan çok daha önemli ve doğru bir yoldur. Bu nedenle de yapılması gereken modern hayatın stresinden ve karmaşasından olabildiğince korunmak ve bunun yanında sağlık için yararlı besinlerle doğru bir şekilde beslenme alışkanlıkları edinmektir. Yoksa vücutta oluşabilecek reaktif oksijen türleri ile savaştıkları antioksidan eksikliğinde oksidatif stres dediğimiz durumla organizmada birçok tahribat söz konusudur. Buna bağlı olarak en önemli etkilerden biri de DNA üzerinde gerçekleşen hasar olur ki bu da protein sentezinden enzimlerin fonksiyonlarına kadar çok ciddi aksaklıklara sebep olur. Doğal antioksidanlar profilaktik etki göstererek bu aksaklıkların meydana gelme riskini azaltmaktadır. Bundan dolayıdır ki araştırmacılar daha çok doğal antioksidan kaynaklar üzerinde çalışmalara yön vermektedirler. Hatta laboratuvarlarda bile doğal ürün sentezleri oldukça yaygınlaşmıştır. Bir kısmı bitkilerde sekonder metabolit olarak sentezlenen ve bir kısmı da bu metabolitlerin ince barsaklarda dönüştüğü formlar olan Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Dietilstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolakton (ENL), Nordihidroguaretik asit (NOR) ve  $\alpha$ -Conidendrin ( $\alpha$ -CON) moleküllerinin sahip oldukları kimyasal yapıları itibarıyla potansiyel antioksidan moleküller olabileceği düşünülmektedir.



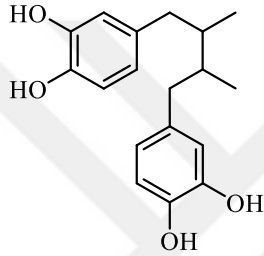
Secoisolariciresinol diglucoside  
(SDG)



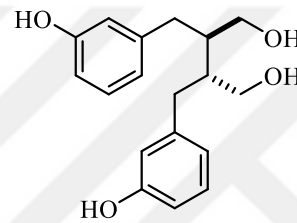
(-)-Secoisolariciresinol  
(SECO)



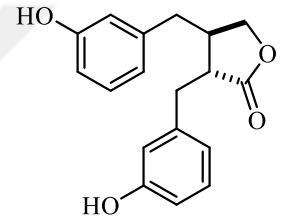
Alpha Conidendrin  
(α-CON)



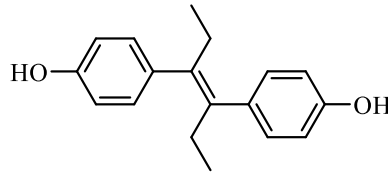
Nordihydroguaiaretic Acid  
(NOR)



Enterodiol  
(END)



Enterolaktone  
(ENL)



Diethylstilbestrole

**Şekil 1.32.** Çalışmalarda kullanılacak fitoöstrojenler

Sağlık açısından faydalı olabileceği düşünülen ve alternatif olarak doğal besin kaynaklı antioksidan maddelerin özellikle de bitkisel olanlarının teşhis edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeptendir ki son yıllarda bu alanlardaki çalışmalar da azımsanmayacak bir hızla ivme kazanmıştır (Prieto *et al.* 1999; Gülçin *et al.* 2006a; 2007a; 2009). Bitkisel kaynaklı bazı fenolik maddeler aynı zamanda besinlerde bulunan ve kolay bir şekilde oksitlenebilecek maddeleri bu oksidasyonlardan korurlar (Harborne 1994; Shahidi and Nacz 1995; Moure *et al.* 2001; Gülçin 2006b).

Tüm bu sebeplerden dolayı bu tez kapsamında fitoöstrojen özellik taşıyan fenolik karakterli Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Dietilstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolakton (ENL), Nordihidroguaretik asit (NOR) ve  $\alpha$ -Conidendrin ( $\alpha$ -CON)'in antioksidan özellikleri araştırıldı. Üzerinde çalışacağımız moleküllerin, antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ile birlikte AChE ve BChE enzimleri ile taze insan kanından yine tarafımızdan saflaştırarak olan Karbonik anhidraz (hCA I ve II) izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri de incelendi.

AChE ve BChE enzimleri başlıca beyinde ve sinir hücrelerinde bulunur (Wilson and Nachmansohn 1954) ve her iki enzim de hayvanlarda yaygın olarak bulunur. AChE'in en önemli fizyolojik rolü sinir uçlarından salınıp sinaps içerisinde nöral impulsun iletimini sağlayan asetilkolinin hidrolizini katalizlemektir (Vale 1998; Pope *et al.* 2005), ancak BChE'in ise fizyolojik rolü hala bilinmemektedir (David *et al.* 2004; Temel 2008). Asetilkolinesteraz'ın fonksiyonunun engellenmesi halinde sempatik ve parasempatik motor sisteminde ve merkezi sinir sisteminde değişiklikler meydana gelir (Lotti 1995). Gerek AChE gerekse BChE enzimlerinin aktivitelerinin azalması ya da aşırı yükselmesinden kaynaklanan ve özellikle de nörolojik hastalıkların tedavisinde bu enzimlerin aktivatörleri ya da inhibitörleri kullanılmaktadır. Fakat bu moleküller sentetik maddeler olmalarından dolayı elbette yan etkilere sebep olurlar. Bu nedenledir ki günümüzde doğal kaynaklı aktivatör ya da inhibitörlere yönelim oldukça rağbet görmektedir.

Gerek hCA I ve II izoenzimleri olsun gerekse AChE ve BChE olsun bu dört enzim sistemi de insan sağlığı açısından çok büyük öneme sahiptir. İnsan eritrositlerindeki hCA seviyesindeki değişiklikler diyabet, ödem ve hipertansiyon gibi birçok metabolik rahatsızlıklarla ilişkilendirilir (Gülçin *et al.* 2004f). AChE ve BChE enzimleri ise başta Alzheimer olmak üzere birçok nörolojik hastalıklardan ortaya çıkmasından sorumlu enzimlerdir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında, fenolik yapıdaki bileşiklerin sadece antioksidan özellikleri değil aynı zamanda inhibitör olarak kullanılarak inhibisyon

özellikleri de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak bu moleküllerin veya türevlerinin birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilirliği açısından ilaç tasarımlarına ışık tutacağını ve farmakoloji alanında da kayda değer katkılar sağlayabileceğini öngörmekteyiz.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Doğal antioksidan kaynakları; şifalı bitkiler, uçucu yağlar, çaylar, baharatlar, tahıllar, tohumlar, hububatlar, kakao kabuğu, sebze ve meyveler, savunma sistemindeki enzimler ve proteinler olarak sayılabilmektedir (Gökalp 2006). Kanserler de dâhil olmak üzere bu yapıların pek çok kronik rahatsızlıkları önlemede ve tedavi etmedeki fonksiyonları yaygın olarak çalışılmıştır (Shahidi and Naczk 1995).

Son yıllarda kalp hastalıkları ve antioksidanlar üzerinde yapılan çalışmaların vardığı sonuç ilaç olarak alınan antioksidanların kalp hastalıklarının önlenmesinde etkili olmadığı yönündedir. Hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise E vitamini desteğinin LDL olarak bilinen kötü kolesterolü arttırdığı görülmüştür. Meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kalp hastalıkları riskini azalttığı hatta sağlıklı kilonun korunmasının ve fiziksel aktivitenin de önemli olduğu vurgulanıyor. Yani vurgulamak istenen o ki antioksidan molekülleri ilaç olarak takviyesinden ziyade besinlerdeki dengeli miktarları ile doğal olarak vücuda almak gerekir (Shahidi and Naczk 1995).

Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi polifenolik bileşiklerin en yaygın olanları; kateşinler, flavonoller, flavanonlar ve fenolik asitlerdir (Shahidi and Naczk 1995; Gülçin 2012). Bu bileşiklerce zengin olan besin grubu özellikle meyve ve sebze kaynaklarıdır. Şimdiye kadar bu antioksidan kaynakları üzerinde pek çok inceleme yapılmıştır ve halen gerek farklı besin kaynaklarından saflaştırılmış moleküllerin gerekse sentezlenmiş saf moleküllerin antioksidan kapasiteleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu alanda yapılmış olan; dimerik yapıya sahip fenol bileşikleri (Gülçin and Daştan 2007), serotonin (Gülçin 2008), melatonin (Gülçin *et al.* 2002; 2003b; Gülçin 2008), morfin (Gülçin *et al.* 2004a), propofol (Gülçin *et al.* 2005a), kafeik asit (Gülçin 2006a), dantrolen (Büyükokuroğlu *et al.* 2001), rezveratrol (Gülçin 2010), L-Adrenalin (Gülçin 2009), L-karnitin (Gülçin 2006b), L-Tirozin ve L-Dopa (Gülçin 2007) ve kurkumin (Ak and Gülçin 2008) gibi saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak da büyük öneme sahip moleküller için antioksidan ve serbest radikal giderme kapasitelerinin araştırılmasına örnektirler. Hatta çalışılmış bu maddelerden bazıları için

reaksiyon mekanizmaları bile önerilmiştir (Gülçin 2006b; Güçin 2007). Yapılan incelemeler sonucu elde edilen aktivite değerleri, bu çalışmalarda standart olarak kullanılan BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks'un aktivite değerleriyle kıyaslanarak yorumlanır.

Bu tür çalışmaların dışında, farklı materyallerden saflaştırılan maddeler üzerine de antioksidan kapasitesi araştırmaları yapılmıştır. *Perilla pankenensis* bitkisinden antosiyaninler total olarak saflaştırılarak antioksidan çalışması gerçekleştirilmiştir (Gülçin *et al.* 2005b). *Alpinia officinarum* rizomları ekstraktları üzerinde antioksidan ve radikal giderme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Polat Köse *et al.* 2015). Yine *Onopordum İlyricum L.*'dan saflaştırılan cynarin için bazı antioksidan ve antiradikal çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Topal *et al.* 2016). Grubumuz tarafından yapılmış başka bir çalışma ise, sarmaşık bitkisinden saflaştırılan  $\alpha$ -hederin, hederasaponin-C, hederakolşizit-E ve -F saponinleri (Gülçin *et al.* 2004d) ile *Chionanthus virginicus* bitkisinden ligustrozit ve oleoropin gibi sekoiridoidler saflaştırılarak (Gülçin *et al.* 2009) hem antioksidan hem de antiradikal aktiviteleri araştırılmıştır. *Vinca herbacea* bitkisinden de izomajdin ve majdin maddeleri saflaştırılarak bu maddeler için apoptotik, antioksidan ve antiradikal aktivite özellikleri araştırılmıştır (Gülçin *et al.* 2012b). Son zamanlarda, propofol (Gülçin *et al.* 2005a), serotonin (Gülçin 2008), rezveratrol (Gülçin 2010), kafeik asit, fenetil esteri (Göçer and Gülçin 2011), eugenol (Gülçin 2011) gibi biyolojik açıdan önem arz eden moleküllerin de antioksidan aktiviteleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş ve standart antioksidanlar ile kıyaslamaları yapılmıştır.

Ayrıca, kiraz (Wang *et al.* 1999), kivi (Dawes and Keene 1999), çilek (Abuja *et al.* 1998), kızılçık (Gülçin *et al.* 2005c), tarçın (Chua *et al.* 2008), ışgın (Oktay *et al.* 2007), kuru erik (Donovan 1998), nane (Elmastaş *et al.* 2005), lavanta (Gülçin *et al.* 2004d), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), anason (Gülçin *et al.* 2003a), kiraz sapı (*Cerasus avium L.*) (Bursal *et al.* 2013), karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), defne (Elmastaş *et al.* 2006a), turunçgiller (Saleh *et al.* 1998), mantar (Elmastaş *et al.* 2006b), brokoli (Gülçin *et al.* 2004e), ıspanak (Gil *et al.* 1999), soğan (Ewald *et al.* 1999), patates (Friedman 1997) ve fasulye (Ewald *et al.* 1999), madımak

(*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2003), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), ısırgan (Gülçin *et al.* 2004d), karabiber (Gülçin 2005), zencefil (Stoilova *et al.* 2007), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra L.*) (Şerbetçi and Gülçin 2009), oğulotu (Köksal *et al.* 2011) ve ökse otu (Uçar *et al.* 2006) gibi pek çok meyve ve sebzeler ile zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) gibi bitkisel kaynaklı yağ ve propolis (Gülçin *et al.* 2010b) için antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Bunlara ilaveten meyve suları (Wen *et al.* 1999) ve zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998) üzerinde yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre iyi derecede antioksidan aktivite sonuçları kaydedilmiştir. Bunların yanında; şifalı bitkiler, baharatlar, çaylar, tohumlar, hububatlar, tahıllar, uçucu yağlar, meyve ve sebzeler, enzim ve proteinler de doğal antioksidan kaynağı sınıfına girebilirler (Gökalp 2006). Daha önce de belirtildiği gibi doğal antioksidan kaynaklarının kanser türleri de dâhil olmak üzere pek çok kronikleşmiş hastalığın oluşumunu önlemede veya tedavi etmedeki davranışları incelenmiştir (Shahidi and Nacz 1995).

Son zamanlarda, özellikle doğal antioksidanlar gerek sağlık gerekse gıda endüstrisinde büyük öneme sahip bir grup haline gelmiştir. Antioksidanlar önceleri özellikle gıda ve kozmetik alanında ürünlerin raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanılmaktaydı. Bu alanlarda kullanılan antioksidanlar ayrıca kauçuk, yakıt ve petrole ilave edilerek bunların bozunmalarını ve polimerizasyonlarını önlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Antioksidanlar, Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonunca (CAC) “gıdalardaki yağların acılaşması ve renklerinin değişmesi gibi oksidasyona maruz kalmaları gibi bozunumları önleyen ve ürünlerin raf ömürlerini uzatan maddeler” şeklinde tanımlanır. Yani antioksidan maddeler, yağların renk, görünüş, koku, tat ve besin değeri gibi önemli niteliklerinin kaybolmasını engelleyerek ürün kalitesini korurlar. Bunun yanında küf ve bakterilerin sebep olduğu bozunmalara karşı da koruyucudurlar. Doğal antioksidanlara örnek olarak C vitamini (Askorbik asit, E300) ve E vitamini (E306) verilebilir. Sentetik antioksidanlara örnek ise petrol kökenli BHA (E320) ve BHT (E321) ve TBHQ (E319) molekülleri verilebilir (Herbert 1997; Bjelakovic *et al.* 2007).



Alzheimer hastalığının bir sebebi, beyindeki kolinerjik kayıpların olduğu belirtilmektedir. Kolinerjik kavşak ve sinaplardan salınan asetilkolin miktarının Alzheimer hastalarında azaldığının saptanması ile, 1970'lerde asetilkolini hidroliz yolu ile parçalayan bir enzim olan asetilkolinesterazın inhibe edilerek asetilkolin miktarının artırılması şeklinde bir yaklaşım ortaya çıkmıştır (Quinn 1987; Francis *et al.* 1999). 1940'larda, AChE ve BChE olmak üzere iki tip kolinesteraz enzimi olduğu keşfedilmiştir. Bunlardan AChE enzimi, vücutta merkezi ve periferik, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda; BChE ise karaciğer ve plazma dâhil pek çok doku ile merkezi ve periferik sinir sisteminde daha yaygın olarak lokalize olmuştur (Quinn 1987). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, BChE miktarının, Alzheimer hastalarının beyinlerinde normal bireylerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Massoulié *et al.* 1993). Bu sebeple; BChE inhibisyonunun da AChE enzimini inhibe eden ilaçlarla doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bir çok çalışmada bu enzimleri inhibe etmek amacıyla bazı moleküller kullanılmıştır; Diaril eter bileşikler (Özbey *et al.* 2016), Rosemarinic acid molekülü (Gülçin *et al.* 2016), tetrahidropirimidin-5-karboksilat türevleri (Sujayev *et al.* 2016) bunlardan sadece birkaç tanesidir. Ancak bu tedavilerde kullanılan sentetik ilaçların büyük ölçüde yan etkileri görülmektedir, bu sebeple de doğal kaynaklı inhibitörlerin kullanımı daha çok tercih edilmektedir. Asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmek amacıyla organofosforlu bileşikler ve karbamat türevi bileşikler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Fernandez ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada *Anguilla anguilla*'da (Fernandez-Vega *et al.* 2002), beyin, kas ve solungaç dokularında organofosforlu bileşiklerin ve karbamat türevi bileşiklerin etkileri incelenmiş ve toplam AChE aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir. Buna benzer bir çalışmada ise, Ferrari ve arkadaşları tarafından *Carassius auratus*'un (Ferrari *et al.* 2004) beyin dokusunda organofosforlu bileşiklerin ve karbamat türevi moleküllerin etkisi araştırılmış ve yine toplam AChE aktivitesinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise, Dembele ve arkadaşları organofosforlu chlorfenvinphos ile karbamat carbofuran etkisinde kalan *Cyprinus carpio* L'nin beyin dokusunda AChE'nin önemli derecede inhibe olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte carbofuran'ın etkisi geçtikten sonra AChE'nin aktivitesinde geri dönüşümün kısa zamanda gerçekleştiği, ancak

chlorfenvinphos'un etkisi geçtikten sonra aktivitenin tam olarak geri dönüşümü için uzun zaman gerektiği rapor edilmiştir (Dembele *et al.* 1999).

Bahsedilen bu çalışmalardan farklı olarak, *Rutilus rutilus* ile *Abramis ballerus* üzerinde AChE ve BChE enzimlerinin duyarlılıkları kıyaslanmış ve BChE enziminin organofosforlu bileşiklere ve karbamat türevi bileşiklere olan hassasiyeti AChE'dan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Chuiko 2000). Birer organofosfat pestisit olan malathion ve anilofosun sıçanlardaki kan, eritrosit ve plazmalarındaki AChE ve BChE ile beyindeki AChE enzim aktiviteleri kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Hazarika *et al.* 2003). AChE ve BChE inhibitörleri olan karbamatlar, fenol ve türevlerinden sentezlenen sentetik moleküllerdir. Temas edildiği takdirde veya ağız yolu ile alınması durumunda mide zehirlenmelerine sebebiyet vermektedir. Ancak, yağ dokusunda birikmez ve kısa sürede de toksisitesini yitirirler. AChE enziminin inhibisyonuna sebep olurlar. Pirolan, propoksur ve aldikarb bunlara örnek verilebilir (Şanlı 1988).

Sinir gazı olarak bilinen organofosfatlar, II. Dünya Savaşı sırasında kullanılmış ve sinir sisteminde yer alan AChE enziminin inhibisyonuna sebep olarak asetilkolinin hidrolizini engelleyerek asetat ve koline dönüşümünü engellemiştir. Sonuç olarak, asetilkolinin sürekli olarak sinir iletimini sağlamasıyla motor kaslarının durmaksızın çalışmasına sebep olarak organizmaların ölmesine yol açmaktadırlar. Bu amaçla kullanılan bazı organofosfatlar arasında Paraokzon, Malaokzon ve Diklorvos bulunmaktadır (Ünal and Gürkan 2004). II. Dünya Savaşından sonra, bu organofosfatların sahip olduğu insektisit etkileri sayesinde zararlı böceklere karşı kullanılmıştır.

Tez kapsamındaki başka bir çalışma olan karbonik anhidraz (CA) enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu işlemleridir. Bu alandaki çalışmalar da daha çok hayvan dokuları üzerinde araştırılarak gerçekleştirilmiştir. Son dönemlerde bitkilerden de bu enzimin saflaştırılması işlemleri yaygınlaşmıştır. Ancak hayvan ve bitki karbonik anhidraz enzimleri arasındaki farklılıklar da yapılan çalışmalar sonucu belirtilmiştir

(Atkins *et al.* 1972). Karbonik anhidraz ilk olarak sığır eritrositinden saflaştırılmış ve daha sonra Keilin and Martin (1944) tarafından yürütülen çalışmalar sonucu CA'nın katalizleme işlevinin çinko metali ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylece CA enziminin bir metaloenzim olduğu ortaya çıkmıştır. İleriki yıllarda ise yüksek bitkilerde, suda yaşayan canlılarda, bakterilerde, mantar, böcek ve birçok memeli dokularında bu enzimin varlığı tespit edilmiştir (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006). Hayvan, bitki ve bakterilerde karbonik anhidraz enzimi iyon değişimi, asit-baz dengesi, elektrolit sekresyonu, üre döngüsü ve glukoneogenez gibi metabolik yollar için öncül maddelerin sentezlenmesi gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda rolü olduğu bulunmuştur (Bursal 2009). Bu enzim merkezi sinir sisteminde, göz ve ciğerde olmak üzere pek çok dokularda lokalize olmuş durumdadır (Beydemir and Gülçin 2004). Bitkilerden saflaştırılarak elde edilen sonuçlara göre, molekül kütlesi 160-260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Memelilerde yapılan araştırmalara göre ise molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002, Beydemir and Gülçin 2004). Bursal (2009) tarafından yapılmış bir çalışmada kivi meyvesinden saflaştırılmış CA enzimini molekül ağırlığı 66 kDa olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışma ise, maydanoz bitkisinden saflaştırılan CA enziminin hegzamerik bir yapıya sahip olduğunu ve 180 kDa molekül ağırlığında olduğunu ortaya koymuştur. Bu tür çalışmalar sonucunda, hayvan CA enzimlerinin bitki CA enzimlerinden farklı olduğu belirtilmiştir (Tobin 1970).

Başka bir çalışmada ise, hava soluyan balık türlerinden biri olan *Amia calva*'ların solungaçlarındaki ve hava keseciklerindeki karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonları ve karakterizasyonları araştırılmıştır. Solungaçlarındaki karbonik anhidrazın hücre sitoplazmasında lokalize olduğu ve bir çeşit CA bulunduğu, bunun da CA II ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Hava keseciklerindeki karbonik anhidraz'ın ise hücre membranına bağlı mikrozomal orjinli olduğu gözlemlenmiştir (Gervais and Tufts 1999).

Karbonik anhidraz izoenzimleri, insanlarda ve hayvanlarda ortaya çıkan birçok hastalığın tedavisine ışık tutacak özelliğe sahip bir enzimdir. Asetazolamit ( $C_4H_6N_4O_3S_2$ ), Brinzolamit ( $C_{12}H_{21}N_3O_5S_3$ ) ve Dorzolamit ( $C_{10}H_{16}N_2O_4S_3$ ) gibi bazı sülfonamid türevleri yapısına sahip ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleri sınıfına girmektedirler. Epilepsi, ödem ve glukom hastalıklarının tedavilerinde CA inhibitörleri ilaç olarak kullanılmaktadır (Bülbül *et al.* 2003; Akıncıoğlu *et al.* 2013).

Ancak, pek çok kimyasal atık malzemeleri CA enziminin katalizleme aktivitesini ciddi derecede azaltmakta ya da inhibe etmektedir. Yapılan bir araştırmada, yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, solungaç ve barsakta lokalize olmuş CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiş, sonuç olarak da karbonik anhidraz enzim aktivitelerinin önemli derecede inhibe olduğu belirtilmiştir (Lionetto *et al.* 2000).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez kapsamında gerçekleştirilecek olan çalışmada, antioksidan ve radikal giderme işlemlerinde kullanılacak olan, 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, trikloroasetik asit (TCA), 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT),  $\alpha$ - tokoferol ve Trolox Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri, asetilkolintiyoiyodat, bütirilkolintiyoiyodat, Secoisolariciresinol, Secoisolariciresinoldiglicoside, Dietilstilbestrol, Enterodiol, Enterolakton, Nordihidroguaretik asit ve  $\alpha$ -Conidendrin Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı. Enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu işlemleri için kullanılan Sefaroz-4B, standart serum albümin, L-tirozin ve *p*-nitrofenil asetat Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, fosforik asit, sülfirik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sodyum asetat, sodyum sülfat, , sodyum bikarbonat, sodyum perklorat, trihidroksimetilaminometan (Tris), 2-merkptoetanol, brom timol mavisi, glisin, 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 biyokimya araştırma laboratuvarından sağlanmıştır.

##### 3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	: Sanyo, Japan
pH metre	: Thermo
Hassas terazi	: Denver Instrument

İnkübatör	: Wiseven
Otomatik pipetler	: Eppendorf ve Socorex
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Firstream Calypso MK 1 Glass Still
Manyetik karıştırıcı	: Jeio Tech
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm <sup>3</sup> 'lük Kuartz Küvet

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanma şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

#### 3.1.3.a. Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. pH 6,6 olan ve 0,2 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 150 mL saf suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanarak hazırlandı.
2. %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> saf suda çözüldü ve toplam hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
4. %0,1'lik FeCl<sub>3</sub> çözeltisinin hazırlanması: 85 mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

**3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,01 M'lık  $\text{CuCl}_2$  çözeltilisinin hazırlanması: 47 mg  $\text{CuCl}_2$ , 50 mL saf suda çözünerek hazırlandı.
2.  $7.5 \times 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltilisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin, 50 mL %96'lık etanolde çözünerek hazırlandı.
3. pH 6,5 olan ve 1 M'lık  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponunun hazırlanması: 7,7 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  alındı ve 80 mL saf suda çözüldü, pH metre yardımı ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

**3.1.3.c. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler**

1.  $10^{-3}$  M'lık DPPH çözeltilisinin hazırlanması: Alüminyum folyo ile kaplanmış bir beher içerisinde 40 mg DPPH, 100 mL %96'lık etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlandı.

**3.1.3.ç. ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. pH 7,4 olan ve 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması: 2,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. 2 mM'lık ABTS çözeltilisinin hazırlanması: 11 mg ABTS, 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3. 2,5 mM'lık potasyum persulfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg  $K_2O_8S_2$  0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

#### 3.1.3.d. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

1. pH 3,6 olan ve 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması: 2,46 g  $CH_3COONa$  alındı ve 80 mL saf suda çözüldü. pH metre yardımı ile pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

2. 40 mM'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 0,334 mL %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve son hacim saf su 100 mL'ye ile tamamlanarak hazırlandı.

3. 10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,312 g TPTZ alındı ve 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözünerek hazırlandı.

4. 20 mM'lık  $FeCl_3$  Çözeltisinin Hazırlanması: 0,54 g  $FeCl_3.6H_2O$  alındı ve 100 mL saf suda çözünerek hazırlandı.

5. FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 10 hacim 0,3 M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık  $FeCl_3.6H_2O$  olacak şekilde yeterli miktarda çözelti hazırlandı.

#### 3.1.3.e. Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. pH 8 olan ve 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30,27 g Tris ve 0,370 g EDTA 200 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.



2. 10 mM'lık Asetiltiyokoliniyodat Çözeltisinin Hazırlanması: Alüminyum folyo kaplı bir behere 0,145 g Asetiltiyokoliniyodat alındı ve 50 mL saf suda çözünerek hazırlandı.

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması: Alüminyum folyo kaplı bir behere 0,01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat alındı 50 mL destile suda çözüldü.

### **3.1.3.f. Bütirilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. pH 8 olan ve 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30,27 g Tris ve 0,370 g EDTA 200 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

2. 0,5 mM'lık Bütiriltiyokoliniyodat Çözeltisinin Hazırlanması: Alüminyum folyo kaplı bir behere 0.008 g Bütiriltiyokoliniyodat alındı ve 50 mL saf suda çözünerek hazırlandı.

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması: 0,01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat alındı 50 mL destile suda çözüldü.

### **3.1.3.g. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. pH 8,8 olan ve 0,2 M'lık NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi (Sefaroz-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlamak için kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 900 mL saf suda çözünerek, 1N'lik NaOH çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlandıktan sonra, son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2. pH 10 olan ve 0,15 M'lık  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,1 M'lık  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisi ( $\text{CO}_2$ -hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan tampon çözelti): 15,9 g (0,15 mol)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 8,4 g (0,1 mol)  $\text{NaHCO}_3$ 'ın 1 litre saf suda çözünmesiyle hazırlandı.
3. pH 8,7 olan ve 25 mM'lık Tris-HCl / 0,1 M'lık  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisi (Afinite jelinin dengelenmesi işleminde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  900 mL saf suda çözündü. 1 N'lik HCl ile pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
4. pH 8,7 olan ve 25 mM'lık Tris-HCl / 22 mM'lık  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisi (hemolizatın tatbik edilmesinden sonra afinite jelinin yıkanması işlemi için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 900 mL saf suda çözündü. 1 N'lik HCl ile pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
5. pH 6,3 olan ve 25 mM'lık  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 1 M'lık NaCl çözeltisi (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu işlemi için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (veya 0,75 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ve 14,625 g NaCl 200 mL saf suda çözündü. Daha sonra 1 N'lik HCl yardımı ile pH 6,3'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.
6. pH 7,4 olan ve 0,05 M'lık Tris- $\text{SO}_4$  çözeltisi (Esteraz aktivitesi ve diyaliz işlemlerinde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 900 mL saf su içerisinde çözünerek, 1 N'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
7. pH 5,6 olan ve 0,1 M'lık  $\text{CH}_3\text{COONa}$  / 0,5 M'lık  $\text{NaClO}_4$  çözeltisi (kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g  $\text{NaClO}_4$  ve 2,04 g  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  120 mL saf su içerisinde çözündü. 1 N'lik HCl ile pH'sı 5,6'ya ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
8. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi çözeltisi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde

çözündü. Daha sonra bu çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

9. 0,025 M'lık veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbital 900 mL saf suda çözünüp, 0,1 M'lık HCl ile pH 8,2'ye ayarlandıktan sonra saf su ile 1 litreye tamamlandı.

10. CO<sub>2</sub> çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0 °C'deki saf suyun içerisinde CO<sub>2</sub> gazı geçirilerek hazırlandı.

11. İndikatör çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi işlemlerinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,218 g NaHCO<sub>3</sub> ün 1 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

12. %0,04'lük Brom Timol Mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün, 16 mL 0,01 N'lik NaOH çözeltisi içinde çözüldükten sonra, çözeltinin son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

13. Stok fenolik maddelere ait çözeltilerinin hazırlanması: 1 mg Secoisolariciresinol, Secoisolariciresinoldiglicoside, Dietilstilbestrol, Enterodiol, Enterolakton, Nordihidroguaretik asit ve  $\alpha$ -Conidendrin 1 mL çözücülerinde çözüldü.

- 10 mg Secoisolariciresinol üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Secoisolariciresinol tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.

- 10 mg Secoisolariciresinoldiglicoside üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Secoisolariciresinoldiglicoside tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.

- 10 mg Dietilstilbestrol üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Dietilstilbestrol tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.

- 10 mg Enterodiol üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Enterodiol tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.
- 10 mg Enterolakton üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Enterolakton tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.
- 10 mg Nordihidroguaretik asit üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı. Nordihidroguaretik asit tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.
- 10 mg  $\alpha$ -Conidendrin üzerine 7 mL etil alkol eklendi ve çalkalandı.  $\alpha$ -Conidendrin tamamen çözüldükten sonra son hacim etil alkol ile 10 mL'ye tamamlandı.

### **3.1.3.ğ.) SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler**

1. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 mL 1 M'lık Tris-HCl (pH 6,8) 1 mL %10'luk SDS, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950  $\mu$ L numune tamponu ile 50  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptoetanol ilave edilerek karıştırıldı.

2. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL saf suda çözüldü, daha sonra karışımın üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeterli miktarda hazırlandı.

4. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid karışımı 100 mL saf suda çözünerek hazırlandı.
5. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS 90 g saf suda çözünerek hazırlandı.
6. pH 8,8 olan ve 3 M'lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması: 36,3 g Tris, 48 mL 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
7. Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde yeterli miktarda çözelti hazırlandı.
8. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeterli miktarda çözelti hazırlandı.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi

Demir indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi (Gülçin 2009). Bunun için öncelikle konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde numuneler için stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonda numuneler cam tüplere mikro pipet yardımıyla aktarıldı. Hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe pH 6,6 olan 0,2 M'lık 2,5 mL fosfat tamponu ve 2,5 mL %1'lik K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ilave edilerek karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına 2,5 mL %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerine 2,5 mL saf su ve 0,5 mL FeCl<sub>3</sub> (%0,1) ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Köre olarak saf su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine saf su kullanıldı.

### 3.2.2. Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>+</sup> indirgeme kapasitesi

Tez kapsamında kullanılan fenolik yapıdaki moleküllerin Cu<sup>2+</sup> indirgeme kapasiteleri bakır iyonlarını indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif modifiye edilmesiyle uygulandı (Ak and Gülçin 2008). Numuneler ile hazırlanan stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler numune tüplerine pipetlenerek, 0,25 mL CuCl<sub>2</sub> çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi ( $7,5 \times 10^{-3}$  M) ve pH 6,5 olan 1 M'lık 0,25 mL CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> tampon çözeltisi bu tüplere sırayla pipetlendi ve vortex'te dikkatlice çalkalanarak karanlıkta inkübe edildi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi. Kör olarak ise saf su kullanıldı.

### 3.2.3. FRAP indirgeme aktivitesi

Öncelikle deney tüplerine toplam 1 mL çözeltilere 10, 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarına denk gelecek biçimde fenolik bileşikler ve standart çözeltiler pipetlendi. Hacimleri 0,5 mL'ye pH 3,6 olan 0,3 M'lık CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O tampon çözeltisi ile tamamlandı. Ardından deney tüplerine sırasıyla 2250 µl, 20 mM'lık FeCl<sub>3</sub> çözeltisi ve 2250 µL FRAP reaktifi ilave edilerek son hacim 5 mL'ye tamamlandı. Deney tüpleri Vortex'te dikkatli bir şekilde çalkalandı. 10 dakika sonra 593 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve kaydedildi. Kör olarak ise asetat tamponu kullanıldı.

### 3.2.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikallerini giderme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme kapasitesi çalışmalarında Blois metodu uygulandı (Blois 1958). Serbest radikal olarak DPPH'ın 10<sup>-3</sup> M'lık çözeltisi taze hazırlanarak kullanıldı. Numunelerin stok çözeltilerinden deney tüplerine, 1 mL toplam çözelti içerisinde sırayla 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında olacak şekilde numuneler pipetlendi ve %96'lık etanol ile son hacimleri 2 mL'ye tamamlandı. Ardından numune ve standart maddelere ait tüplere taze hazırlanmış DPPH' çözeltisinden 0,5 mL pipetlendi ve vortex'te çalkalandı. Tüpler 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbans değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedildi. Kontrol

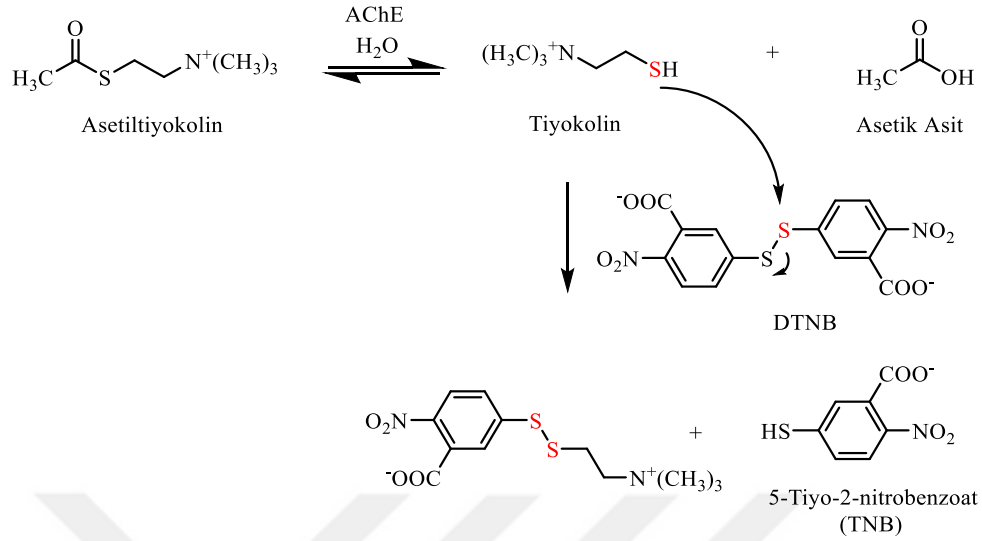
olarak, 2 mL etanol ve 0,5 mL DPPH' çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans değeri giderilmeyen DPPH' Radikali çözeltisinin miktarını gösterir.

### **3.2.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi**

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre incelendi (Re *et al.* 1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanarak, çözeltiye 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi eklenmesiyle ABTS radikallerinin üretilmesi sağlandı. Kontrol olarak 500 µL ABTS radikal çözeltisi ve 1500 µL %96'lık etanol kullanıldı. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile  $0,900 \pm 0,025$  nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına (20-60 µg/mL) 0,5'er mL ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve son hacim %96'lık etanol ile 2 mL'ye ayarlandı. 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra, etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi. Numune konsantrasyonları artıkça azalan bir absorbsiyon gözlemlendi.

### **3.2.6. Asetilkolinesteraz enzimi üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi**

Tez kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin, Asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu çalışmada Asetilkolinesteraz yöntemi kullanıldı. Elde edilen veriler doğrultusunda  $I_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanarak inhibisyon türleri belirlendi. Metodun prensibi; daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi AChE, asetilkolinin hidrolizini katalizleyerek parçalanma ürünleri olan tiyokolin ve asetatın oluşumundan sorumludur. İnhibisyon çalışmaları sırasında kullanılan DTNB'nin parçalanma ürünlerinden olan tiyokolin ile etkileşimi sonucu sarı renkli bir bileşik olan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan renkli bileşiğin renk şiddeti 412 nm'de ölçülür (Ellman *et al.* 1961). Numune ve kör kuvvetlerinin 412 nm'de, başlangıçta ve 5. dakikadaki absorbansları ölçülür.



**Şekil 3.1.** Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayin reaksiyonu mekanizması (Ellman *et al.* 1961)

**Çizelge 3.1.** Asetilkolinesteraz enzimine ait kinetik çalışmalarda kullanılan küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Çalkalanır ve 30 °C'de 5 dakika inkübe edilir.		
Asetilkolintiyoiyodür	50	50

### 3.2.7. Bütirilkolinesteraz enzimi üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız fenolik bileşikler'in, Bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Bütirilkolinesteraz enzimi için de Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen Asetilkolinesteraz yöntemi uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak  $I_{50}$  ve  $K_i$  hesaplanarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu enzim için kullanılan çalışma prosedürü AChE yöntemi ile aynıdır. Sadece AChE



yönteminde substrat olarak Asetiltiyokolin iyodat kullanılır, BChE enzimi için substrat olarak bütiriltiyokolin iyodat kullanılır.

### **3.2.8. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırılması için kullanılacak kanın temini**

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Deneylerde kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

### **3.2.9. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırma çalışmaları**

#### **3.2.10. CA enzim hemolizatının hazırlanması**

Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0.154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa dikkatlice yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile ve buz banyosunda 45 dk hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 °C'de 20.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra toz tris ile dikkatlice pH 8,7'ye ayarlanır. Geriye kalan taze kan ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

### **3.2.11. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar**

#### **3.2.11.a. Sefaroz-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması**

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş sefaroz-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Kolon materyaline L-tirozinin kovalent olarak bağlanması sağlandı. Daha sonraki aşamalarda sülfanilamitin diazollanarak tirozine kenetlenmesi sağlandı. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısında bulunarak söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

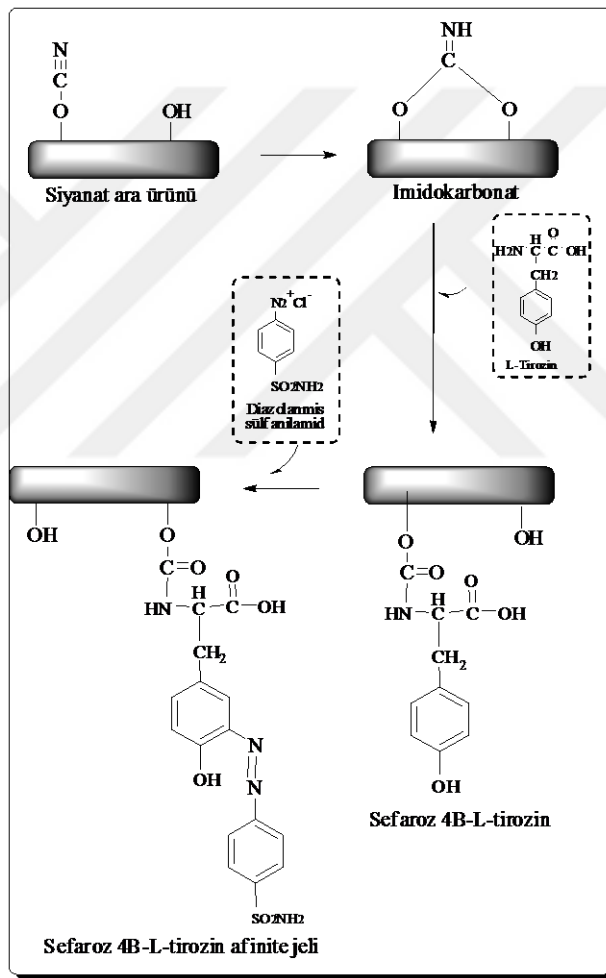
#### **3.2.11.b. CNBr ile aktifleştirilmiş sefaroz-4B'ye tirozin takılması**

CNBr ile aktifleştirilmiş sefaroz-4B, 250 mL soğuk pH 10 olan ve 0,1 M'lık NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile yıkanarak bir behere alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözünerek, kolon materyalinin içerisinde bulunduğu soğuk çözeltiliye ilave edilerek karıştırılması sağlandı. Yıkama işlemi, tirozin çözeltilisi ilavesi ve bagetle dikkatlice karıştırma işlemlerinin 90 saniyeden daha kısa bir sürede tamamlandığı gözlemlendi. Daha sonra, süspansiyonun +4 °C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda yavaş bir şekilde karıştırılması ve akabinde 16 saat boyunca da +4 °C'de bekletilmesi sağlandı. Bu işlemler sonucunda, yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye dek bol su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen tirozinin tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi pH 8,8 olan ve 100 mL 0,2 M'lık NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile tekrarlandı. Son olarak tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alınarak sonraki işlemler için bekletildi.

#### **3.2.11.c. Sülfanilamit kenetlenmesi**

25 mg sülfanilamit, 0 °C sıcaklığında 10 mL ve 1 M'lık HCl içerisinde çözüldü. Daha sonra içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0 °C'deki 5 mL çözeltili, sülfanilamid çözeltilisine damla damla ilave edildi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olan

sülfanilamit, 40 mL Sefaroz-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'te sabit tutulmak suretiyle, 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Akabinde 1 L saf su ve pH 7,4 olan 200 mL 0,05 M'lık Tris-SO<sub>4</sub> tamponuyla yıkandı. Son olarak üzerine bir miktar daha aynı tampondan ilave edilerek +4 °C'da muhafaza edildi. Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.2'de gösterildi (Söyüt 2006; Öztürk Sarıkaya 2009).



**Şekil 3.2.** CNBr Sefaroz 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

### 3.2.11.ç. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH 7,8) içine alınıp süspanse edildi. Su trombu kullanılarak vakum ile hava kabarcıkları giderildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu geçirildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### 3.2.11.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi. Kolon pH 8,7 olan 25 mM'lık Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA izoenzimlerinin kolona tutunması ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Sonra pH 6,3 olan 1 M'lık NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu dengelenmiş kolona tatbik edilerek hCA I enzimi elüe edildi. Ardından, tekrar dengeleme tamponu kolona tatbik edilir kolon renk değişimi ayırt edilince, pH 5,6 olan 0,1 M'lık CH<sub>3</sub>COONa / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kolona tatbik edilerek hCA II enziminin elüe edilmesi sağlandı. Fraksiyonlar 5'er mL olacak şekilde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbans değerlerine bakıldı.

### 3.2.12. CA izoenzimleri aktivitesi tayini

#### 3.2.12.a. Hidrataz aktivitesi

Bu amaçla öncelikle hidrataz aktivitesi yöntemi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Rickli *et al.* 1964). Bu yöntemin prensibi, CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan kaynaklanan pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü yardımıyla belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüp içerisine, pH 8,2 olan 0.025 M'lık 1 mL veronal tamponu, 0,1 mL %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO<sub>2</sub> çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre belirlendi (t<sub>0</sub>). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t<sub>c</sub>).

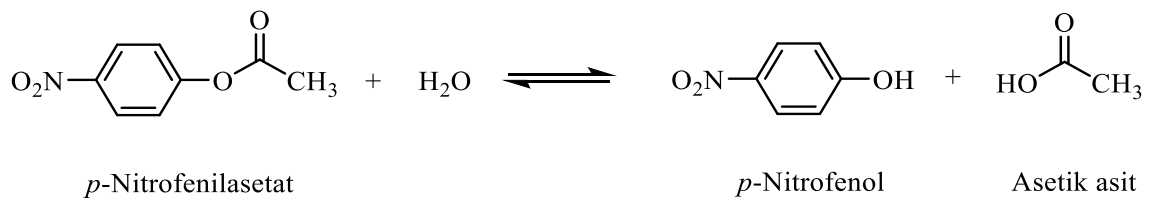
Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$

Formülüne göre; kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960). Hemolizat ve saf enzim çözeltisi aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı. Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı.

### 3.2.12.b. Esteraz aktivitesi

Yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Yöntemin prensibi; karbonik anhidraz enziminin substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmesidir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



**Şekil 3.3.** *p*-Nitrofenilasetat'ın hidroliz mekanizması

Bu yöntemde, 348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu nedenle reaksiyonda sırasında fenol ya da fenolat oluşumu ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte *et al.* 1967; Göçer and Gülçin 2013). 348 nm’de *p*-nitrofenilasetat çok az da olsa absorpsiyon verdiği için, kör olarak kullanılmaktadır. Ölçümlerde 3 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak reaksiyon karışımı aşağıdaki sıralamaya göre karıştırılarak aktivite tayin prosedürü uygulandı.

**Çizelge 3.2.** hCA izoenzimleri için Esteraz aktivitesi çalışmalarında kullanılan 3 mL’lik küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) ( $\mu$ L)	Numune Tüpü
0,5 M Tris-SO <sub>4</sub> , pH 7,4	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	3000

Bununla birlikte, 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak yapılan aktivite tayini çalışmaları sırasında reaksiyon ortamını oluşturan her bir maddenin katılma sırası ve miktarı aşağıdaki prosedüre göre uygulandı;

**Çizelge 3.4.** hCA izoenzimleri için Esteraz aktivitesinde kullanılan çözeltilerin kullanım sırası ve 1 mL’lik küvet içerikleri

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) ( $\mu$ L)	Numune Tüpü
0,05 M Tris-SO <sub>4</sub> , pH 7,4	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Çizelge 3.4'deki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans değerleri okunarak 3 dakika sonunda 25 °C'deki 348 nm'de absorbansı okunarak sıfırıncı saniyedeki absorbans değeri ile arasındaki farkı alındı. Spektrofotometre, Çizelge 3.4'deki kör tüpü hazırlanarak 3 dakika sonunda absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Deneyde substrat çözeltisi olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetat çözeltisi, alüminyum folyoya sarılı bir beher içerisinde günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 mL saf aseton içerisinde çözünerek, manyetik karıştırıcıda hızlı bir şekilde karıştırılan 49 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı daha derişğini hazırlamak mümkün değildir. Aseton, yapılan araştırmalar sonucu diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu tespit edildiği için tercih edildi (Verpoorte *et al.* 1967). Yapılan kinetik çalışmalarda aktivite ölçüm işlemleri enzimin esteraz aktivitesi prosedürüne göre gerçekleştirildi.

### **3.2.13. Protein Tayini**

#### **3.2.13.a Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan aromatik amino asitler olan triptofan ve tirozinin yapısındaki konjuge çift bağlar sayesinde maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot ile gerçekleştirilen kromatografi işlemlerinde eşit hacimlerde tüplere alınan bütün fraksiyonlara kalitatif protein tayini işlemi uygulandı. Fraksiyonların kuvartz küvetler yardımıyla absorbans değerleri spektrofotometrede köre karşı okunarak kaydedildi.

#### **3.2.13.b. Kantitatif protein tayini**

Hem hemolizattaki hem de afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları kantitatif protein tayini yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemin esası, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanmasına dayanır. Boyar madde ve proteinin etkileşmesi ile oluşan kompleks 595 nm'de maksimum

absorbans gösterir. Kompleks oluşum reaksiyonu çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Tayin işlemlerinde takip edilen prosedür; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak, saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanarak 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırılarak karanlıkta inkübe edildi. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu.

Kör olarak, 0,1 mL aynı tampon çözeltisi ve 5 mL renkli boyar madde reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için de aynı yöntem uygulanarak standart grafikten miktar tayini yapıldı.

### **3.2.14. CA İzoenzimleri için yapılan kinetik çalışmalar**

#### **3.2.14.a. $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar**

Taze insan kanından saflaştırılan hCA izoenzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenebilmesi için en az beş farklı substrat konsantrasyonu kullanıldı. Optimum şartlarda aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten de  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### **3.2.15. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü**

hCA I ve II izoenzimlerinin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından geliştirilen yöntem olan SDS-PAGE tekniği ile enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi (1970). Saflaştırılan enzim örnekleri jelle yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptolanol ile muamele edildikten sonra, 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler %20 ayırma jelindeki elektroforezden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban *et al.* 2008).



### 3.2.16. hCA I ve II izoenzimleri üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi

Çalışmalarımızda kullandığımız fenolik bileşikler'in, saflaştırılacak olan hCA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Esteraz aktivitesi tayin yöntemi kullanılarak ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanarak inhibisyon türleri belirlendi.



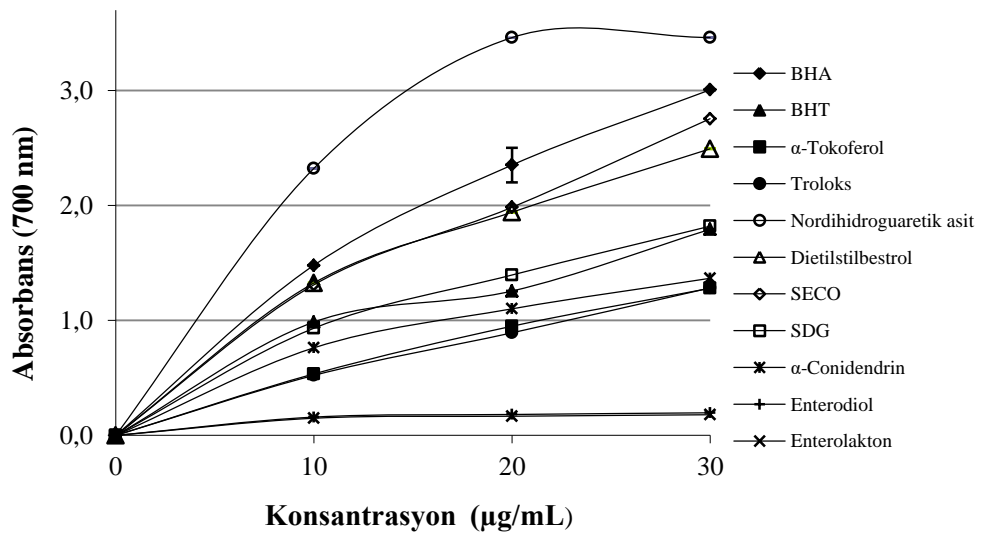
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma bulguları

#### 4.1.1. Antioksidan çalışmalar ile ilgili araştırma bulguları

##### 4.1.1.a. Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu metot ile test çözeltilisinin sahip olduğu sarı renk ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme kapasitelerinden dolayı yeşilin farklı tonlarındaki renklere dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006a). Bu çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerin indirgeme kapasiteleri artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Kullanılan fenolik bileşiklerin indirgeme potansiyelleri farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.1).

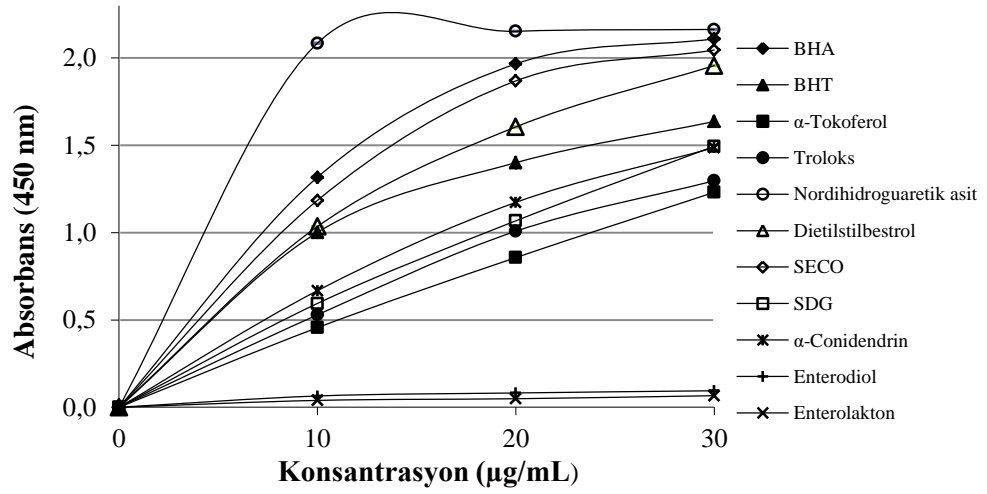


**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) bazı fenolik bileşiklerin ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Kullanılan fenolik bileşiklerin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.1) her bir standart antioksidan ve kullanılan fenolik bileşikler için  $10 \mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda kullanılan fenolik moleküllerin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları; Nordihidroguaretik asit > BHA > Dietilstilbestrol > Secoisolariciresinol > BHT > Secoisolariciresinoldiglicoside >  $\alpha$ -Conidendrin >  $\alpha$ -Tokoferol > Troloks > Enterodiol > Enterolakton şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.1'de gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

#### **4.1.1.b. $Cu^{2+}$ - $Cu^+$ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular**

Kullanılan bu metot ile fenolik yapıdaki bileşiklerinin kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasiteleri, konsantrasyon ile orantılı olarak arttığı gözlemlendi. Kullanılan fenolik moleküllerin, kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki ( $10\text{-}30 \mu\text{g/mL}$ ) çözeltilerinin  $450 \text{ nm}$ 'deki absorbans değerleri ölçülerek belirlendi (Şekil 4.2). Bu fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.2) her bir standart antioksidan ve fenolik bileşikler için  $10 \mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

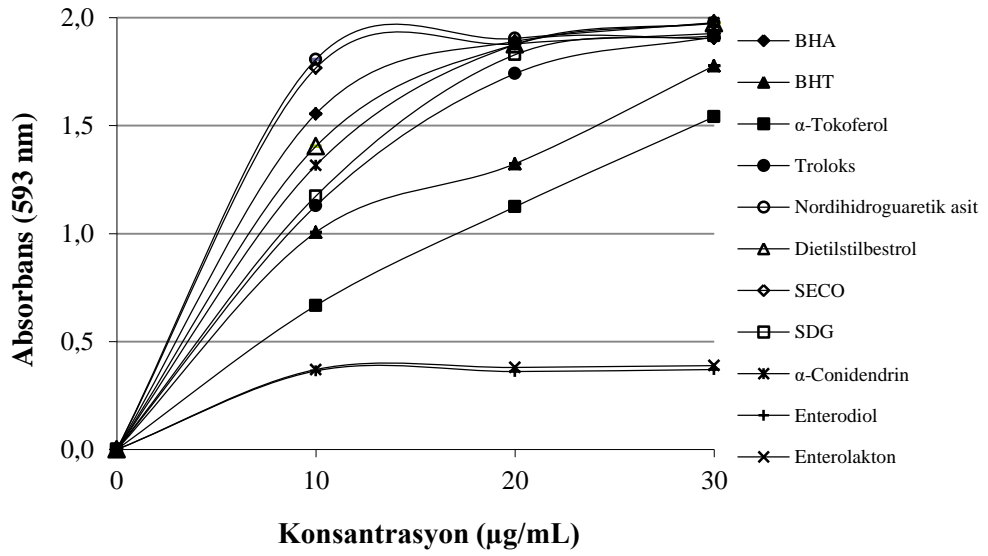


**Şekil 4.2.** Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/mL) kullanılan bazı fenolik bileşiklerin kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda kullanılan fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $\text{Cu}^+$ ) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, Nordihidroguaretik asit > BHA > Secoisolariciresinol > Dietilstilbestrol > BHT >  $\alpha$ -Conidendrin > Secoisolariciresinoldiglicoside > Troloks >  $\alpha$ -Tokoferol > Enterodiol > Enterolakton şeklinde sıralandığı belirlendi.

#### 4.1.1.c. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu, kullanılan fenolik maddelerin elektron vererek antioksidan aktivite göstermesi esasına dayanan bir metottür. Bu metotta ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenir. Ortamda oluşan ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile koyu mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu renkli kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Kullandığımız fenolik bileşiklerin FRAP metoduna göre ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile orantılı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil4.3.).



**Şekil 4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) bazı fenolik bileşiklerin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Çalışmamızda kullandığımız fenolik bileşiklerin indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla mukayesesi yapıldı. Nordihidroguaretik asit > Secoisolariciresinol > BHA > Dietilstilbestrol > α-Conidendrin > Secoisolariciresinoldiglicoside > Troloks > BHT > α-Tokoferol > Enterolakton > Enterodiol şeklinde bir sıralama gözlemlendi. Çizelge 4.1’de ise 10 µg/mL ‘deki absorbans değerleri mukayese edildi.

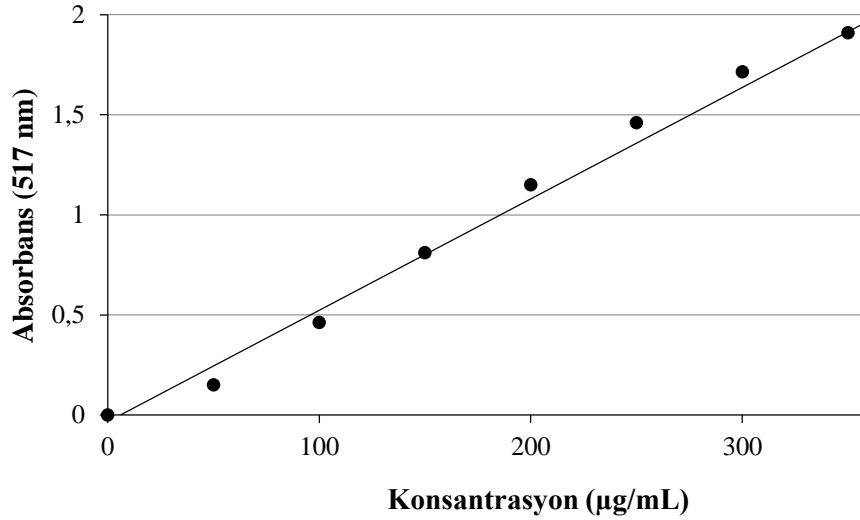
**Çizelge 4.1.** 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ve kuprik ( $Cu^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin absorbands değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	$Fe^{3+}$ İndirgeme Metodu	Kuprak Metodu	FRAP Metodu
<b>BHA</b>	1,48	1,32	1,56
<b>BHT</b>	0,99	1,00	1,01
<b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b>	0,54	0,46	0,67
<b>Troloks</b>	0,52	0,53	1,13
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	2,32	2,09	1,81
<b>Dietilstilbestrol</b>	1,33	1,04	1,40
<b>Secoisolariciresinol</b>	1,31	1,18	1,77
<b>Secoisolariciresinoldiglicoside</b>	0,93	0,59	1,17
<b><math>\alpha</math>- Conidendrin</b>	0,76	0,67	1,32
<b>Enterodiol</b>	0,16	0,06	0,36
<b>Enterolakton</b>	0,15	0,04	0,37

#### 4.1.1.ç. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi çalışmaları Blois tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonlardaki stok çözeltiler kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 0,8 mL olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH çözeltisinden 0,2 mL ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbands değerleri ölçüldü. Kontrol olarak, 0,8 mL etanol ve 0,2 mL DPPH çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbands geriye kalan DPPH

çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verir. DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ( $r^2$ : 0,9889) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH<sup>•</sup> radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

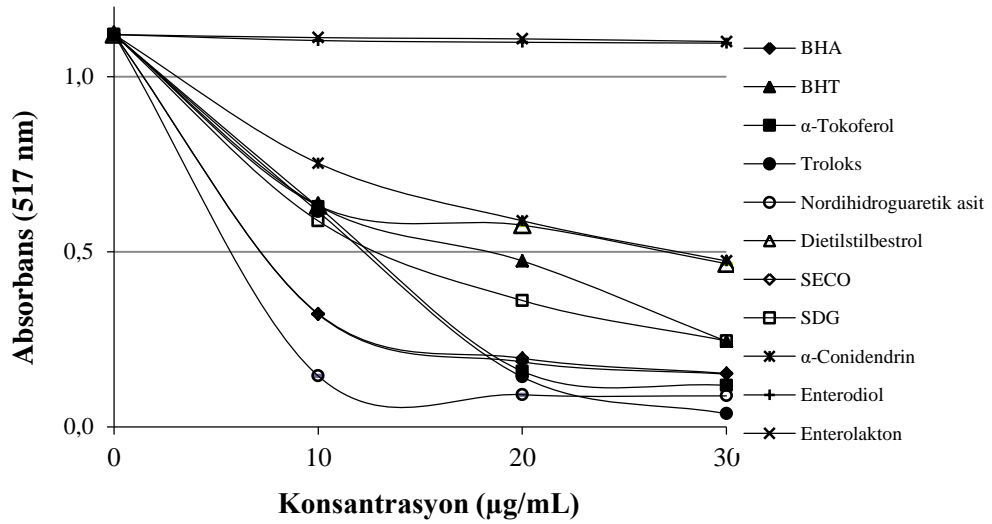
$$\text{Absorbans } (\lambda_{517\text{nm}}) = 0,0056 \times [\text{DPPH}^{\bullet}] - 0,0325$$

DPPH<sup>•</sup> radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada  $\lambda_{517\text{-N}}$  DPPH<sup>•</sup> radikal çözeltisine numune eklendikten ve inkübe edildikten sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{517\text{-K}}$  ise sadece DPPH<sup>•</sup> radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks kullanıldı.

Kullanılan fenolik bileşiklerine ait çözeltilerin DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivitesi Şekil 4.5'te görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



**Şekil 4.5.** Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/mL) kullanılan fenolik bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, troloks ve α-tokoferol ile karşılaştırması

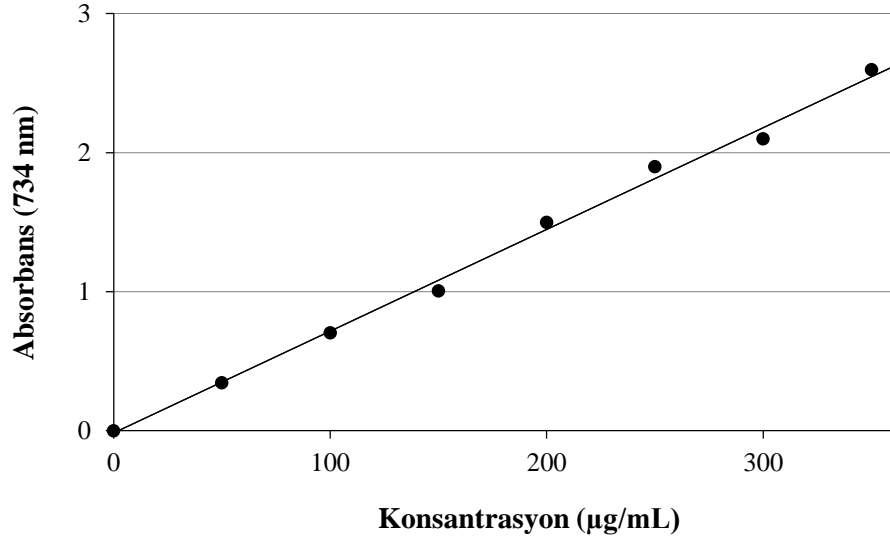
Fenolik bileşiklerin çözeltilerinin DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.5) her bir standart, her bir molekül için IC<sub>50</sub> değerleri (10 µg/mL) karşılaştırıldı (Çizelge 4.2). Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH<sup>•</sup> radikali giderme aktivitesi sergilediler: Troloks = Nordihidroguaretik asit > α-Tokoferol = BHA = Secoisolariciresinol > Secoisolariciresinoldiglicoside > BHT > Dietilstilbestrol > α-Conidendrin > Enterodiol > Enterolakton şeklindedir.

#### 4.1.1.d. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH<sup>•</sup> serbest radikal giderme aktivitesine benzer şekilde ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesi de ekstrelerin, sulu karışımların, saf maddelerin ya da içeceklerin radikal giderme aktivite tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996). Bunun için öncelikle ABTS



bileşiminden  $ABTS^{+}$  oluşumu sağlandı. Bu aşamadan sonra fenolik bileşiklere ait çözeltilerinin, BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin  $ABTS^{+}$  giderme aktivite çalışmaları yapıldı ( $r^2:0,9968$ ), (Şekil 4.6).



Şekil 4.6.  $ABTS^{+}$  giderme aktivitesi tayininde kullanılan  $ABTS^{+}$  için hazırlanan standart grafik

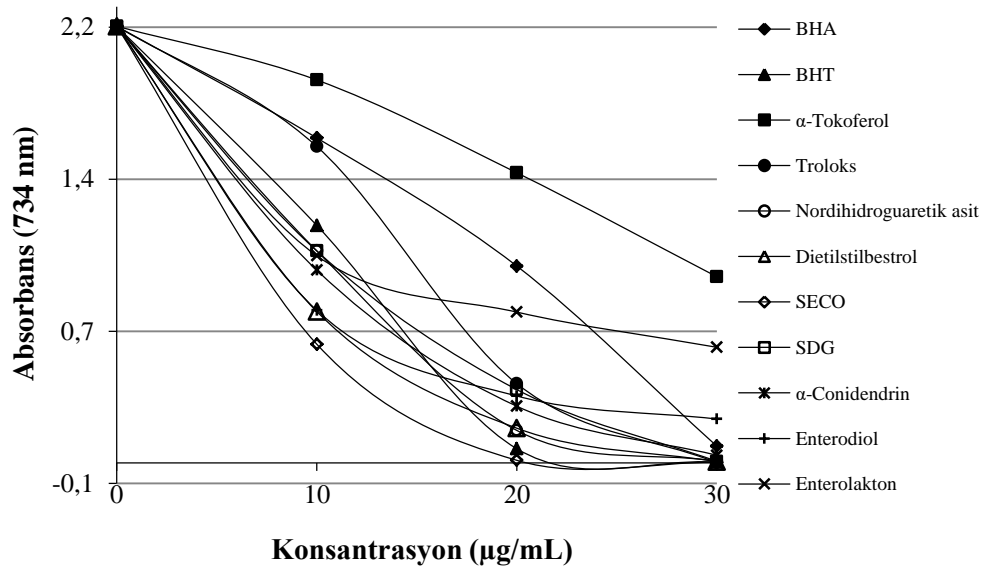
$ABTS^{+}$  radikali giderme aktivitesi tayininden sonra arta kalan  $ABTS^{+}$  radikali miktarları standart grafikten elde edilen ve aşağıda gösterilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{734\text{nm}}) = 0,0073 \times [ABTS^{+}] - 0,0163$$

$ABTS^{+}$  giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada  $\lambda_{734-N}$   $ABTS^{+}$  çözeltilisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{734-K}$  ise sadece  $ABTS^{+}$  çözeltilisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) fenolik bileşiklerin ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Kullanılan Fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ABTS<sup>+</sup> radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.7) her standart ve fenolik bileşikler için IC<sub>50</sub> değerleri (10 µg/mL) tabloda verildi (Çizelge 4.2).

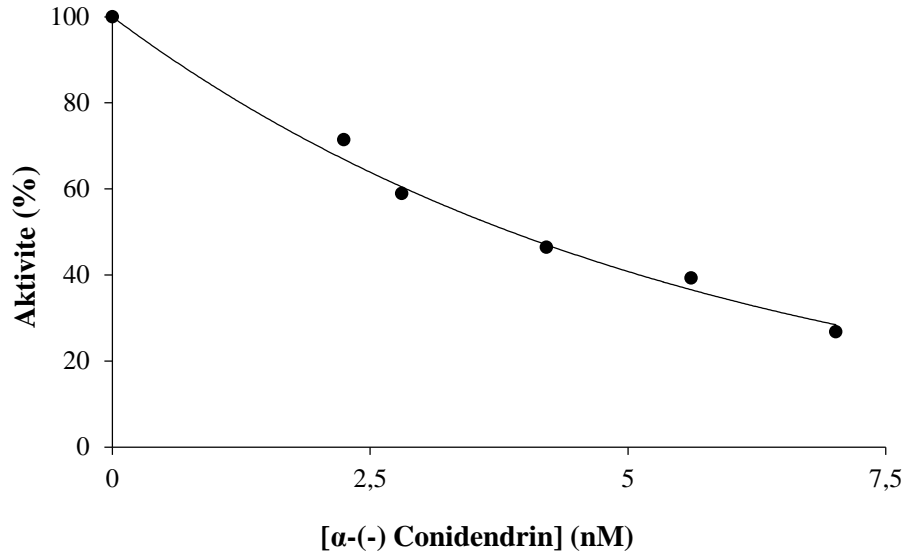
Kullanılan fenolik bileşikler ve standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi sergilediler: Secoisolariciresinol > Dietilstilbestrol = Nordihidroguaretik asit = Secoisolariciresinoldiglicoside > α-Conidendrin > BHT = Troloks > BHA > Enterodiol > Enterolakton > α-Tokoferol.

**Çizelge 4.2.** 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin DPPH<sup>·</sup> ve ABTS<sup>·+</sup> radikallerini giderme kapasitelerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

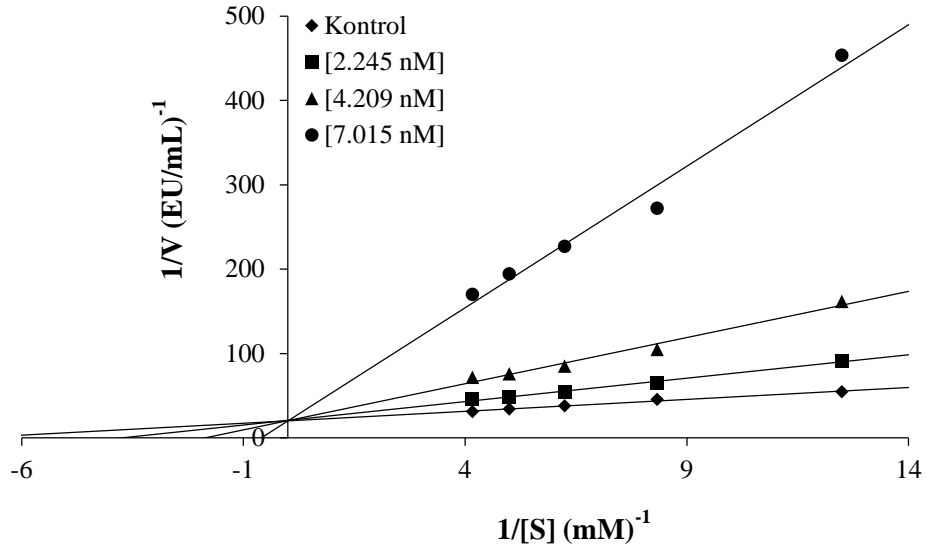
<b>Antioksidanlar</b>	<b>DPPH<sup>·</sup> Giderme</b>	<b>ABTS<sup>·+</sup> Giderme</b>
<b>BHA</b>	48,70	18,94
<b>BHT</b>	77,52	16,91
<b>α-Tokoferol</b>	47,48	125,79
<b>Troloks</b>	35,50	17,47
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	36,18	9,83
<b>Dietilstilbestrol</b>	118,71	9,30
<b>Secoisolariciresinol</b>	49,33	7,18
<b>Secoisolariciresinoldiglicoside</b>	71,67	10,48
<b>α- Conidendrin</b>	126,62	12,99
<b>Enterodiol</b>	4220,77	37,89
<b>Enterolakton</b>	6331,16	64,18

#### **4.1.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine fenolik bileşiklerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları**

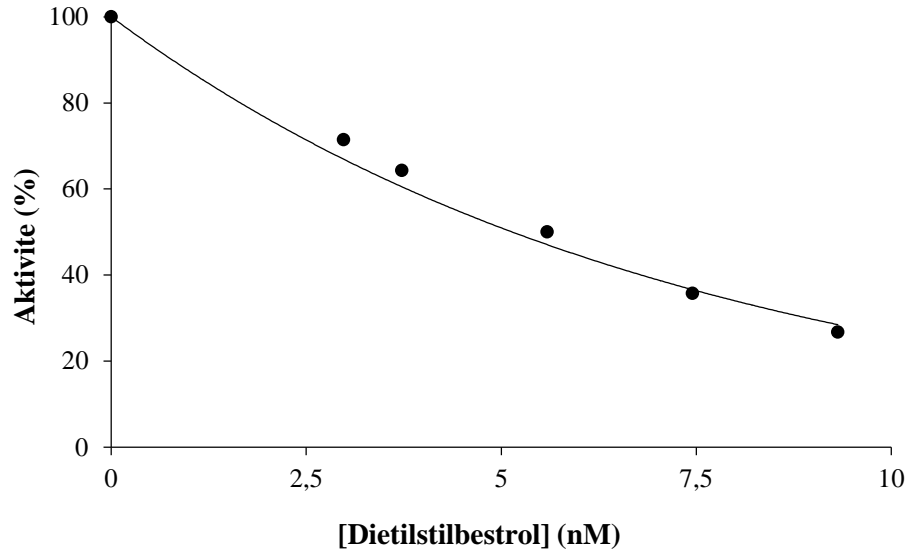
Doygun substrat konsantrasyonlarında Asetilkolinesteraz enzimi için fenolik bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Ölçümler Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen Asetilkolinesteraz yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her molekül için Aktivite (%)-[I] ve K<sub>i</sub> grafiği çizildi. Çizilen grafiklerden her molekül için K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı.



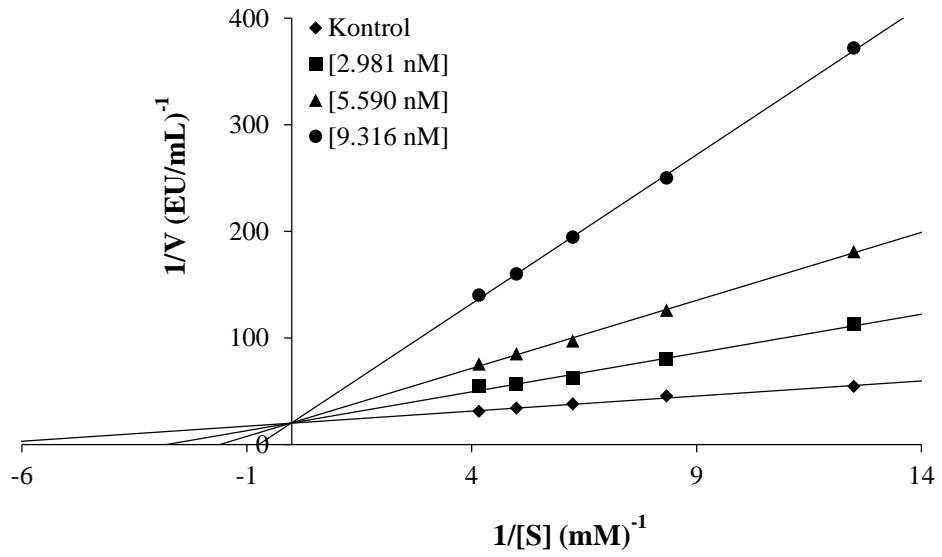
**Şekil 4.8.** Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı  $\alpha(-)$  Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [ $\alpha(-)$  Conidendrin] grafiği



**Şekil 4.9.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı  $\alpha(-)$  Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

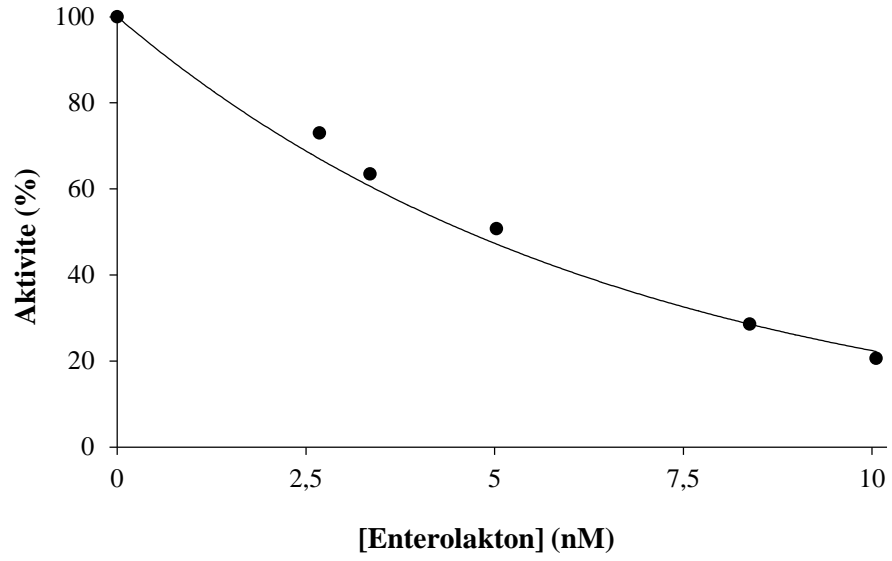


**Şekil 4.10.** Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Dietilstilbestrol] grafiği

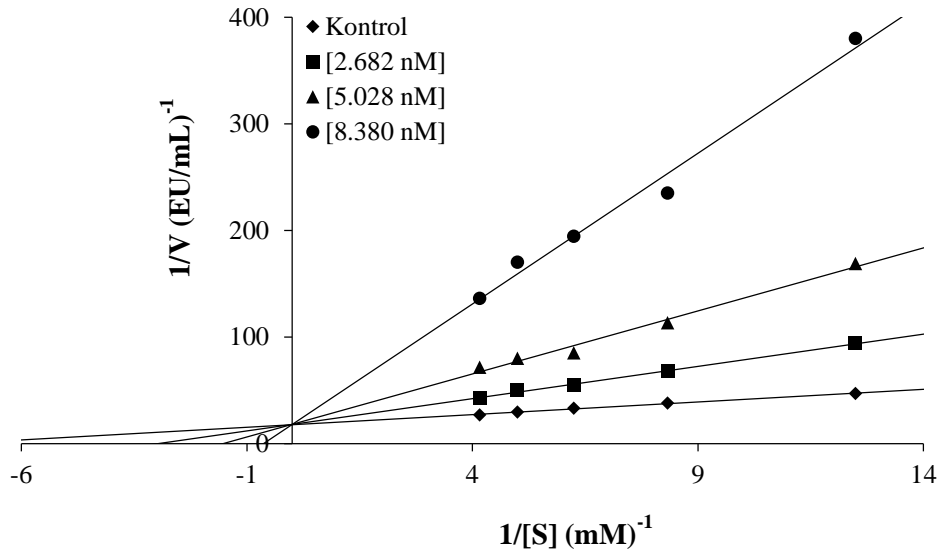


**Şekil 4.11.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

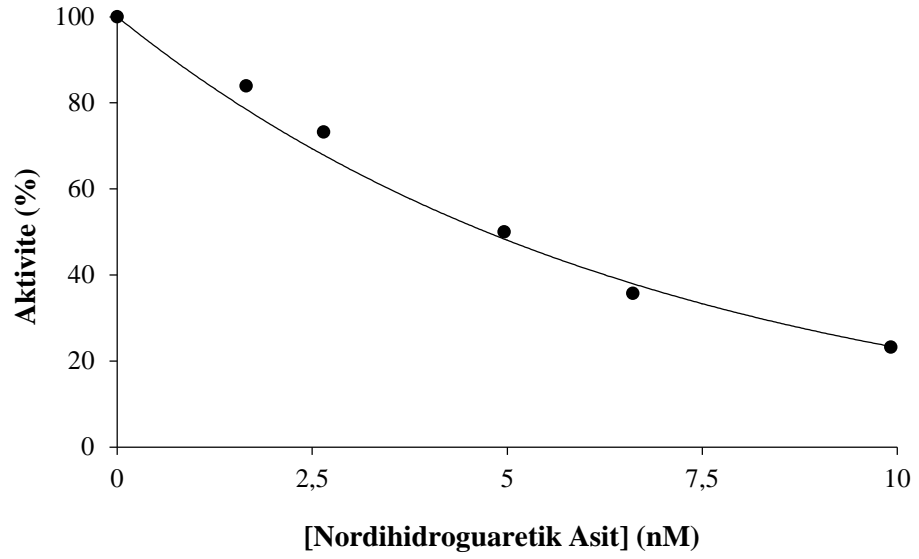




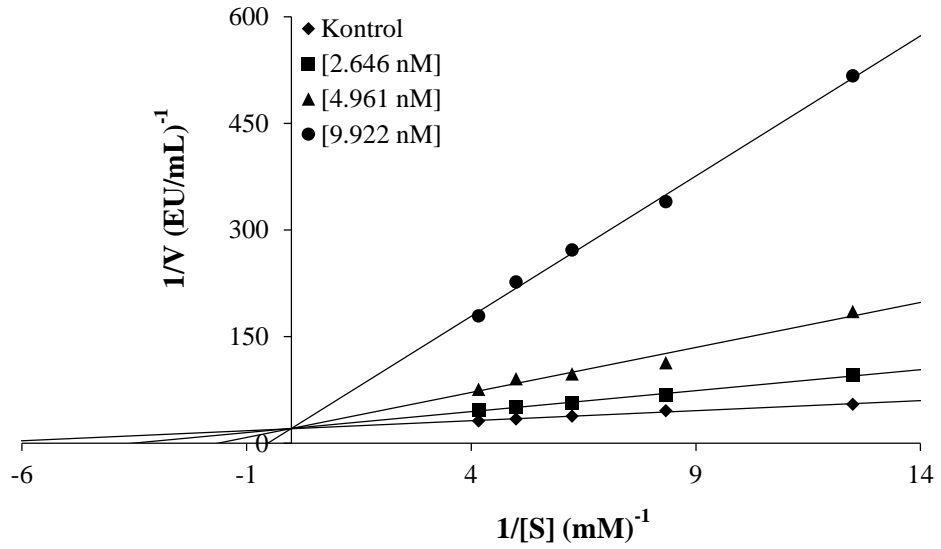
Şekil 4.14. Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği



Şekil 4.15. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

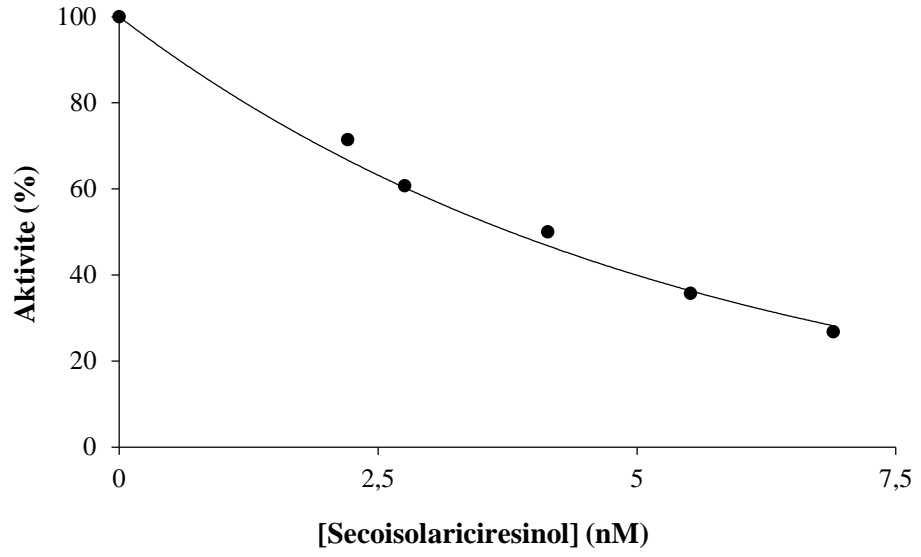


**Şekil 4.16.** Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği

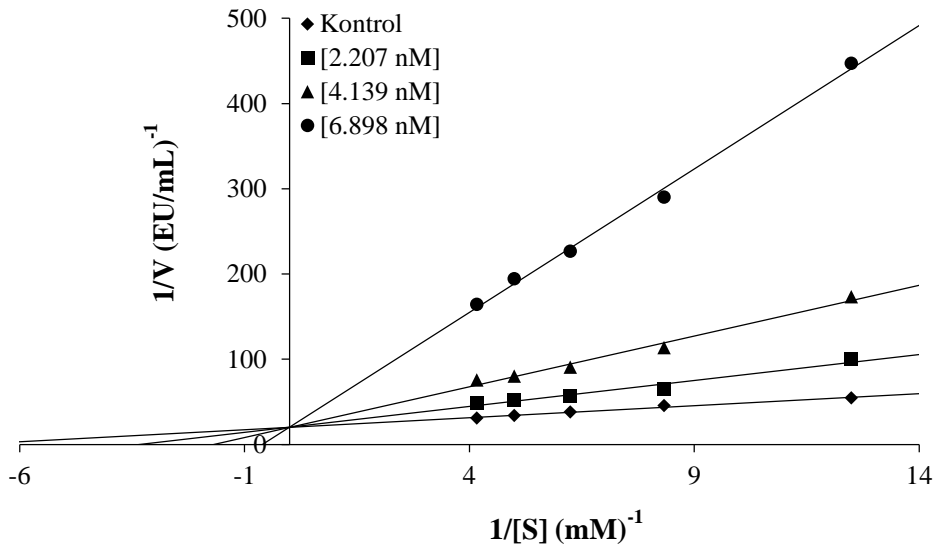


**Şekil 4.17.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

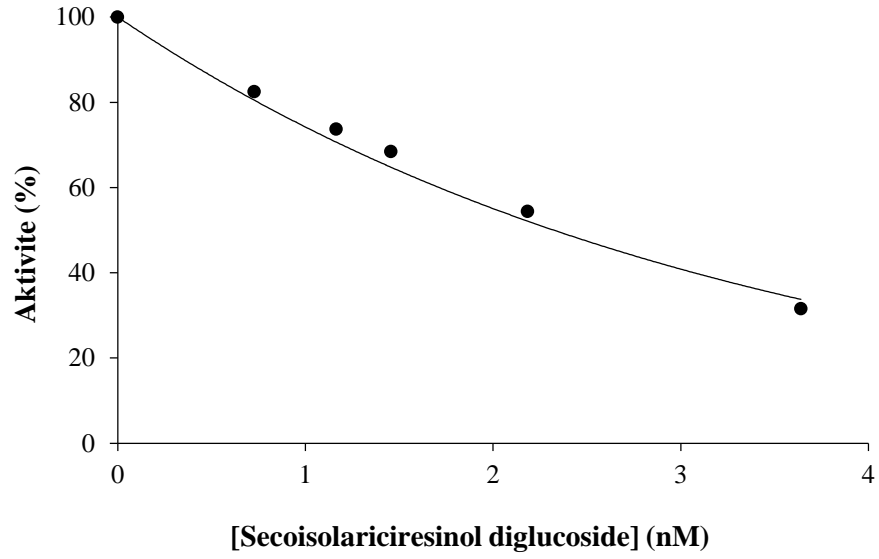




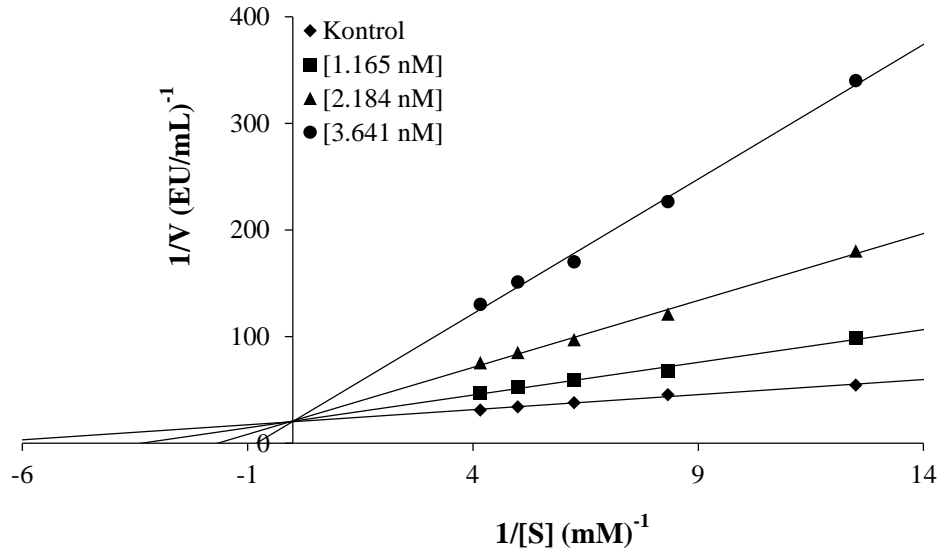
**Şekil 4.18.** Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği



**Şekil 4.19.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.20.** Asetilkolinesteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği



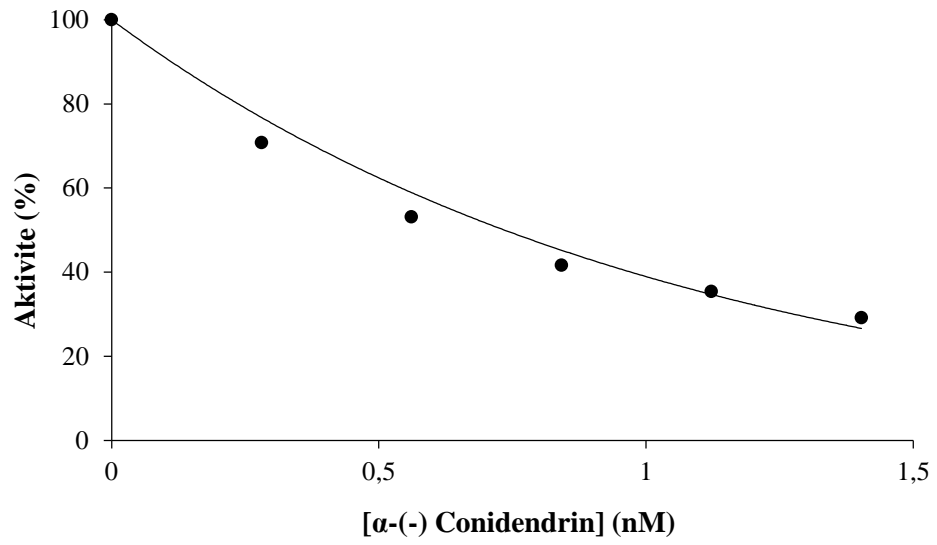
**Şekil 4.21.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.3.** Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

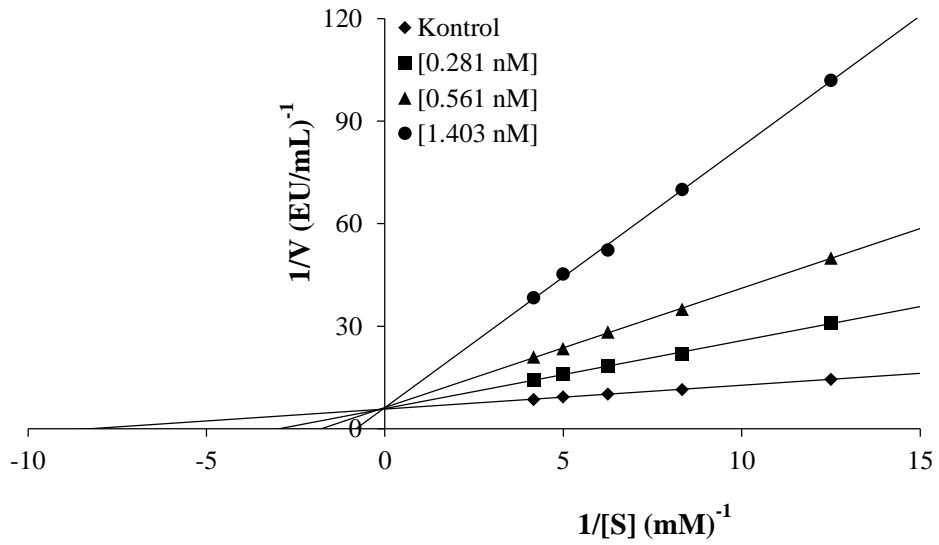
İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	8,75	1,54	Yarışmalı	0,9871
<b>Dietilstilbestrol</b>	19,91	1,55	Yarışmalı	0,9862
<b>Enterodiol</b>	9,08	1,41	Yarışmalı	0,9808
<b>Enterolakton</b>	14,02	1,29	Yarışmalı	0,9883
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	14,93	1,62	Yarışmalı	0,9903
<b>Secoisolariciresinol</b>	8,30	1,30	Yarışmalı	0,9893
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	7,04	0,72	Yarışmalı	0,9857

#### 4.1.3. Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine fenolik bileşiklerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

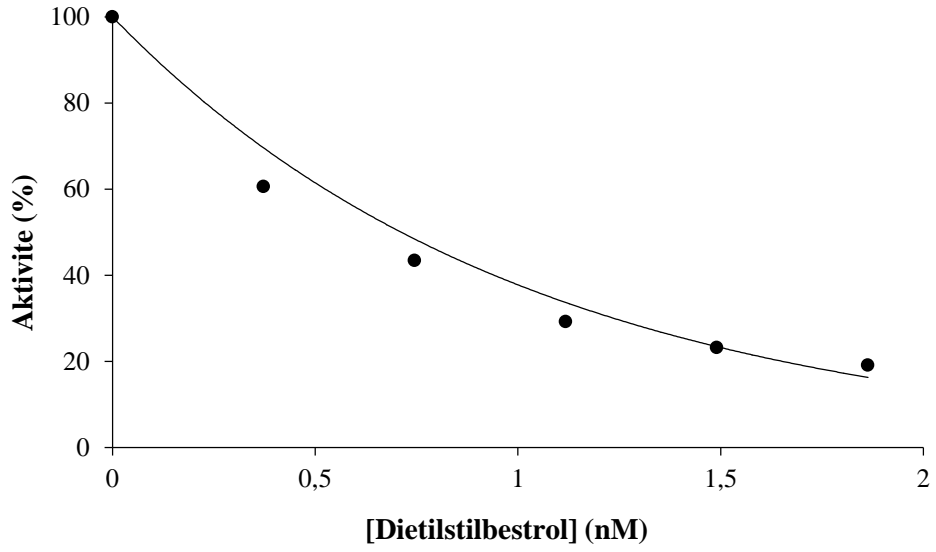
Doygun substrat konsantrasyonlarında Bütirikolinesteraz enzimi için fenolik yapıdaki bileşiklerin inhibisyon etkileri incelendi. Ölçümler Ellman ve arkadaşları (1961) tarafından geliştirilen metot ile yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her molekül için Aktivite (%)-[I] ve K<sub>i</sub> grafiği çizildi. Çizilen grafiklerden her molekül için K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı.



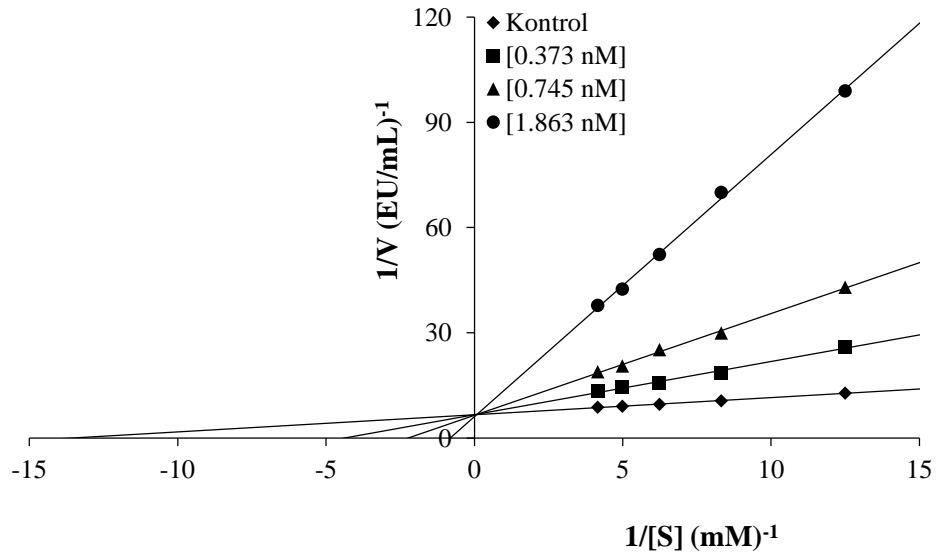
**Şekil 4.22.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı  $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha$ -(-) Conidendrin] grafiği



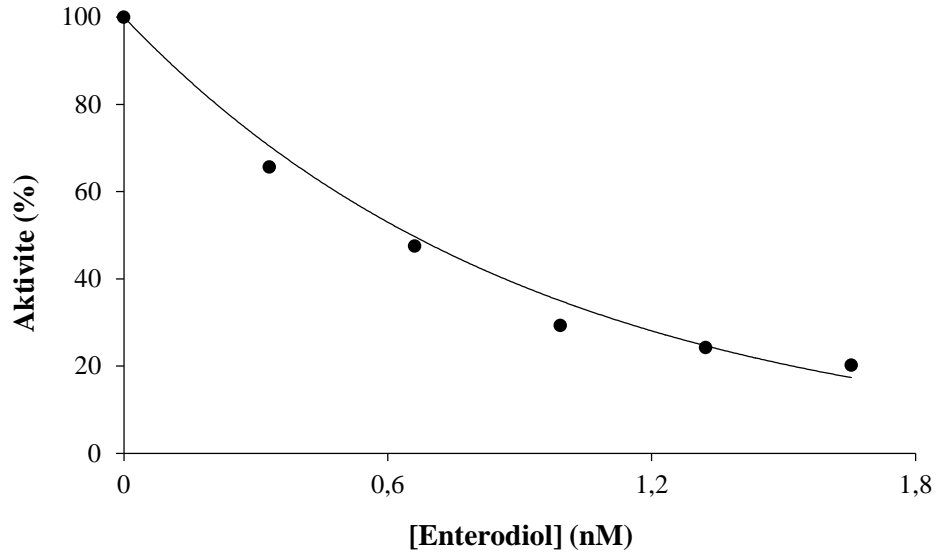
**Şekil 4.23.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı  $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



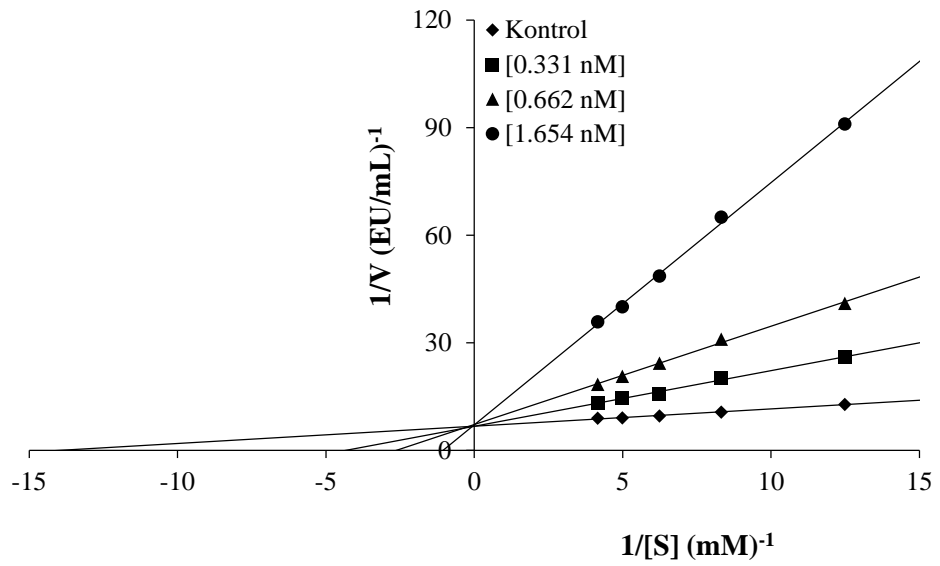
**Şekil 4.24.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Dietilstilbestrol] grafiği



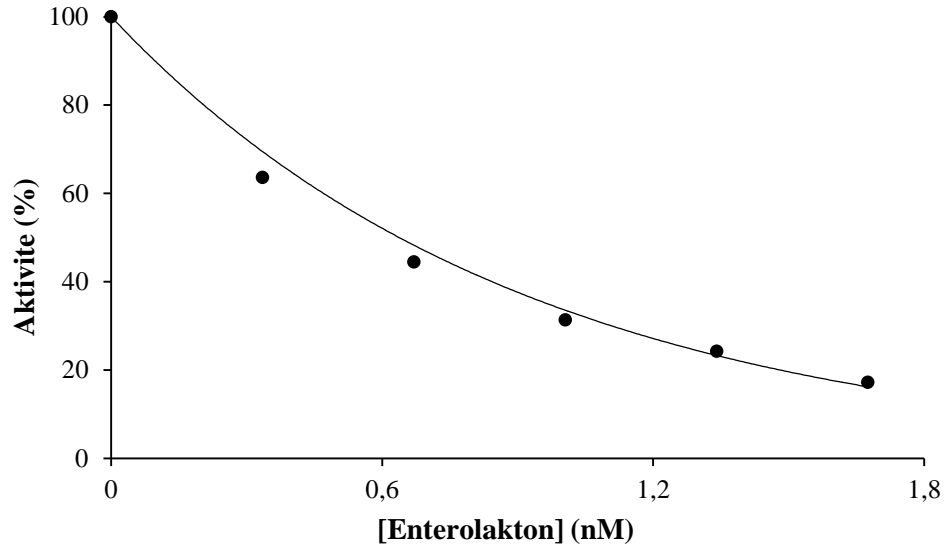
**Şekil 4.25.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



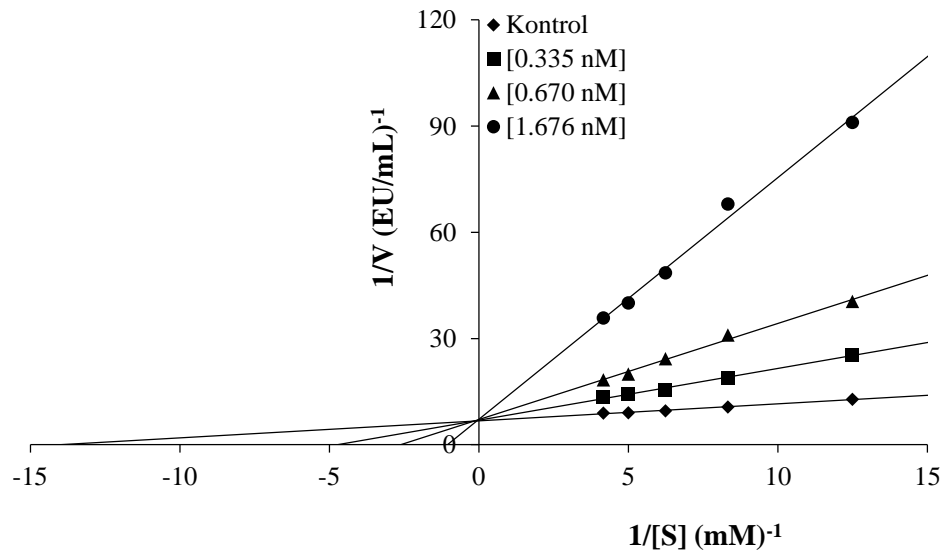
**Şekil 4.26.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği



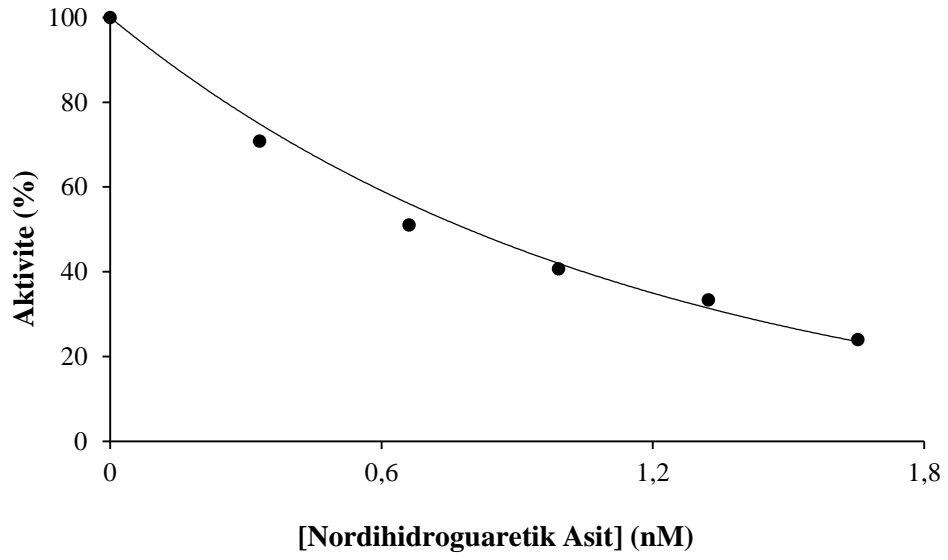
**Şekil 4.27.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



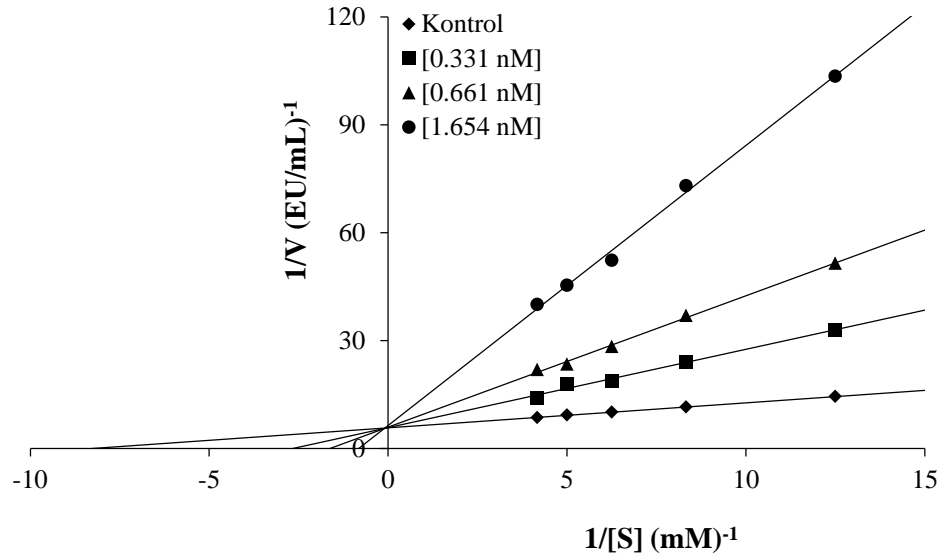
**Şekil 4.28.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği



**Şekil 4.29.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

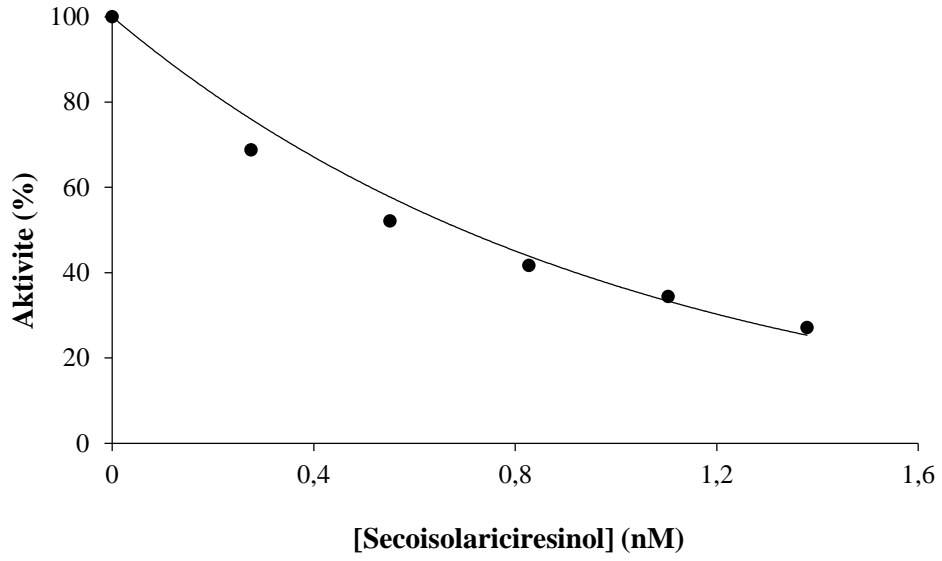


**Şekil 4.30.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği

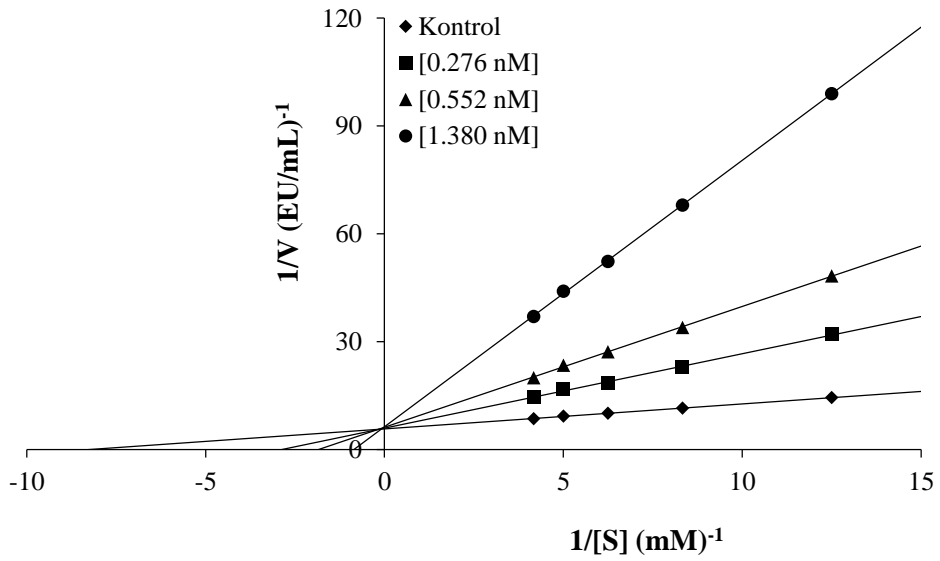


**Şekil 4.31.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

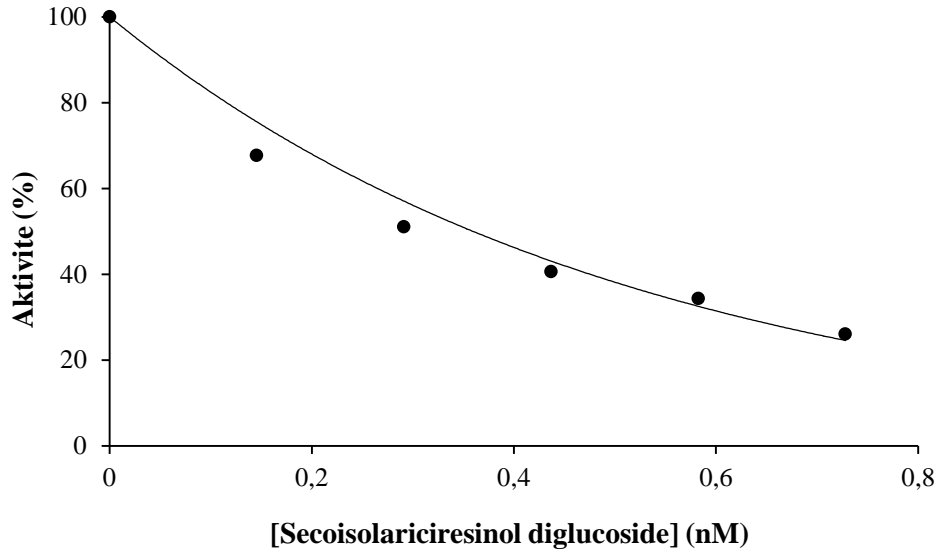




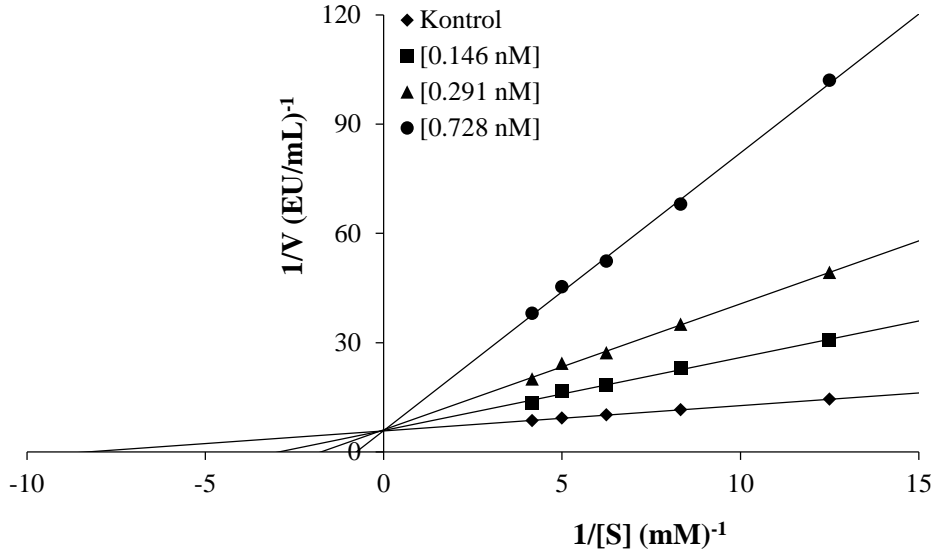
**Şekil 4.32.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği



**Şekil 4.33.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.34.** Bütirikolinesteraz enziminin Ellman metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği



**Şekil 4.35.** Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

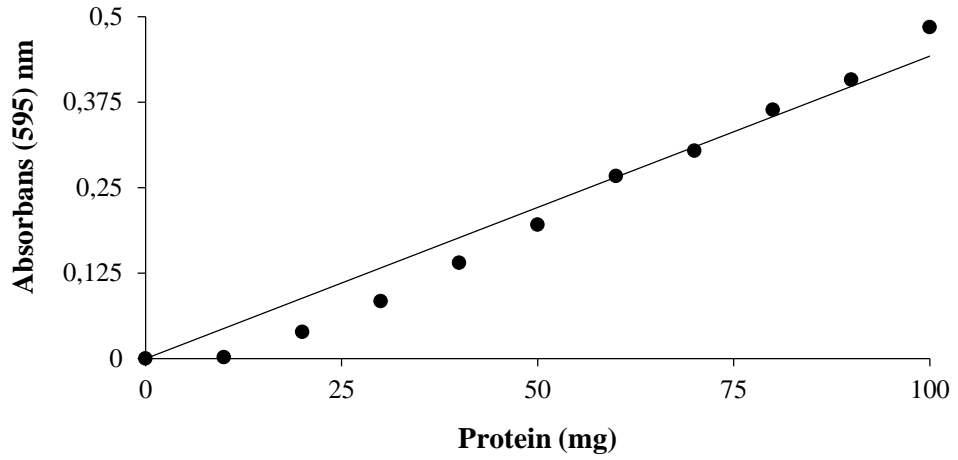
**Çizelge 4.4.** Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklere ait IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama(nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	0,74	0,15	Yarışmalı	0,9690
<b>Dietilstilbestrol</b>	0,71	0,15	Yarışmalı	0,9604
<b>Enterodiol</b>	0,66	0,14	Yarışmalı	0,9680
<b>Enterolakton</b>	0,64	0,16	Yarışmalı	0,9884
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	0,78	0,17	Yarışmalı	0,9875
<b>Secoisolariciresinol</b>	0,70	0,20	Yarışmalı	0,9746
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	0,36	0,08	Yarışmalı	0,9709

#### 4.1.4. Karbonik anhidraz enzimi ile ilgili yapılan çalışma bulguları

##### 4.1.4.a. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

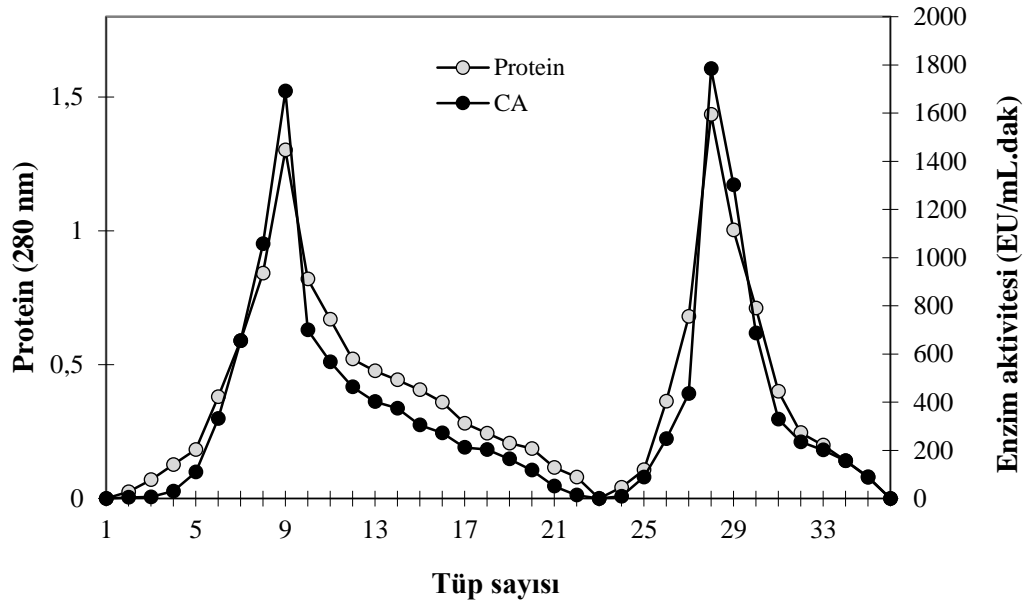
Kantitatif protein tayini işlemlerinde Bradford (1976) tarafından geliştirilen Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı. İlk olarak bu yöntem için sığır serum albümin'inden bir standart eğri hazırlandı. Ardından insan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltilisindeki protein miktarları bu standart eğriden yararlanılarak hesaplandı. Kantitatif olarak bulunan protein miktarları Şekil 4.36'daki grafikten elde edilen denklemden hesaplandı (r<sup>2</sup>: 0,9630).



**Şekil 4.36.** Sığır serum albümini ve Bradford yöntemi kullanılarak kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

#### 4.1.4.b. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma işlemi sonuçları

Taze insan kanından elde edilen eritrositlerden, hCA I ve II izoenzimlerinin saflaştırılma işlemi gerçekleştirildi. Toz Tris kullanılarak pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat dengelenmiş afinite kolonuna yüklendi. pH 8,7 olan 25 mM'lık Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra, kolondan pH:6,3 olan 1 M'lık NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu geçirilerek hCA I enzimi elüe edildi. Akabinde 40 mL dengeleme tamponu kolondan geçirilerek pH:5,6 olan 0,1 M'lık NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> tampon çözeltisi yardımıyla hCA II enzimini elüe edilmesi sağlandı. Fraksiyon toplama tüpleri ile elüatlar 5'er mL halinde toplandı ve 280 nm'de absorbansları ölçülerek absorbans gösteren tüplerdeki elüatlar için CO<sub>2</sub> ile hidrataz aktivitesi uygulandı. Çok kez yapılan saflaştırma işlemlerinden birinin sonuçları Şekil 4.37'de gösterildi.



Şekil 4.37. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,3 ve 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> pH 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği

#### 4.1.4.c. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları

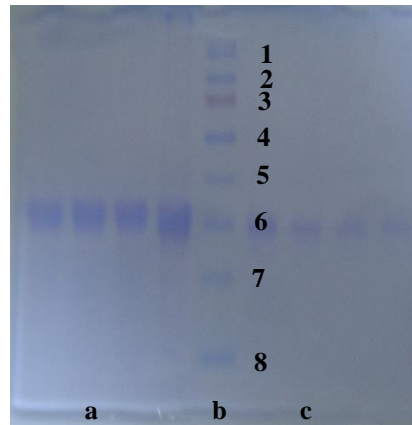
Taze insan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er mL numune alındı. Hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanılarak kantitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen değerlere göre hemolizatın, Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu ile kaç kat saflaştırıldığı hesaplanarak sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterildi.

**Çizelge 4.5.** Afinite kromatografi tekniğinden faydalanılarak, insan kanından elde edilen enzim hemolizatından enzim ünitesi, spesifik aktivite ve ayrıca hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı sonuçları

Numune Türü		Aktivite (EU/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		1229,21	25	46,75	1168,75	30730,25	26,29	100	1
Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	hCA I	1691,50	9	0,37	3,33	15223,50	4571,62	49,54	173,90
	hCA II	2800	5,5	0,18	0,99	15400	15555,56	50,11	591,69

#### 4.1.4.ç. SDS-PAGE sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin saflığı SDS-PAGE tekniği uygulanarak kontrol edildi. Kıyaslama amacıyla molekül ağırlığı bilinen standart protein markırları kullanıldı. SDS-PAGE jel kuyularına insan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri tatbik edilerek yürütme işlemi gerçekleştirildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.38).



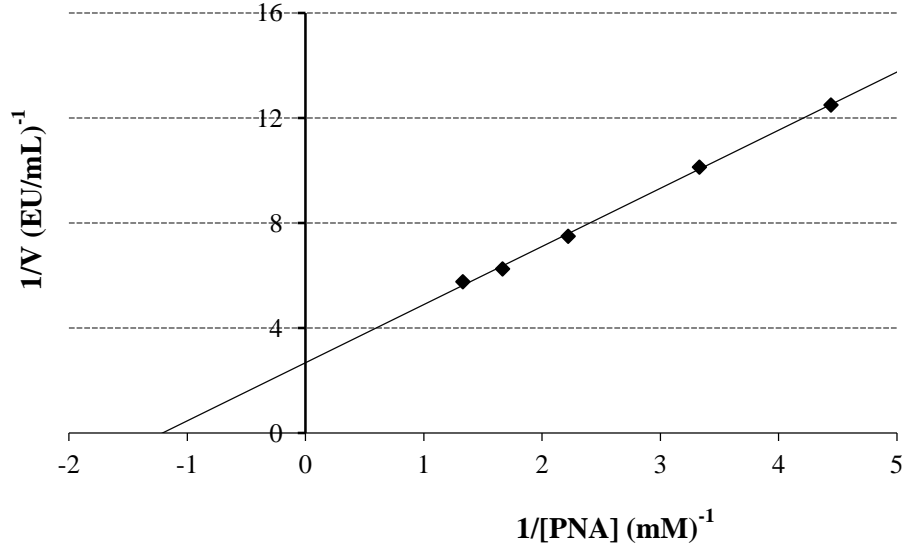
**Şekil 4.38.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

\* a: hCA I, b: Standart proteinler (1: 130 kDa 2: 100 kDa, 3: 70 kDa 4: 55 kDa 5: 40 kDa 6: 35 kDa 7: 25 kDa 8: 15 kDa), c: hCA II

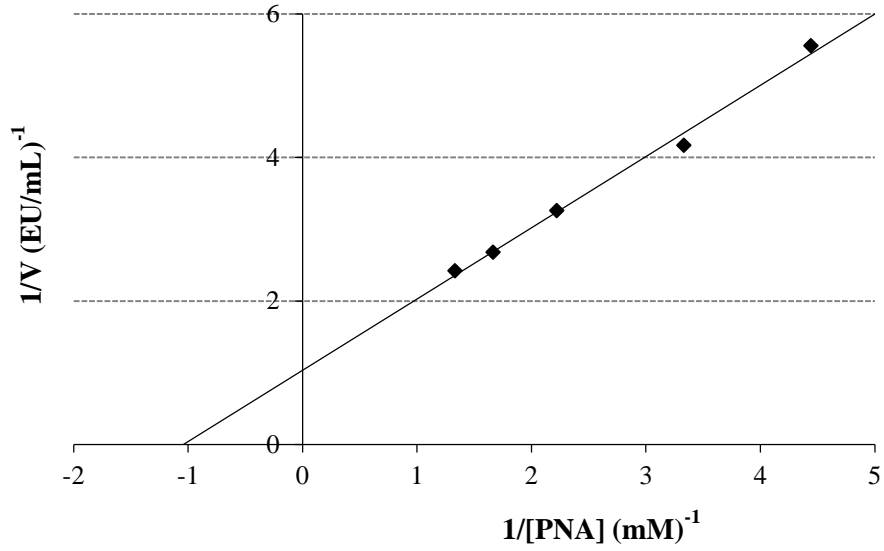
#### 4.1.4.d. hCA I ve II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmalara ait sonuçlar

#### 4.1.4.e. hCA I ve II izoenzimleri için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmaların sonuçları

İnsan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için en az beş farklı substrat konsantrasyonundan faydalanarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ve bu grafiklerden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.39 ve 4.40).



**Şekil 4.39.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

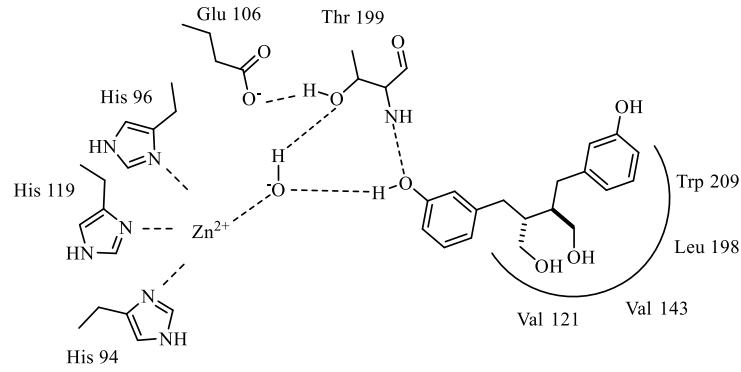


**Şekil 4.40.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

İnsan kanından saflaştırılarak elde edilen hCA I ve II izoenzimlerine ait  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. hCA I enzimine ait  $K_m$  0,827 mM ve  $V_{max}$  0,373 EU/mL.dak olarak hesaplandı. hCA II enzimine ait  $K_m$  0,956 mM ve  $V_{max}$  0,964 EU/mL.dak olarak hesaplandı.

hCA izoenzimlerinin aktif bölgesinde yer alan  $Zn^{2+}$  metal iyonuna kullandığımız inhibitörlerin hidroksil gruplarının iyonik olarak etkileşmesi sonucu inhibisyon gösterdiği sanılmaktadır. Bu inhibitörlerden enterodiol'ün bağlanma modelinin Şekil 4.41'de gösterildiği gibi olduğu düşünülmektedir.



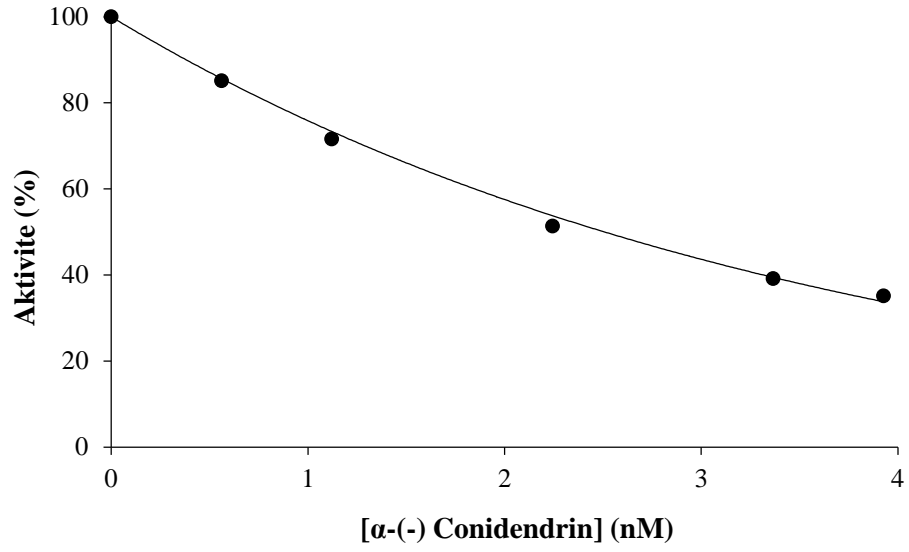


**Şekil 4.41.** hCA izoenzimlerine Enterodiol'ün muhtemel bağlanma modeli

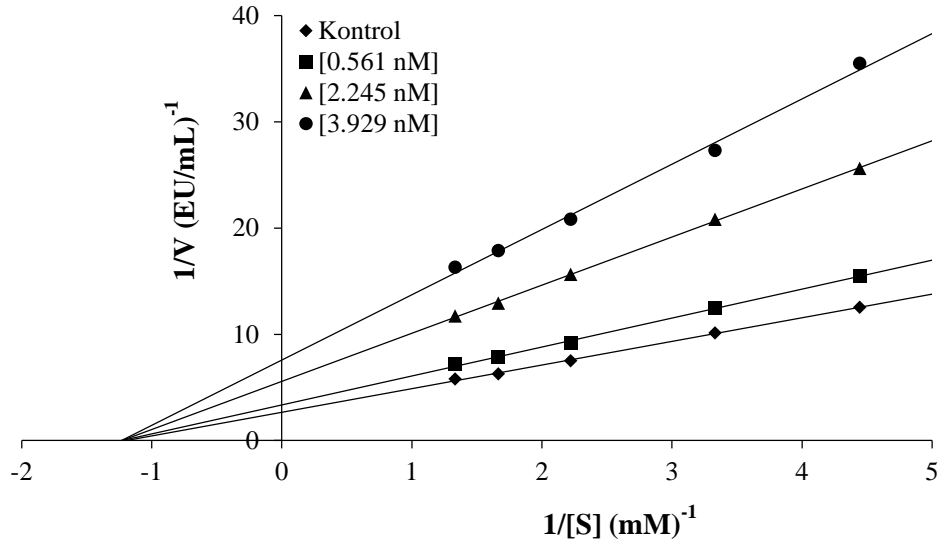
#### 4.1.4.f. hCA I ve II izoenzimleri esteraz aktiviteleri üzerine fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan kinetik çalışma sonuçları

#### 4.1.4.g. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler ile ilgili sonuçlar

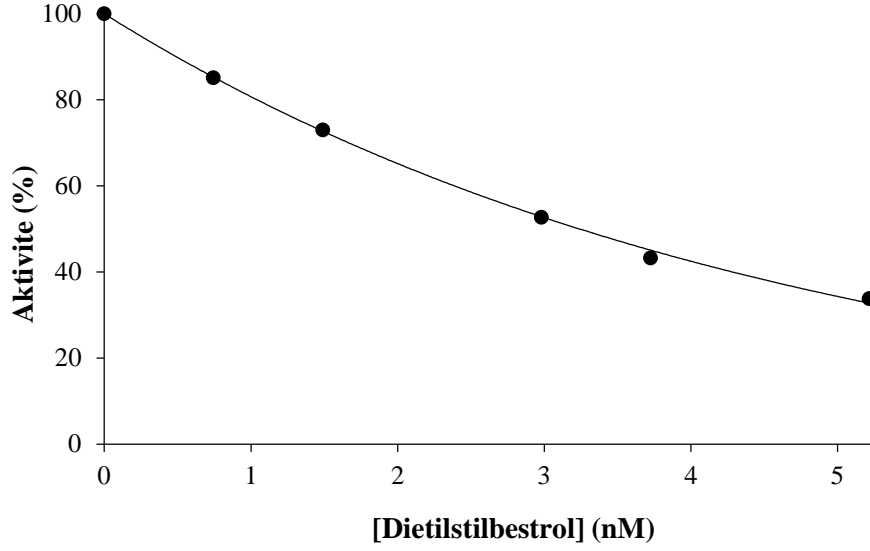
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi için fenolik yapıdaki bileşiklerin, hCA I enzimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Esteraz aktivite tayin yöntemi kullanılarak ölçümler yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite (%) - [I] ve  $K_i$  grafikleri çizildi. Elde edilen verilere göre çizilen grafiklerden her bir molekül için  $K_i$  değerleri hesaplandı.



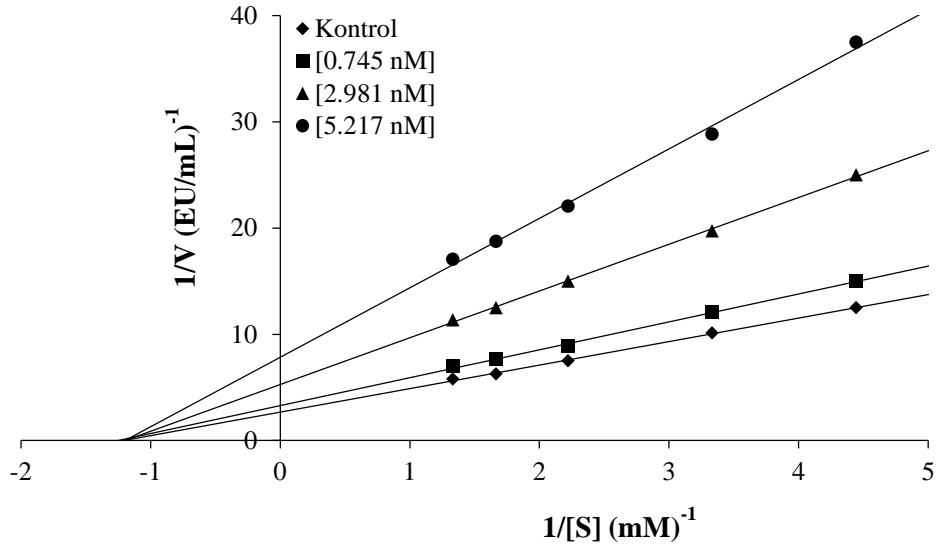
**Şekil 4.42.** hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı  $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha$ -(-) Conidendrin] grafiği



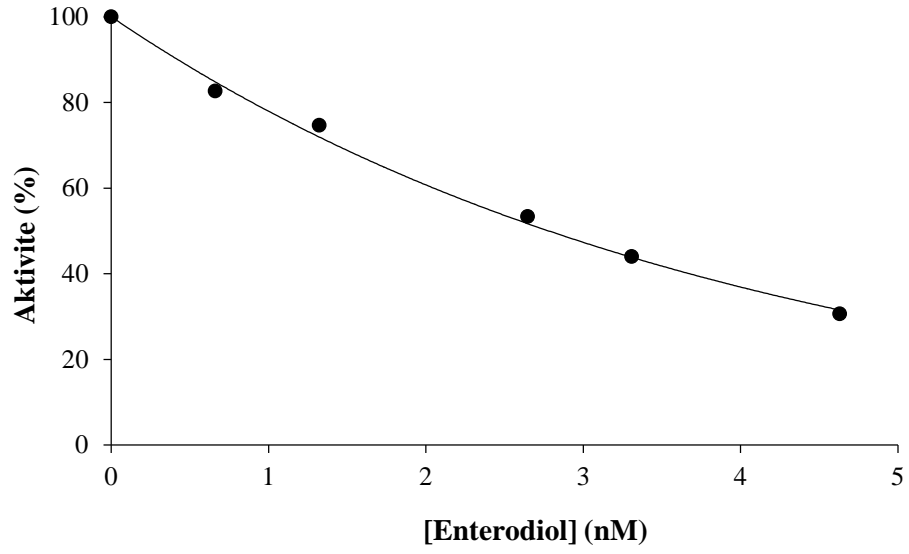
**Şekil 4.43.** hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı  $\alpha$ -(-) Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



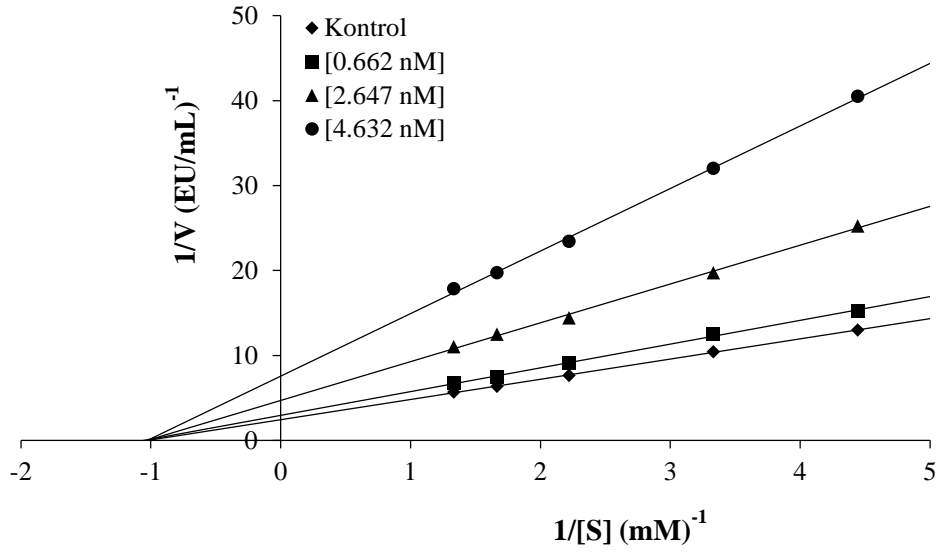
Şekil 4.44. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Dietilstilbestrol] grafiği



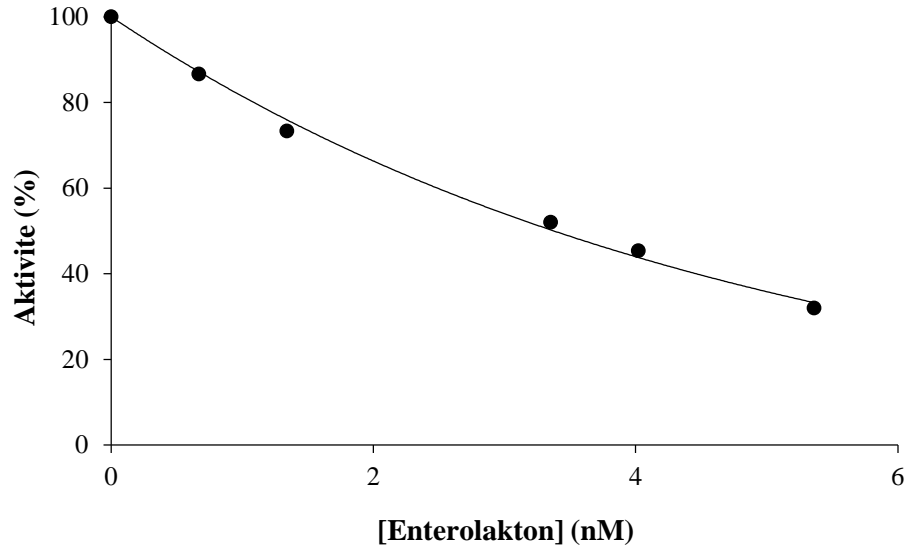
Şekil 4.45. hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



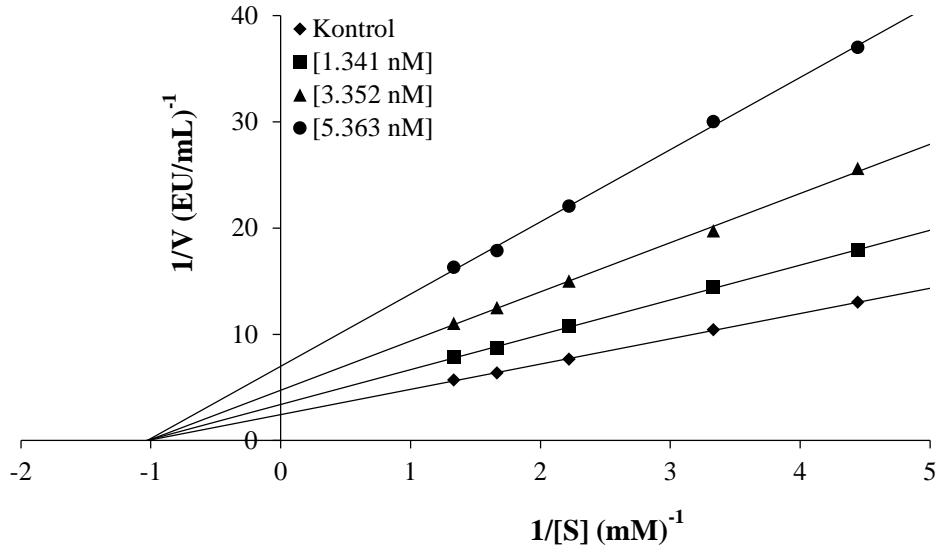
Şekil 4.46. hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği



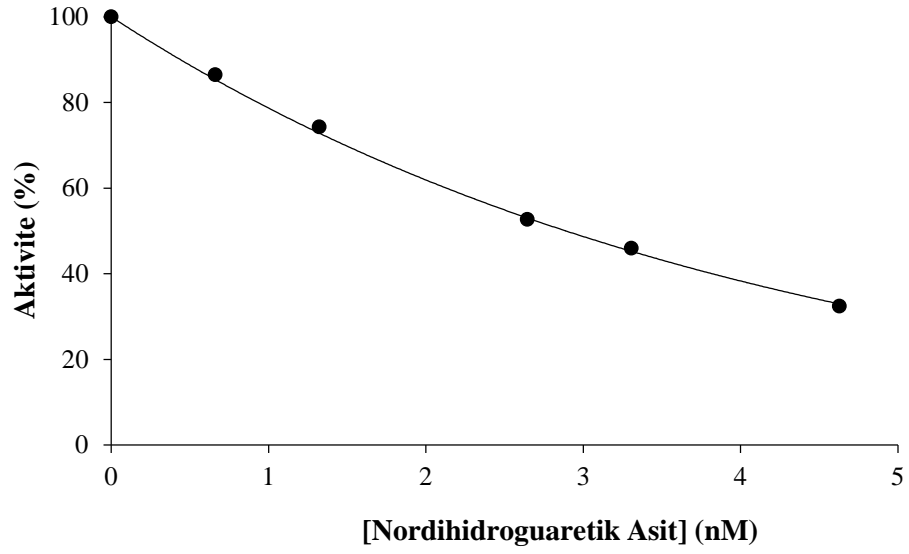
Şekil 4.47. hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



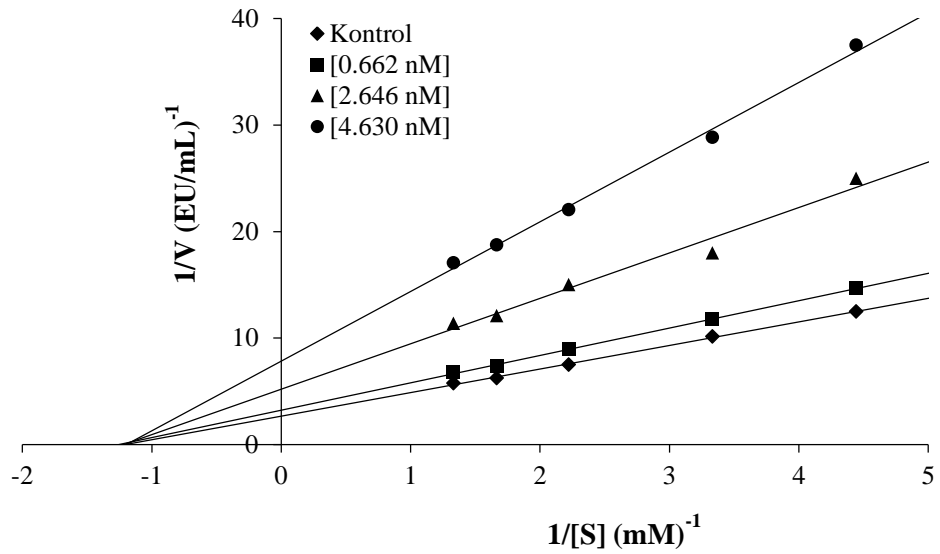
**Şekil 4.48.** hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği



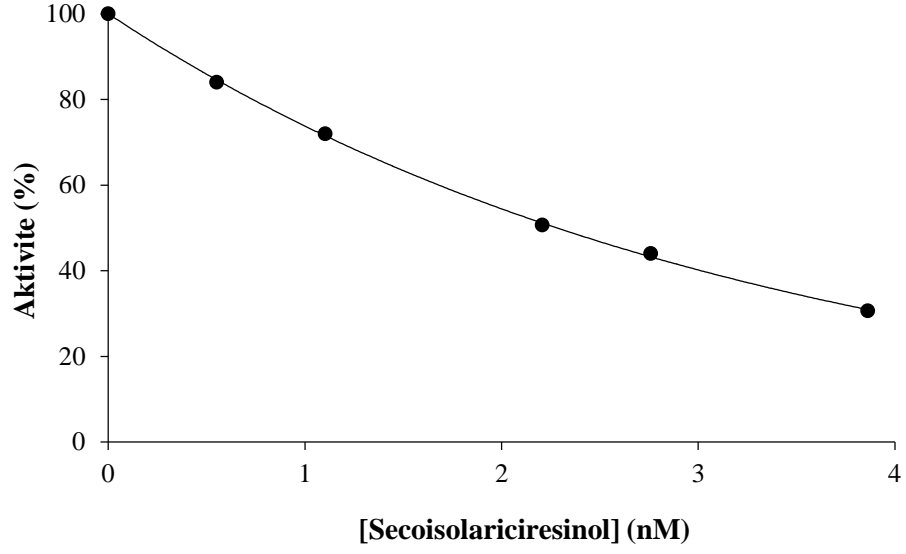
**Şekil 4.49.** hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



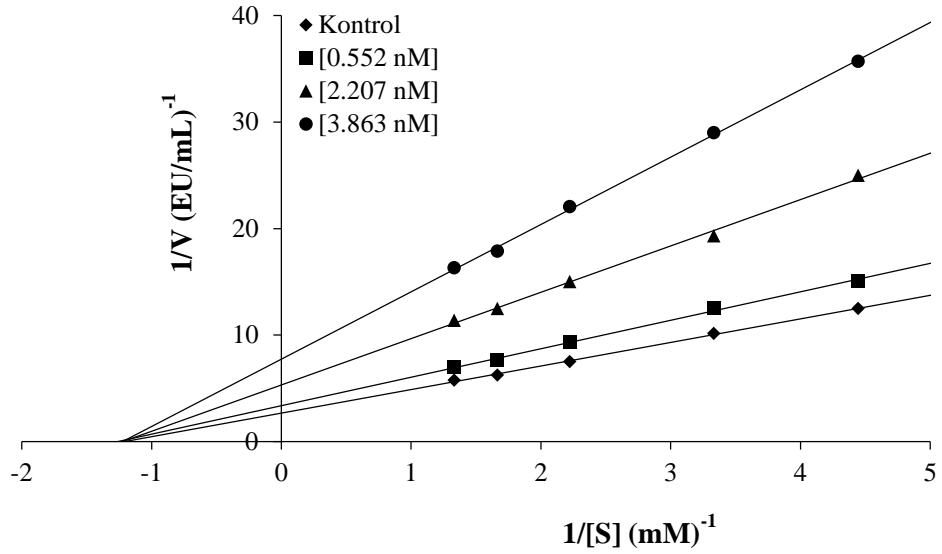
**Şekil 4.50.** hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Nordihidroguaretik Asit] grafiği



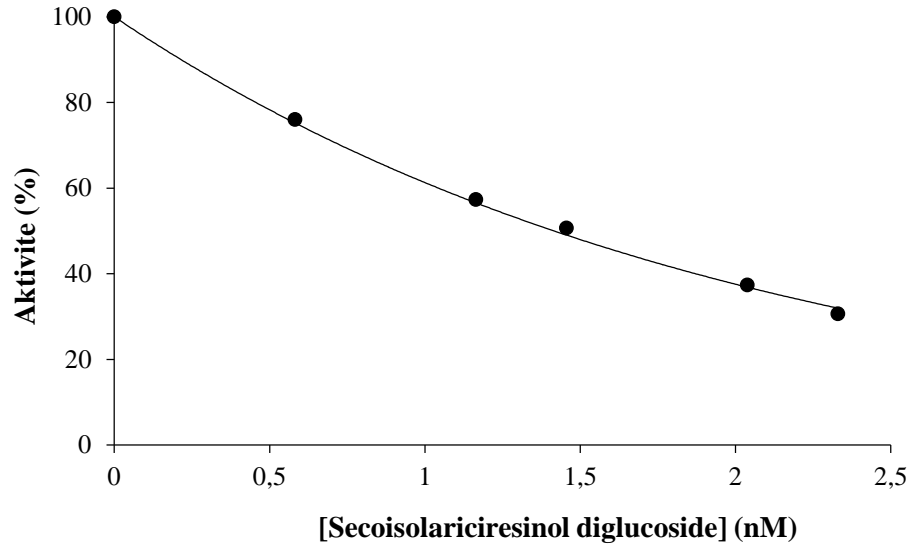
**Şekil 4.51.** hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



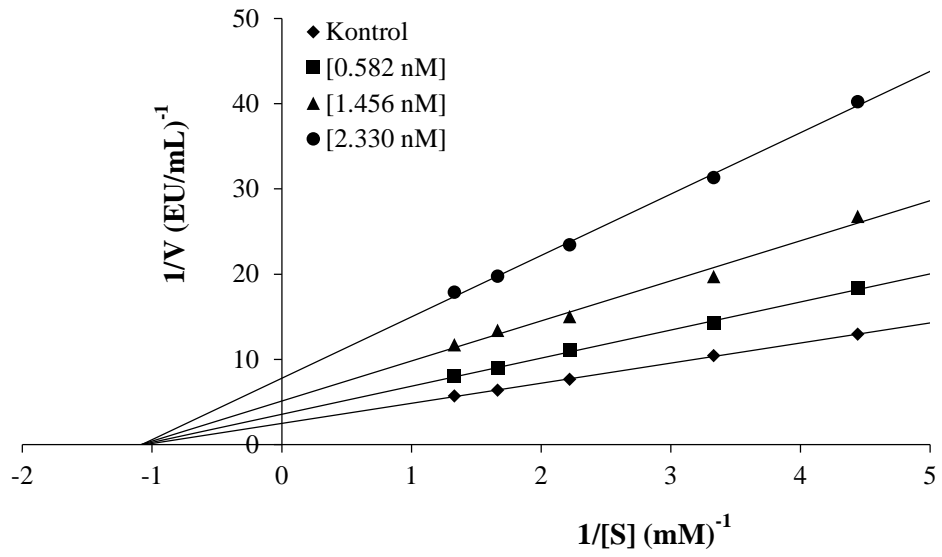
Şekil 4.52. hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği



Şekil 4.53. hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.54. hCA I enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği



Şekil 4.55. hCA I enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

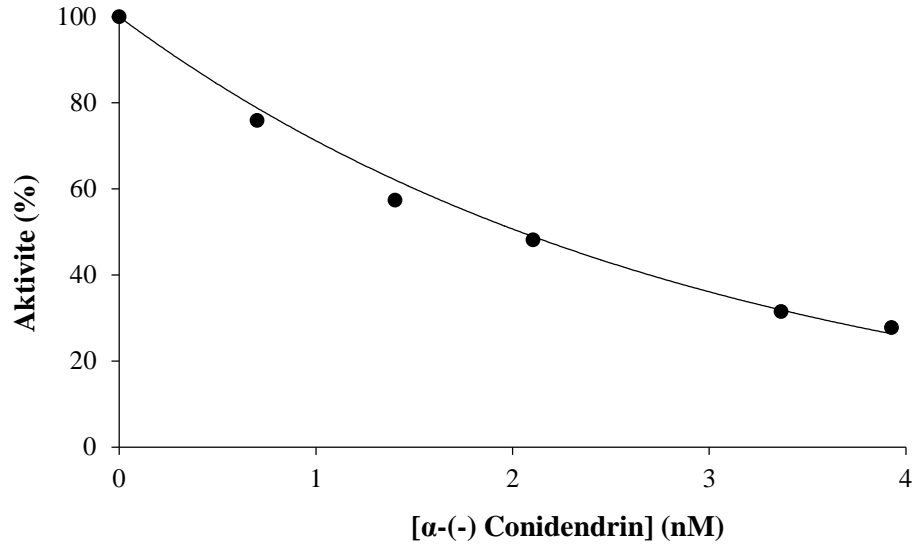


**Çizelge 4.6.** hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

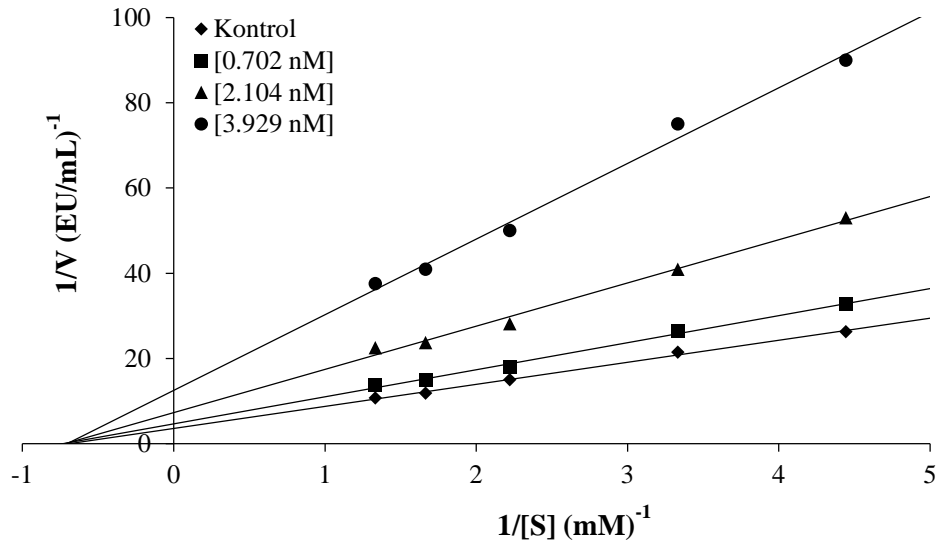
İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	9,08	2,11	Yarışmasız	0,9952
<b>Dietilstilbestrol</b>	50,00	3,00	Yarışmasız	0,9970
<b>Enterodiol</b>	14,07	2,74	Yarışmasız	0,9961
<b>Enterolakton</b>	130,00	3,30	Yarışmasız	0,9945
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	17,40	2,81	Yarışmasız	0,9988
<b>Secoisolariciresinol</b>	180,00	2,14	Yarışmasız	0,9994
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	7,74	1,27	Yarışmasız	0,9966

#### 4.1.4.h. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler ile ilgili sonuçlar

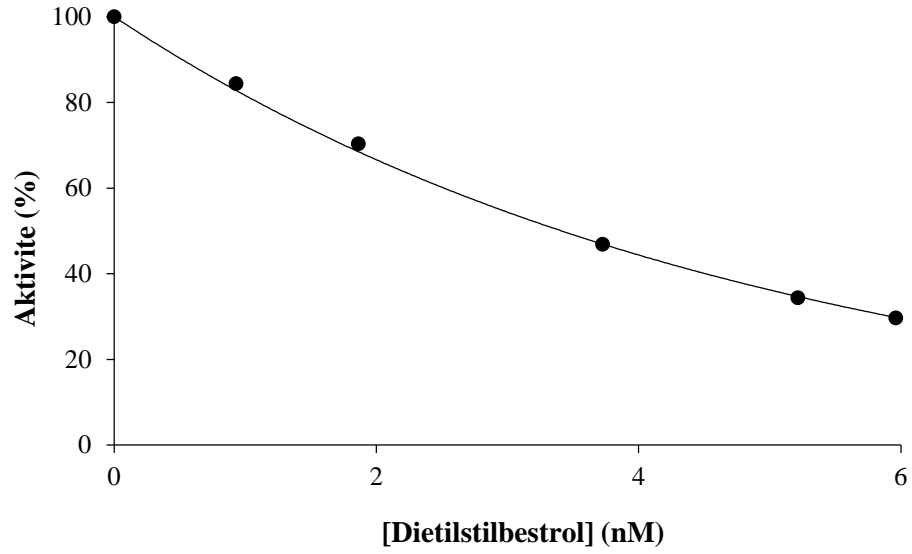
Doygun substrat konsantrasyonunda insan kanından saflaştırılan hCA II enzimi için fenolik yapıdaki bileşiklerin, hCA II enzimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Esteraz aktivitesi tayin yöntemleri kullanılarak ölçümler elde edildi. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik yapıdaki bileşikler için aktivite (%)-[I] ve K<sub>i</sub> grafikleri çizildi. Elde edilen ölçümler kullanılarak çizilen grafiklerden her bir molekül için K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı.



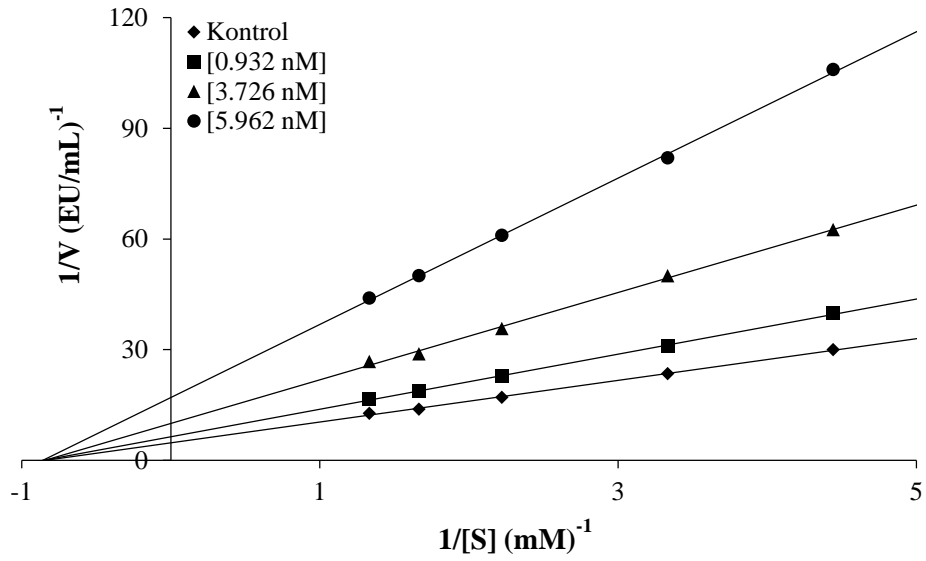
Şekil 4.56. hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı  $\alpha(-)$  Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[ $\alpha(-)$  Conidendrin] grafiği



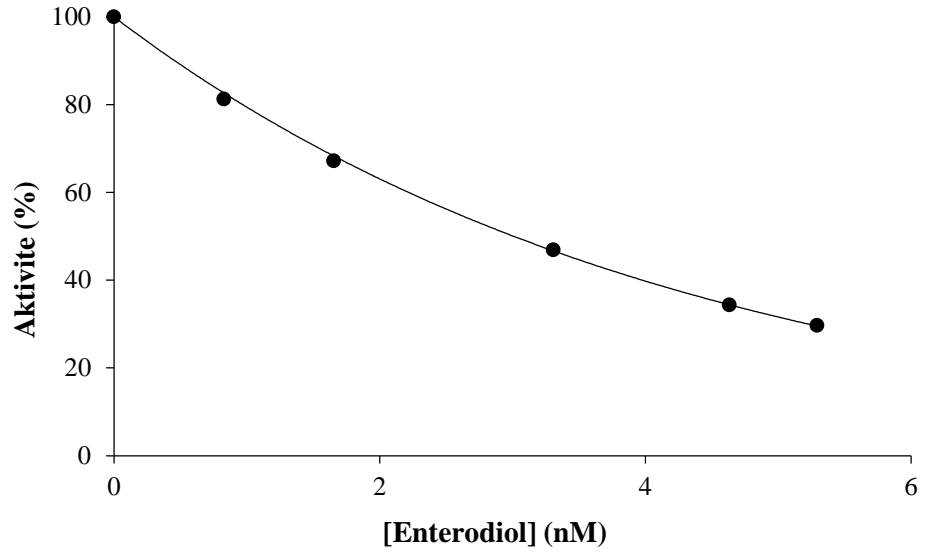
Şekil 4.57. hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı  $\alpha(-)$  Conidendrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



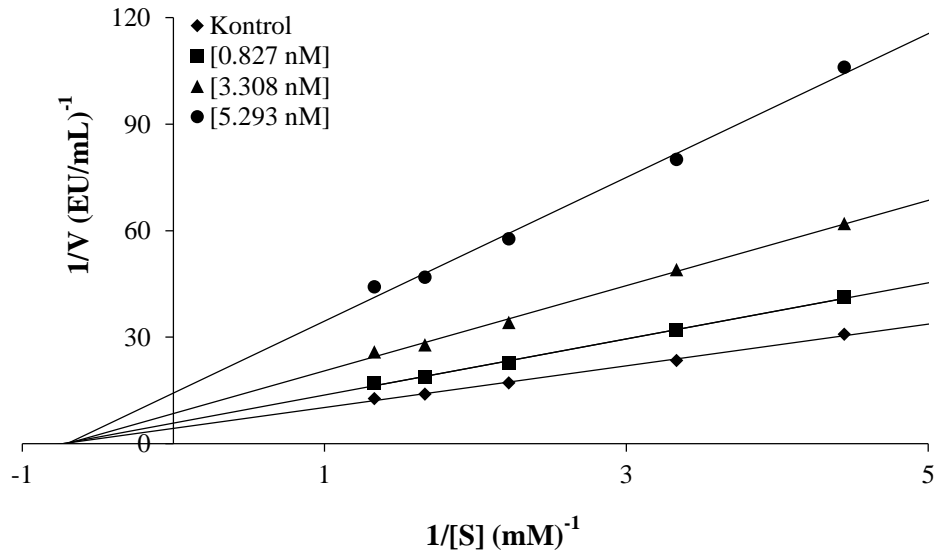
Şekil 4.58. hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Dietilstilbestrol] grafiği



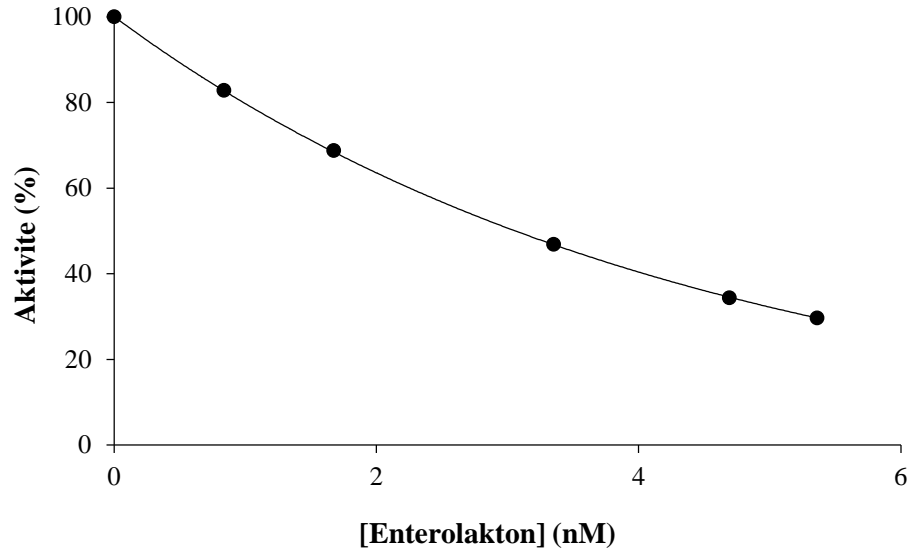
Şekil 4.59. hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Dietilstilbestrol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



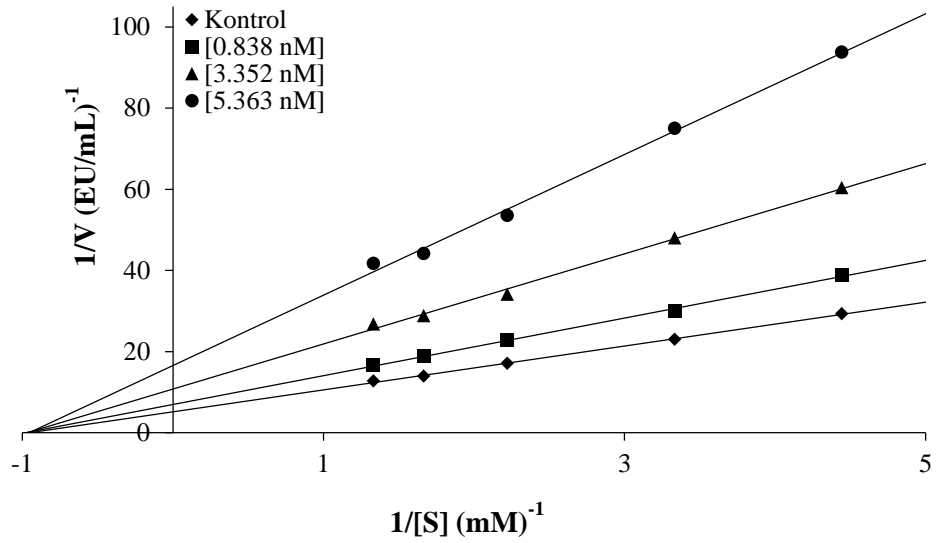
**Şekil 4.60.** hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterodiol] grafiği



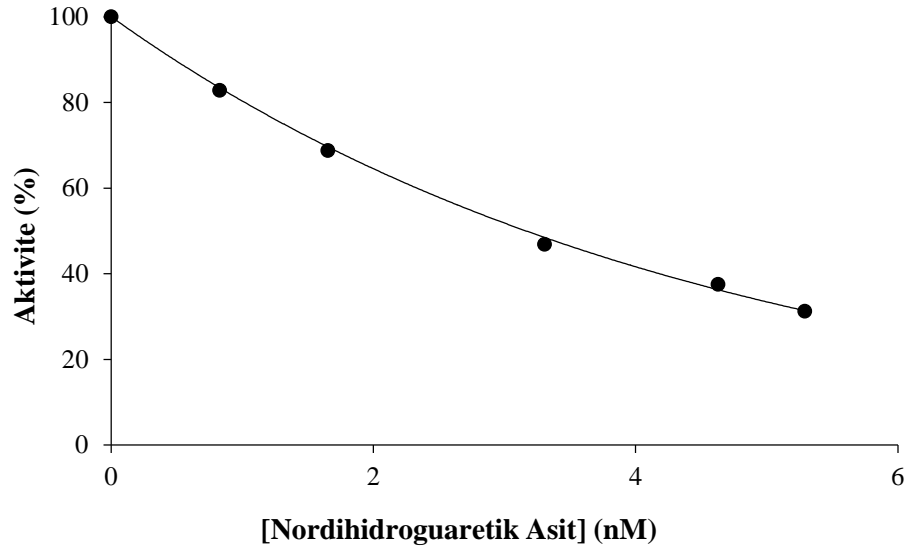
**Şekil 4.61.** hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterodiol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



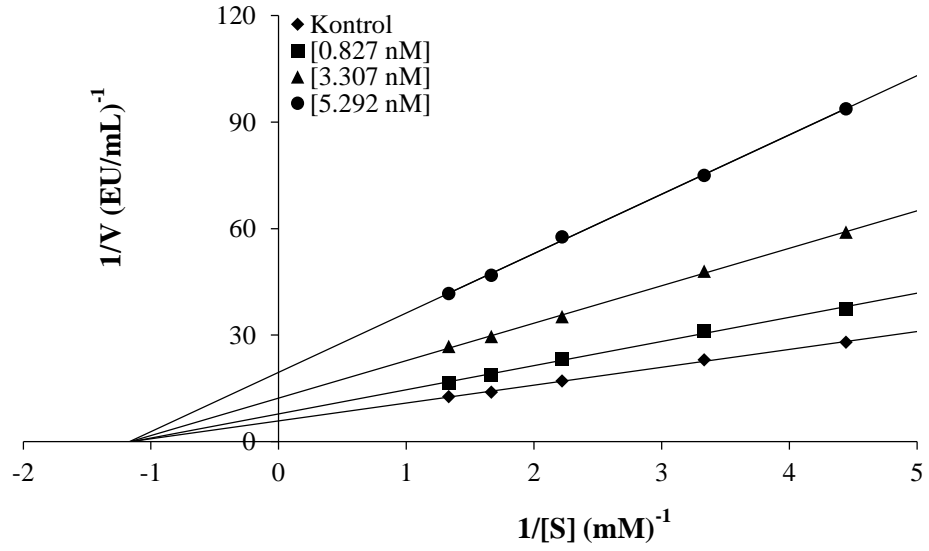
Şekil 4.62. hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Enterolakton] grafiği



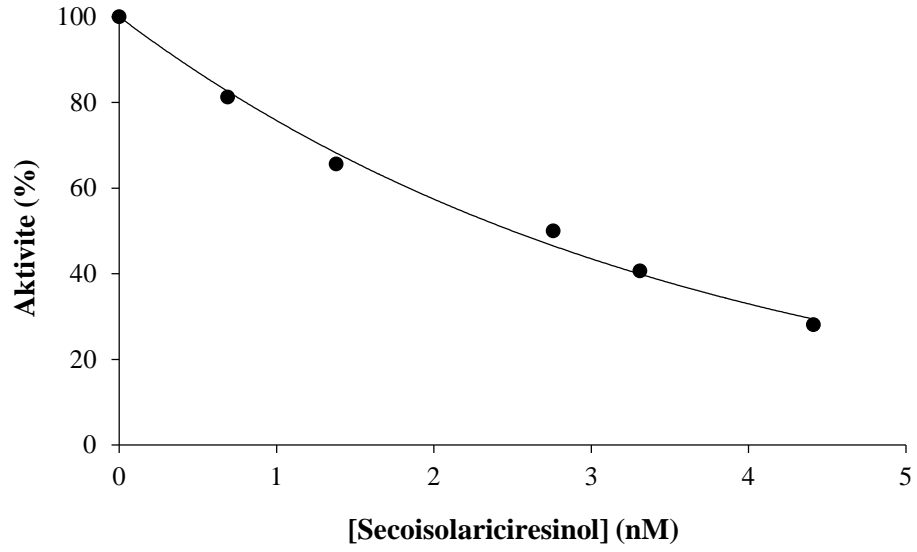
Şekil 4.63. hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Enterolakton konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



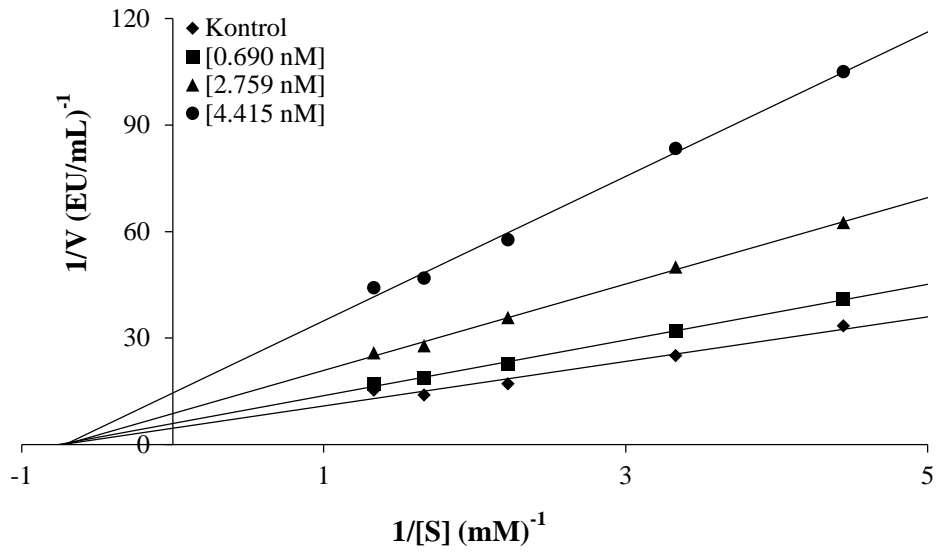
**Şekil 4.64.** hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Nordihidroguaretik Asit] grafiği



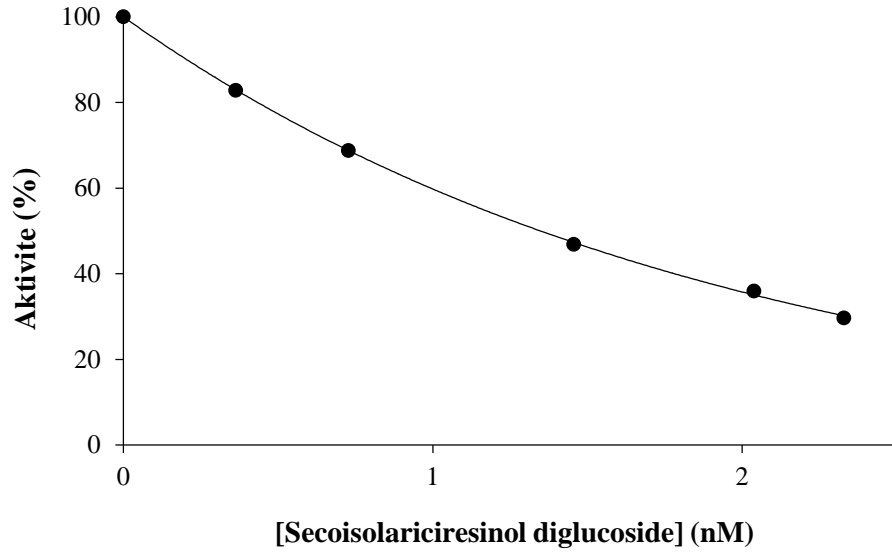
**Şekil 4.65.** hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Nordihidroguaretik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



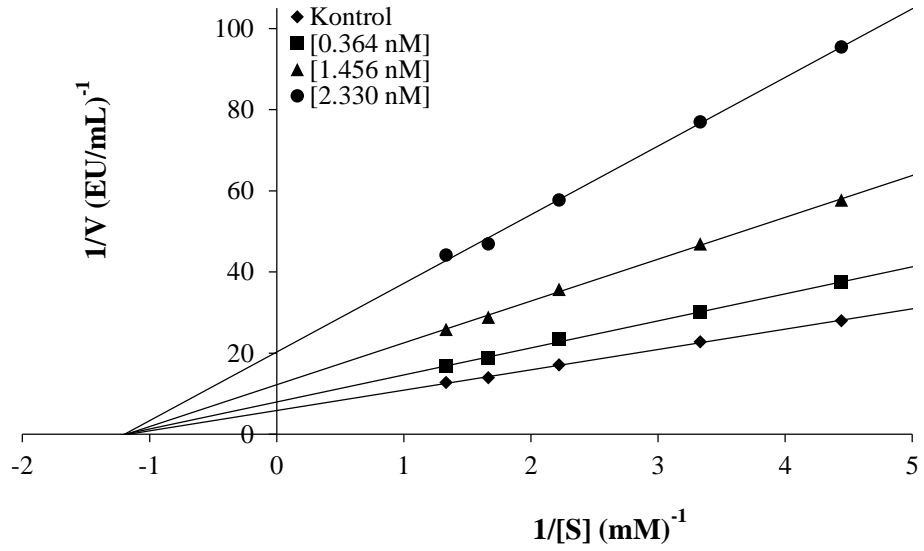
Şekil 4.66. hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol] grafiği



Şekil 4.67. hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.68.** hCA II enziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Secoisolariciresinol diglucoside] grafiği



**Şekil 4.69.** hCA II enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Secoisolariciresinol diglucoside konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Çizelge 4.7.** hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	17,47	2,03	Yarışmasız	0,9912
<b>Dietilstilbestrol</b>	223,60	2,78	Yarışmasız	0,9991
<b>Enterodiol</b>	22,78	2,68	Yarışmasız	0,9995
<b>Enterolakton</b>	26,05	2,63	Yarışmasız	0,9999
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	36,29	2,56	Yarışmasız	0,9977
<b>Secoisolariciresinol</b>	8,96	2,52	Yarışmasız	0,9916
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	48,54	1,11	Yarışmasız	0,9992

## 4.2. Tartışma

Bir molekülün elektron verebilme kapasitesinin antioksidan özelliği gösterebilmesi ile ilişkili olduğu bilinir. Bu özellik biyoaktif olan moleküllerin indirgeme kapasitelerini yansıtır (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006). Antioksidan moleküller redoks reaksiyonlarında indirgeyici güç olarak görev alarak ortamdaki redüktant ve oksidan moleküllerin kararlılığını sağlamada işlev görürler. Tez çalışması kapsamında indirgeme metodu için en yaygın olan üç metot kullanıldı. İlk olarak kullanılan yöntem ise, önemli metotlardan biri olan Fe[(CN)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> çözeltisindeki Fe<sup>3+</sup>'nin Fe<sup>2+</sup>'ye indirgenmesi metoduydu. Bu yöntem, çalışma kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin ilavesiyle ortamda oluşan indirgenmiş ürüne Fe<sup>3+</sup> eklenmesi, 700 nm'de güçlü bir şekilde absorban veren ve Prussian mavisi rengindeki kompleks olan Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]'ın meydana gelmesine sebep olur. Elde edilen absorban artışı, kompleks oluşumundan dolayı meydana gelen artışı ve buna bağlı olarak da artan bir indirgeme kapasitesi olduğunu gösterir.

Metodun kontrol çözeltilisinin rengi sarıdır ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik karakterde olan numunelerin ortama ilave edilmesiyle de indirgeme kapasitelerine bağlı olarak ortamın rengi farklı tonlarda yeşil-mavi rengine dönüşür. Eğer bir molekül  $Fe^{3+}$  iyonlarını güçlü bir şekilde indirgeyebiliyorsa, bu molekül yüksek antioksidan aktivitesi de gösterebilir (Benzie and Strain 1996). Çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar bu metot için değerlendirildiğinde kullandığımız fenolik bileşiklerin bir kısmı standart antioksidanlara göre daha yüksek, bir kısmı yakın değerler bazıları da standartlardan daha düşük indirgeme kuvvetine sahip olduğu tespit edildi.

Son yıllarda Apak ve grubu tarafından geliştirilen Kuprak metodu ile  $Cu^{2+}$  iyonlarını indirgeme kapasitesi analizleri Gülçin ve grubu tarafından sıklıkla uygulanmaktadır (Apak *et al.* 2006; Gülçin 2008; 2010; Gülçin *et al.* 2010; Polat Köse *et al.* 2015). Bu metodun maliyetinin düşük olmasıyla birlikte; kararlı, kısa sürede ve rahat uygulanabilir olması da metodun kullanımını arttırmaktadır. Ayrıca indirgeme özelliği gösteren molekülün kimyasal yapısına ya da hidrofilik özellikte olup olmadığına bakılmaksızın çoğu antioksidan molekül için uygulanabilen bir metot olmuştur. Glutatyonda olduğu gibi -SH grubu barındıran pek çok antioksidanın aktivite ölçümünde yaygın olarak uygulanır (Huang *et al.* 2005). Kuprak metodu kromojenik bir metot olmakla birlikte bir redoks tepkimesidir, ayrıca metot fizyolojik pH'ya yakın bir pH aralığı olan pH 6,5'da çalışılmaktadır (Apak *et al.* 2006; Gülçin 2008; Köksal *et al.* 2009). Bu metot için elde ettiğimiz sonuçlara göre çalışma kapsamında kullanılan moleküllerin indirgeme kuvvetleri  $Fe^{3+}$  iyonlarının indirgenme metodu ile paralellik göstermektedir. Daha önce de belirtildiği gibi aynı molekül yapısına sahip olan fenolik bileşikler için fenol halkasına bağlı olan hidroksil grubunun pozisyonu da antioksidan kapasitesi bakımından önemli bir unsur olmuştur (Gülçin 2012).

Bu konuda çalışılan bir diğer yöntem de FRAP metodudur ve bu metot  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenme kuvveti metotlarından biridir. FRAP metodu ile düşük pH'da  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi ile birlikte renkli bir bileşik olan  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksinin oluşumu gerçekleşir. FRAP metodu ile oluşan bu kompleks kuvvetli asidik ortamda gerçekleşerek indirgeme kapasiteleri belirlenir (Benzie and Strain 1996).  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$

indirgeme metodu ile FRAP metodu arasındaki fark, FRAP metodunun daha kuvvetli asidik bir ortamda ve reaktif kullanarak yapılmasıdır. Bununla birlikte  $Fe^{3+}$  tuzunun redoks potansiyeli yaklaşık olarak 0,70 V civarında bir değere sahip olmasıyla,  $ABTS^{+}$ 'nin redoks potansiyeline yakın (0,68 V) bir değerde olduğu da görülmektedir. Bu sebeple de FRAP ve  $ABTS^{+}$  yöntemleri arasında pek fazla fark yoktur. Sadece FRAP metodunun reaksiyon ortamı oldukça kuvvetli asidik (pH 3,6) bir ortamdır. Hem asidik ortamda hem de antioksidan molekülleri ile birlikte  $Fe^{3+}$ -TPTZ kompleksinin  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksine indirgenmesiyle oluşan renkli çözeltinin 595 nm'de maksimum absorbansı ölçülür. FRAP yöntemi ile elde edilen sonuçlar analiz zamanına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Ferulik asit, kafeik asit, tannik asit ve kuersetin gibi bazı polifenolik bileşikler yavaş hareket etmektedirler. Bu nedenle de analiz sonuçlarını belirlemek için daha da uzun bir reaksiyon süresi gereklidir. Bu metot yalnızca demir iyonlarını esas almaktadır. Bu sebeple de mekanik ve fizyolojik açıdan antioksidan aktivitesi ölçümleri için uygun olmamaktadır. Bununla birlikte, diğer metotların aksine FRAP metodu kolay, kısa sürede gerçekleştirilen, düşük maliyetli ve özel ekipmanlar da gerektirmemektedir (Huang *et al.* 2005; MacDonald-Wicks *et al.* 2006).

Metabolizmada yer alan serbest haldeki demir ve bakır iyonlarının kontrolü mümkün olabilmektedir. Organizmada demir iyonları barsaklarda emilerek transferrin proteinleri tarafından da  $Fe^{3+}$  olarak demir ihtiyacının olduğu hücrelere taşınmakta ve  $Fe^{2+}$  şeklinde de ferritin ve hemosiderin proteinleri ile depolanmaktadır. Spesifik bir şekilde transferrine bağlı olan  $Fe^{3+}$  iyonları serbest radikal reaksiyonlarında yer almamaktadırlar. Organizma için fazla olan demir iyonları da birer “demir havuzu” olan ferritin ve hemosiderin proteinleri ile depolanmaktadır.

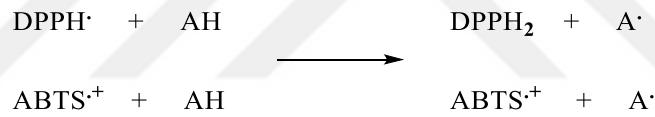
İnsan plazmasında mevcut olan bakır iyonlarının büyük bir çoğunluğu serbest radikal reaksiyonlarının oluşumunu tetiklemeyen bir yapıda olmakla beraber, seruloplazmin proteinine bağlı halde bulunur (Halliwell 1994). Metabolizmanın normal durumu bu şekilde iken, bu dengenin değişmesi durumunda hidroksil radikalleri oluşmaktadır (Chevion *et al.* 1993). Meydana gelen bu radikaller doku tahribatlarına neden olduğu için organizmadaki yabancı maddeleri sindirerek yok eden fagositlerin aktivasyonu ya

da liziz olmuş olan hücrelerden geçiş metali iyonlarının yayılmasıyla birlikte serbest radikal oluşumu söz konusudur. Meydana gelen bu serbest radikallerden dolayı da doku ve hücreler zarar görerek dolaylı bir şekilde geçiş metali iyonlarının yayılması ile daha çok serbest radikalin oluşmasına dolayısıyla da hücre ve dokulardaki zararların daha da artmasına neden olmaktadır. Protein ve enzimlerin bünyelerindeki amino asitlerin -SH gruplarının da oksitlenerek deaktive olmasına sebep olurlar. Bununla birlikte hücre membranlarında bulunan çift bağ içeren yağ asitlerinin de oksitlenmesine sebep olarak önemli derecede hücre hasarlarına yol açmaktadır (Gülçin 2012). Geçiş metal iyonları, yağ oksidasyonunun başlangıç kademesinde aktivasyon enerjisinin indirgenmesi sonucu yağın okside olmasını hızlandırır. Metal iyonları lipit alkil radikallerinin üretilmesini sağlayarak lipitlerle direkt olarak reaksiyon verirler. Ayrıca geçiş metal iyonları singlet oksijen, hidroksi radikali ve hidrojen peroksit oluşumunu da gerçekleştirirler. Ortamda bulunan lipit alkil radikali ile reaktif oksijen türleri yağların oksidasyonlarını hızlandırmaktadırlar. Bununla birlikte hidroperoksitlerin parçalanmasına da yol açarak yağların otooksidasyonunu hızlandırmaktadırlar. Fenolik yapıdaki moleküller bu tür durumlarda ağır metal iyonlarını şelatlarlar ve metallerin indüklemiş olduğu oksidatif reaksiyonları azaltırlar. Bunun yanı sıra, fenolik bileşikler  $Fe^{3+}$  iyonlarını hidroperoksitlerin bozunmasını katalizleme durumunda daha aktif olan  $Fe^{2+}$  iyonlarına dönüştürerek oksidatif reaksiyonların meydana gelmesini arttırabilmektedirler (Annakkaya 2012; Gülçin 2012).

Son dönemlerde yapılan araştırmalar ile antioksidan molekülleri içeren gıdaların katarakt ve pek çok kanser türünü önlediği ve bu önleyici etkisi sayesinde özellikle de meyve ve sebzelerin yapısında bulunan doğal antioksidan maddelere olan ilgi her geçen gün daha da artmakta ve yapılan bu çalışmalar da önem kazanmaktadır (Baysal and Ersus 1999; Gülçin 2012).

Yakın zamanda pek çok molekül ya da ekstraktın sentetik yapıdaki serbest radikalleri giderme kapasiteleri üzerinde çalışmalar yapılarak, bu konu ile alakalı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında DPPH $\cdot$  (Gülçin 2006b, 2012) ve ABTS $^{+}$  serbest radikallerinin giderilmesi aktivitesi (Gülçin *et al.* 2006a) gibi yöntemler yer almaktadır.

Kullanılan bu metotların yaygın kullanım alanına sahip olmasının nedenleri arasında kolay çalışılabilirlikleri, hassas ölçümler vermeleri ve analiz işlemlerinin kısa sürede uygulanması şeklindeki avantajlarından kaynaklanmaktadır (Van den Berg *et al.* 1999; Awika *et al.* 2003). Gerek saf haldeki moleküllerin gerekse de bitkisel kaynaklı ekstraktların antioksidan aktiviteleri için yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan metotlar DPPH $\cdot$  ve ABTS $^{+\cdot}$  serbest radikallerinin kullanıldığı ve spektrofotometrik yöntem olan DPPH $\cdot$  ve ABTS $^{+\cdot}$  radikali giderme metotlarıdır. Bununla birlikte, hem DPPH $\cdot$  hem de ABTS $^{+\cdot}$  radikallerini giderme metotları kolay, kısa sürede sonuç elde edilen, seçici ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı da çok tercih edilmektedir (Özcelik *et al.* 2003). Bu yöntemlerde kullanılan antioksidan özellikteki maddeler, gerek DPPH $\cdot$  radikali çözeltisi olsun gerekse ABTS $^{+\cdot}$  radikal çözeltisi olsun bunlardan birine ilave edildiğinde çözelti ortamındaki radikal oluşumu durur ve ortamdaki radikaller indirgenerek reaksiyon ortamı renksizleşir.

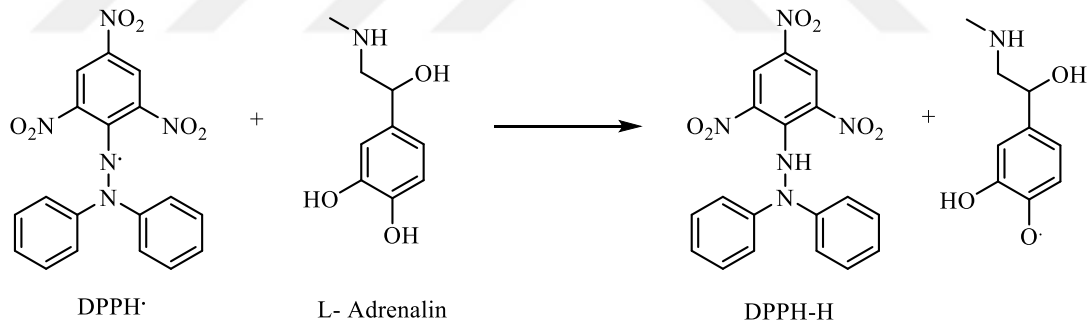


Kromojenik yöntemler olan, menekşe rengindeki DPPH $\cdot$  ve yeşil-mavi rengindeki ABTS $^{+\cdot}$  yöntemlerini kullanmak ve uygulamak oldukça kolaydır. Bu metotların hassasiyetleri oldukça yüksektir. Ayrıca kolay ve kısa sürede çalışılmaları sebebiyle bu yöntemlerde aynı anda çok sayıda numune ile çalışılabilmektedir (Awika *et al.* 2003).

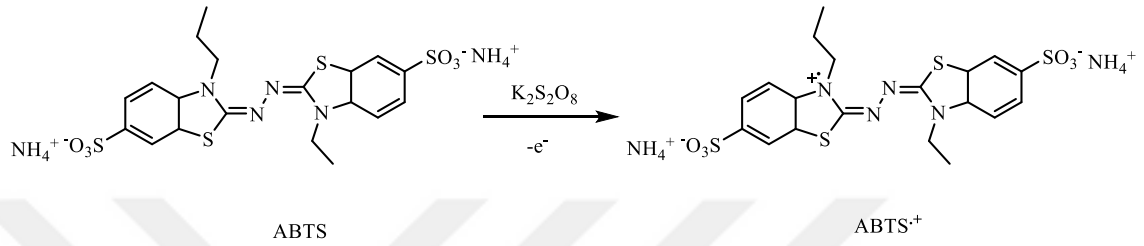
Bu metotlar arasında radikal olarak kullanılan DPPH $\cdot$  radikali uzun ömürlü bir radikal olması ile birlikte radikal giderme kapasitelerini belirlemede en çok kullanılan yöntemdir (Özcelik *et al.* 2003). Bu yöntem ile antioksidan aktiviteye sahip maddeler menekşe renginde olan DPPH $\cdot$  radikalinin sarı renkli olan ve indirgenmiş difenil-pikrilhidrazine dönüştürürler. Yöntemin prosedürü, hidrojen verici gruplar içeren antioksidan karakterli maddeler ile etil alkolde çözünmüş olan DPPH $\cdot$  serbest radikallerinin indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 4.70). Bu indirgenme tepkimesi ile indirgenmiş ve radikal özellik taşımayan DPPH-H molekülleri oluşmaktadır. DPPH-H



Askorbik asit ile DPPH<sup>·</sup> radikali arasında bir etkileşim olduğu zaman, askorbik asidin 3 nolu karbonuna bağlı olan hidroksil grubundaki oksijen ile hidrojen arasındaki kovalent bağ homolitik olarak parçalanır ve hidrojen atomu elektronunu alarak DPPH<sup>·</sup> bünyesine katılarak indirgenmiş DPPH-H molekülünün oluşumuna olanak sağlar. Bu sırada askorbik asit de askorbil radikaline dönüşmektedir. Daha sonra askorbil radikali de DPPH<sup>·</sup> radikaline bir hidrojen aktararak hem radikali söndürür hem de kendisinin dehidroksi askorbik asit'e dönüşmesini sağlar. Son yıllarda Gülçin tarafından yürütülen çalışmalar ile farklı kimyasal yapılara sahip Rezveratrol ve L-Adrenalin'in DPPH<sup>·</sup> radikalini söndürme reaksiyonu için bir mekanizma öngörülmüştür (Gülçin 2009). Bu çalışmalarda kullanılan rezveratrol, DPPH<sup>·</sup> radikalini indirgeyerek kendisi fenoksi radikali olarak bir ara ürüne dönüştüğü bildirilmiştir. Ortamda bulunan bu radikal ara ürünün elektronu fenol halka üzerinde delokalize olduğu bildirilmiştir. L-Adrenalin de rezveratrole benzer bir mekanizma ile DPPH<sup>·</sup> radikalini giderdiği yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir (Gülçin 2009) (Şekil 4.72).

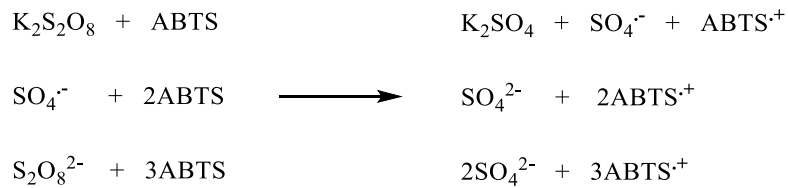


Bu yöntemde ilk olarak  $ABTS^{\cdot+}$  serbest radikali oluşturulması gerekir. Metot, ABTS ve  $K_2S_2O_8$  karışımı ile meydana gelen etkileşimle mavi-yeşil renkli  $ABTS^{\cdot+}$  çözeltinin direkt olarak oluşması ve oluşan bu radikal kationun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.



**Şekil 4.73.**  $ABTS^{\cdot+}$  radikalinin oluşum mekanizması

Elde edilen  $ABTS^{\cdot+}$  radikalinin 734 nm’de gösterdiği maksimum absorbans değeri ölçülerek analizler yorumlanmaktadır.  $ABTS^{\cdot+}$  radikali farklı oksidan özellikli moleküllerle de hazırlanabilir. Burada ise oksidan madde olarak  $K_2S_2O_8$  kullanılmıştır, bunun dışında  $Mn_2O_3$ ’de elektron alıcı olarak kullanılabilir.  $ABTS^{\cdot+}$  radikalleri, ABTS /  $K_2S_2O_8$  ortamında aşağıdaki gibi meydana gelmektedir. Tepkime sırasında peroksidisülfatın yıkım aşaması elektron transferi gerçekleştikten sonra olur. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali aşağıdaki şekilde tepkime verir.



$ABTS^{\cdot+}$  radikalleri DPPH<sup>•</sup> radikallerine göre daha da reaktiftir ve bir tane H atomu transferi gerektiren DPPH<sup>•</sup> radikali giderme reaksiyonlarından farklıdır.  $ABTS^{\cdot+}$  radikalleri için bir tane elektron transferi gerekmektedir (Kaviarasan *et al.* 2007). Ancak  $ABTS^{\cdot+}$  radikallerinin giderilme mekanizması ise daha önce belirtilen DPPH<sup>•</sup> radikali gidermesindeki reaksiyon mekanizması ile benzer özellik taşır.



Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen bilgilere göre hem AChE hem de BChE enzimleri özellikle demans hastalıkları açısından çok önemli bir yere sahiptir. Kolinesterazlar, birçok dokuda, plazmada ve vücut sıvılarında bulunan önemli fonksiyonlara sahip enzimlerdir. Substrat zgllg ve inhibitör hassasiyetlerine göre AChE ve BChE olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Yıldız *et al.* 2004; Radic *et al.* 1993; Bodur *et al.* 2008). AChE (EC 3.1.1.7) beyinde, kaslarda ve eritrosit zarında lokalize olan asıl kolinesteraz olarak işlev görmektedir (Grisaru *et al.* 1999). ACh'in kolinerjik sinapstan salınımı gerçekleştikten sonra kolinesteraz enzimleri tarafından hidroliz edilmesi sonucu sinirler arası iletim sonlanmaktadır (Massoulié *et al.* 1993). BChE (EC 3.1.1.8) ise hem kolin esterlerini hem de bu moleküllerin tiyol türevlerini ve aspirin ve pestisitler de dâhil olmak üzere birçok ilaç ve karbamat esterlerini, organofosfat bileşiklerini yıkabilen ve serumda bulunan detoksifiye edici bir enzimdir (Yıldız *et al.* 2004; Radic *et al.* 1993; Bodur *et al.* 2008; Grisaru *et al.* 1999; Massoulié *et al.* 1993; Bodur *et al.* 2001; Masson and Lockridge 2010). Çok sayıda farklı molekülleri hidroliz edebilmesine karşın, bütirilkolinesteraz'ın doğal substratı bilinmemektedir (Masson and Lockridge 2010). Fakat BChE'in en uygun substratı da Btirilkolin molekülüdür (Augustinsson 1971). Btirilkolin, sığır kornea epiteli ve beyinde lokalize olmaktadır, fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte nörotransmitter bir molekül olabileceği düşünülmektedir (Duysen *et al.* 2012). Asetilkolinesteraz, asetilkolini hidroliz ederken ortamdaki diğer nörotransmitter molekül olan serotonin, norepinefrin ve epinefrin molekülleri üzerinde herhangi bir reaksiyona sebep olmazlar. Serotonin, norepinefrin ve epinefrin sinaptik boşluk tarafından absorbe edilerek santral sinir iletiminde hayati fonksiyonlar görürler. Asetilkolinesteraz enzimi beyinde, sinir hücrelerinde, eritrositlerde ve kaslarda bulunmaktadır, psdokolineraz yani bütirilkolinesteraz enzimi ise aynı mekanizmaya sahip olmasına rağmen plazmada bulunur ve asetilkolinin hidroliz reaksiyonunu dolaşımda gerçekleştirir. AChE, sinir uçları önünde biriken molekülleri parçalayarak oradan uzaklaştırılmalarını sağlar. Böylelikle, daha sonradan gelen nörotransmitterlerin n sürekli açık olur ve sinir iletiminde bir aksaklık olmaz (Wilson and Nachmansohn 1954).

Aktif hale getirilmiş nötrofiller ve makrofajlardan meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidan moleküller, Alzheimer hastalığı gibi pek çok nörodejeneratif hastalıkların ve ağırlı patojenik birçok hastalığın ortaya çıkmasında oldukça etkilidirler (Gibson and Huang 2005; Fawole *et al.* 2010). Sonuç olarak, farklı metabolik yollarda meydana gelen aksaklıklar sonucu Alzheimer hastalığı başta olmak üzere pek çok nörolojik rahatsızlık ortaya çıkmaktadır.

Alzheimer hastalığı gençlerde de görülebmesinde rağmen, daha çok yaşlı kişilerde görülebilen bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı sonucu beyindeki nörotransmitter miktarına azalma görülmektedir ve bu rahatsızlıkta miktarında en çok azalma görülen nörotransmitter molekül asetilkolindir. Bu hastalığı tedavi etmek veya engelleyebilmek için asetilkolinin hidrolizi azaltılmalıdır ki bu durum asetilkolini parçalayan AChE'in inhibisyonu ile mümkündür. Bu sebeple de Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılan ve tasarlanan ilaçlar asetilkolin seviyesini ayarlamak amacıyla kullanılmakta ve bu duruma göre sentez tasarımları yapılmaktadır (Heinrich and Teoh 2004). Bununla birlikte, kullanılan ilaçların pek çok yan etkisi mevcuttur. İlaçların gösterdiği yan etkilerin bir kısmı; gastrointestinal sistem rahatsızlıkları, bulantı, hepatotoksisite, baş dönmesi, kusma, diyare ve daha pek çok problemlerdir (Schulz 2003; Mukherjee *et al.* 2007). Hastalık tedavi edilirken karşılaşılan bu yan etkilerin başka rahatsızlıklara sebebiyet vermesinden dolayı gerek AChE gerekse BChE için daha iyi sonuçlar alınabileceği düşünülen doğal inhibitör kaynakları ilgi çekmektedir. Tez kapsamında kullandığımız SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON birer doğal kaynaklı fenolik bileşiklerdir. Bu bakımdan kullanılan fenolik bileşikler, AChE ya da BChE inhibitörleri olarak ilaç sentez tasarımında kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Çalışmalarımızda kullandığımız moleküllerin fenolik yapıya sahip olmalarından dolayı serbest radikal giderme işlevine sahiptirler. Bilindiği gibi serbest radikaller vücutta pek çok doku ve hücreleri hasara uğratarak ciddi hastalıklara neden olmaktadır ki bu hastalıklardan biride nörolojik bir rahatsızlık olan Alzheimer hastalığıdır. Doğal kaynaklı fenolik bileşikler vücutta hem serbest radikalleri giderir hem de serbest radikallerin sebep olduğu hastalıkları önlerler.

Karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) enzimi gerek insan gerekse hayvanların pek çok dokusundan başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Oktay *et al.* 2015; Polat Köse *et al.* 2015). pH düzenleyici olarak da fonksiyon gören ve aktif merkezinde  $Zn^{2+}$  metali bulduran CA enzimi karbondioksitin, bikarbonat ve protona dönüşüm reaksiyonunu da oldukça hızlı bir şekilde katalizlemektedir (Gülçin *et al.* 2004f). CA bu dönüşüm reaksiyonunu, aktivasyon enerjisini düşürerek daha düşük bir enerji ile reaksiyon hızının artmasını sağlayarak saniyede  $10^4$ - $10^6$  reaksiyon hızına kadar ulaştırır. Sonuç olarak da %100 dönüşüm gerçekleştirir (Çoban *et al.* 2007).

CA, genel olarak metabolik yoldaki  $CO_2$ 'in hidratasyonunun sağlanmasında, dokulardaki  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  düzenlenmesinde de rol alarak pH düzenlenmesinde işlev görür. Örneğin, göz lensi, gastrik mukoza ve böbrek bu dokulardan sadece birkaç tanesidir. Bu konudaki çalışmalar ilerledikçe daha farklı dokulardan da karbonik anhidraz saflaştırılması işlemleri karşımıza çıkmaktadır. Sığır eritrositleri, sığan eritrositleri, balık eritrositleri, İnsan eritrositleri, sığır lökositleri, sığır kemiği, sığan tükürüğü, histokimyasal metotlarla kaslar, prostat, tükürük bezleri, sinir miyelin kılıfı, endometrium dokularından, pankreas, beyin ve çeşitli bakteriler, farklı bitki kaynaklarından saflaştırılarak pek çok kaynaktan da karakterize edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004; Polat Köse *et al.* 2015).

Bitki ve hayvan CA enzimleri arasında farklılıkların olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur (Atkins *et al.* 1972). Karbonik anhidrazın molekül kütlesi memelilerde 30 kDa civarında iken bitkilerdeki molekül kütlesi ise 160 ile 260 kDa civarında hegzamerik bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002).

Son zamanlarda CA'nın katalizleme mekanizması üzerinde pek çok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, CA enziminin metabolik yollarda oldukça önemli fonksiyonlara sahip olması, sulu ortamda kararlı bir davranış sergilemesi ve uygun şartlarda aktivitesini koruyarak uzun bir süre saklanabilmesi şeklindeki birçok

avantaj sağlayan özellikleri tespit edilmiştir. Ayrıca ilgili enzimin hayati fonksiyonlara rol alması, çeşitliliği, çalışılabilirliği ve geniş bir çalışma alanına sahip olması bu tez kapsamındaki çalışmalar için seçilmesinde yol göstermiştir. Bu nedenle önemli bir fenolik bileşik sınıfı olan bazı lignan bileşikleri ve yine fenolik bir bileşik olan dietilstilbestrol'ün hCA I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırılması tez çalışmalarımızın son basamağı olmuştur. Çalışmalarımızın bu kısmında taze insan kanından hCA I ve II izoenzimleri afinite kromatografisi tekniği kullanılarak ayrı ayrı saflaştırıldı. Grubumuz tarafından, Sefaroz-4B-L-Tirozin içeren afinite kolon materyali olan jel hazırlandı. Bu afinite kolonu jeli, Sefaroz-4B yapısındaki katı bir destek materyali üzerinde hazırlandı. Sefaroz-4B'nin serbest hidroksil grupları literatürlerde sıklıkla CNBr ile aktifleştirilerek işlem görmektedir. Hazırladığımız kolon materyali için grubumuz da aynı yöntemi kullanılarak Sefaroz-4B afinite jelini CNBr ile aktifleştirilmesini gerçekleştirdikten sonra, L-Tirozinin kovalent olarak bağlanması sağlanarak, sülfonamit diazolanıp L-Tirozine kenetlendirildi. Afinite jeli için uzantı kolu olarak L-Tirozin ve enzimi spesifik olarak bağlamak amacıyla ligand olarak da sülfonilamit kullanıldı. Sülfanilamit CA'nın spesifik bir inhibitörü olmasından dolayı afinite jelinde ligand olarak kullanıldı (Farell *et al.* 1997; Akincioğlu *et al.* 2013).

Yine kolon materyalinde uzantı kolu olarak kullanılan L-Tirozin'in kullanılma amacı ise; CA'nın ligand ile daha iyi bir etkileşim gerçekleştirmesine olanak sağlamaktır. Çünkü CA'nın aktif bölgesini oluşturan kısım enzimin globüler yapısının 12-15 Å derinliğine sahip olduğu X-ışınları kristallografisi çalışmaları ile tespit edilmiştir (Cuatrecasas 1970). Bu sebeple de hazırladığımız afinite jelinde bahsedilen derinliğe ulaşabilmek için bu uzunluktaki bir uzantı kolunun bağlanması ile erişilebilmektedir. L-Tirozin de afinite jelinin yapısına girip CA enziminin yüksek bir oranda saflaştırılması amacı ile kullanıldı (Chegwidden *et al.* 2000).

## 5. SONUÇ

Tez kapsamında yürütülen çalışmada kullanılan Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Dietilstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolakton (ENL), Nordihidroguaretik asit (NOR) ve  $\alpha$ -Conidendrin ( $\alpha$ -CON)'in antioksidan aktivitelerinin ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi gerçekleştirildi.  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $Cu^+$ ) indirgeme kapasitesi, FRAP metodu ile  $Fe^{3+}$ -TPTZ indirgeme kapasitesi, DPPH serbest radikali giderme aktivitesi ve ABTS<sup>+</sup> radikali giderme aktivitesi gibi farklı biyoanalitik yöntemler kullanılarak farklı konsantrasyonlarda SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON için antioksidan kapasiteleri incelendi. Faydalanılan antioksidan ve antiradikal yöntemler ile elde edilen sonuçlar, gıda ve ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks'tan oluşan sentetik ve standart antioksidanlarla kıyaslandı.

Fenolik bileşiklerin çalışılan konsantrasyonlarında (10-30  $\mu$ g/mL), artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak demir iyonlarını ve bakır iyonlarını indirgeme kapasitelerinde, DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı artış görüldü.

Antioksidan aktivitesi çalışmaları ile elde edilen sonuçlar; çalışılan fenolik moleküller olan SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON'in standartlarla mukayese edilmesinde standart antioksidan moleküller olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks kullanıldı.

Kullanılan antioksidan yöntemlerinin çoğunda, tez kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin çoğunluğunun aktivitesinin, kullanılan standartların eşit konsantrasyonlarındaki aktivitelerinden çok daha yüksek az sayıdaki moleküllerinde biraz düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

İndirgeme kapasitesi, bir molekülün antioksidan aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemede önemli bir faktördür (Meir *et al.* 1995). Ayrıca saf olan bir molekülün antioksidan karakteri için farklı mekanizmalarda görülebilir. Antioksidan özellikteki moleküller antioksidan kapasitelerini, geçiş metallerinin iyonlarını bağlama ve radikalleri süpürme gibi farklı mekanizmalarla ortaya koymaktadırlar (Diplock 1997; Gülçin 2002). Yürütülen bu çalışmada, incelenen üç farklı indirme kapasitesi metodu da bu mânâda önemlidir ve bu üç indirgeme kapasitesi yönteminden elde edilen sonuçlara göre de tez kapsamında çalışılan fenolik bileşiklerin indirgeme kapasitelerinin artan konsantrasyonla orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

Çalışma kapsamında kullandığımız fenolik bileşiklerden SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON bünyesindeki hidroksil grupları para pozisyonunda iken END, ENL moleküllerinin hidroksil grupları meta pozisyonunda yer almaktadır. Bu sebeptendir ki SECO, SDG, NOR ve  $\alpha$ -CON ve Dietilstilbestrol Kuprak metodunda da olduğu gibi pek çok yöntemde END ve ENL'a kıyasla daha iyi antioksidan aktivitesi sergilediği tespit edilmiştir. Bu durum, moleküllerin kimyasal yapılarına bakıldığı zaman zaten beklenen bir sonuçtur (Gülçin 2012).

SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON'in FRAP metodu ile  $Fe^{3+}$  iyonlarını  $Fe^{2+}$  iyonlarına indirgeme kapasiteleri, konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde arttığı tespit edildi. Yürütülen bu çalışma kapsamında SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON için indirgeme kapasitelerinin açıklanması amacıyla faydalanılan bu üç indirgeme yöntemi arasında bir korelasyon olduğu ve ayrıca artan numune konsantrasyonlarına bağlı olarak indirgeme kapasitelerinde artış olduğu da belirlendi (Çizelge 5.1).

**Çizelge 5.1.** 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ve kuprik ( $Cu^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin absorbands değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	$Fe^{3+}$ İndirgeme Metodu	Kuprak Metodu	FRAP Metodu
<b>BHA</b>	1,48	1,32	1,56
<b>BHT</b>	0,99	1,00	1,01
<b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b>	0,54	0,46	0,67
<b>Troloks</b>	0,52	0,53	1,13
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	2,32	2,09	1,81
<b>Dietilstilbestrol</b>	1,33	1,04	1,40
<b>Secoisolariciresinol</b>	1,31	1,18	1,77
<b>Secoisolariciresinoldiglicoside</b>	0,93	0,59	1,17
<b><math>\alpha</math>- Conidendrin</b>	0,76	0,67	1,32
<b>Enterodiol</b>	0,16	0,06	0,36
<b>Enterolakton</b>	0,15	0,04	0,37

Bu üç indirgeme metodunda da kullanılan fenolik bileşiklerin bir kısmı standart antioksidanlardan daha güçlü indirgeme gerçekleştirirken bir kısmı standartlara yakın bir değerde indirgeme gerçekleştirdi. Bunun yanında standartlar arasında da en iyi sonucu BHA gösterdi.

Tez kapsamında yürütülen bu çalışmada, DPPH $\cdot$  ve ABTS $^{+}$  radikallerini güçlü bir şekilde gidermektedir. Elde edilen sonuçlara göre SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON'ın IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 5.2'de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** 10 µg/mL konsantrasyonunda fenolik bileşiklere ait çözeltilerin DPPH<sup>·</sup> ve ABTS<sup>·+</sup> radikallerini giderme kapasitelerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

<b>Antioksidanlar</b>	<b>DPPH<sup>·</sup> Giderme</b>	<b>ABTS<sup>·+</sup> Giderme</b>
<b>BHA</b>	48,70	18,94
<b>BHT</b>	77,52	16,90
<b>α-Tokoferol</b>	47,48	125,79
<b>Troloks</b>	35,50	17,47
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	36,18	9,83
<b>Dietilstilbestrol</b>	118,71	9,30
<b>Secoisolariciresinol</b>	49,33	7,18
<b>Secoisolariciresinoldiglicoside</b>	71,67	10,48
<b>α- Conidendrin</b>	126,62	12,99
<b>Enterodiol</b>	4220,77	37,89
<b>Enterolakton</b>	6331,16	64,18

Kullanılan yöntemlerden elde edilen sonuçlara bakılarak, Secoisolariciresinol (SECO), Secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), Dietilstilbestrol, Enterodiol (END), Enterolakton (ENL), Nordihidroguaretik asit (NOR) ve α-Conidendrin (α-CON)'ın antioksidan aktivitelerini değerlendirmek gerekirse; üzerinde çalışılan moleküllerin bir kısmı analizlerde kullanılan antioksidan standartlarına göre daha yüksek antioksidan aktivite sergilerken bir kısmının standartlara yakın etki gösterdiği bir kısmının da standartlardan daha düşük etki gösterdiği anlaşılmıştır. Tabi ki burada etkin olan durum, hem bu moleküllere bağlı hidroksil gruplarının sayısı hem de bu grupların fenol halkasına bağlanma pozisyonlarıdır.

Çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz fenolik yapıya sahip olan SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve α-CON moleküllerinin hem AChE hem de BChE



enzimleri üzerindeki inhibisyon özellikleri de araştırıldı. Bu her iki enzim üzerindeki inhibisyon etkileri incelendikten sonra inhibisyon türü,  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değeri tespit edildi. Bu çalışma sırasında Ellman metodu (Ellman *et al.* 1961) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar hem AChE hem de BChE için nM seviyesinde olması antioksidan karakterli ve radikal giderme özelliğine sahip SECO, SDG, Dietilstilbestrol, END, ENL, NOR ve  $\alpha$ -CON molekülleri için beklenen bir sonuç olmuştur.

İnhibisyon çalışmalarına ait sonuçlar,  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri Çizelge 5.3 ve 5.4'te gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen verilere göre; kullanılan fenolik bileşiklerin farmakolojik olarak yol gösterebileceği ve bununla birlikte özellikle bir demans rahatsızlığı olan Alzheimer hastalığının tedavisi için yapılan araştırmalarda kullanılabilmesi öngörülmektedir.

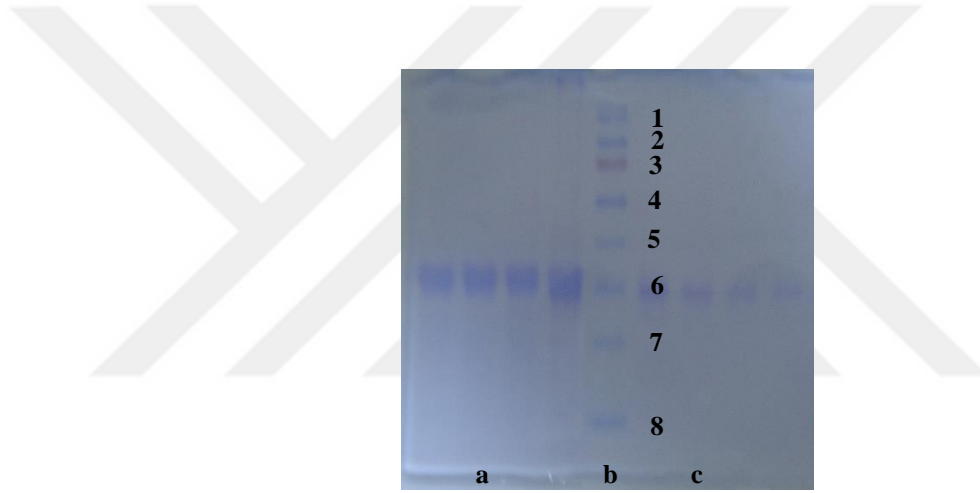
**Çizelge 5.3.** Asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama(nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α(-) Conidendrin</b>	8,75	1,54	Yarışmalı	0,9871
<b>Dietilstilbestrol</b>	19,91	1,55	Yarışmalı	0,9862
<b>Enterodiol</b>	9,08	1,41	Yarışmalı	0,9808
<b>Enterolakton</b>	14,02	1,29	Yarışmalı	0,9883
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	14,93	1,62	Yarışmalı	0,9903
<b>Secoisolariciresinol</b>	8,30	1,30	Yarışmalı	0,9893
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	7,04	0,72	Yarışmalı	0,9857

**Çizelge 5.4.** Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik bileşiklere ait IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama(nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α(-) Conidendrin</b>	0,74	0,15	Yarışmalı	0,9690
<b>Dietilstilbestrol</b>	0,71	0,15	Yarışmalı	0,9604
<b>Enterodiol</b>	0,66	0,14	Yarışmalı	0,9680
<b>Enterolakton</b>	0,64	0,16	Yarışmalı	0,9884
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	0,78	0,17	Yarışmalı	0,9875
<b>Secoisolariciresinol</b>	0,70	0,20	Yarışmalı	0,9746
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	0,36	0,08	Yarışmalı	0,9709

Sonuç olarak grubumuz tarafından hazırlanan jeli kullanarak hCA I ve II izoenzimlerinin doğrudan hemolizattan saflaştırılması sağlandı. Afinite jeline tutunan hCA I ve II izoenzimlerinin elüe edilebilmesi için, sırayla pH 6,3 olan 25 mM'lık  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /1 M NaCl tampon çözeltisi ve pH 5,6 olan 0,1 M'lık  $\text{CH}_3\text{COONa}$  / 0,5 M  $\text{NaClO}_4$  tampon çözeltisi kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimlerin saflık derecelerinin kontrolü için de SDS-PAGE tekniğini uygulandı. hCA I ve II izoenzimlerine ait tek bant elde edildi (Şekil 5.1). Enzimlere ait tespit edilen molekül ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa ağırlığında olup literatürlerdeki veriler ile de uyumlu olduğu görülmektedir (Kitchen *et al.* 1973).



**Şekil 5.1.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

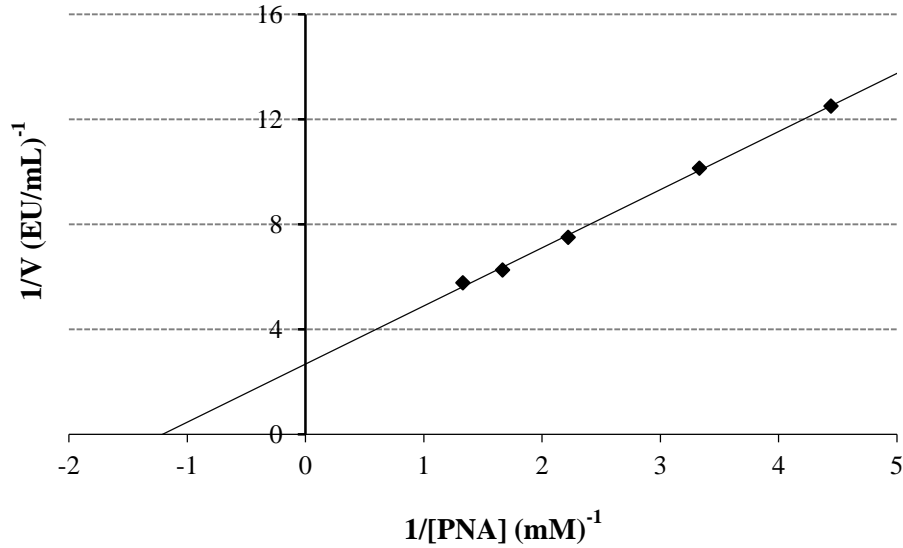
\* a: hCA I, b: Standart proteinler (1: 130 kDa 2: 100 kDa, 3: 70 kDa 4: 55 kDa 5: 40 kDa 6: 35 kDa 7: 25 kDa 8: 15 kDa), c: hCA II

hCA I için spesifik aktivite değeri 4571,62 EU/mg olup %49,54 verim ile saflaştırıldı. hCA II izoenzimi için ise spesifik aktivite değeri 15555,56 EU/mg olup %50,11 verim ile saflaştırıldı. Bunlara ilaveten, taze insan kanından elde edilen hemolizattan enzim ünitesi, spesifik aktivite ve afinite kolonu kullanılarak hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları Çizelge 5.5'te verildi.

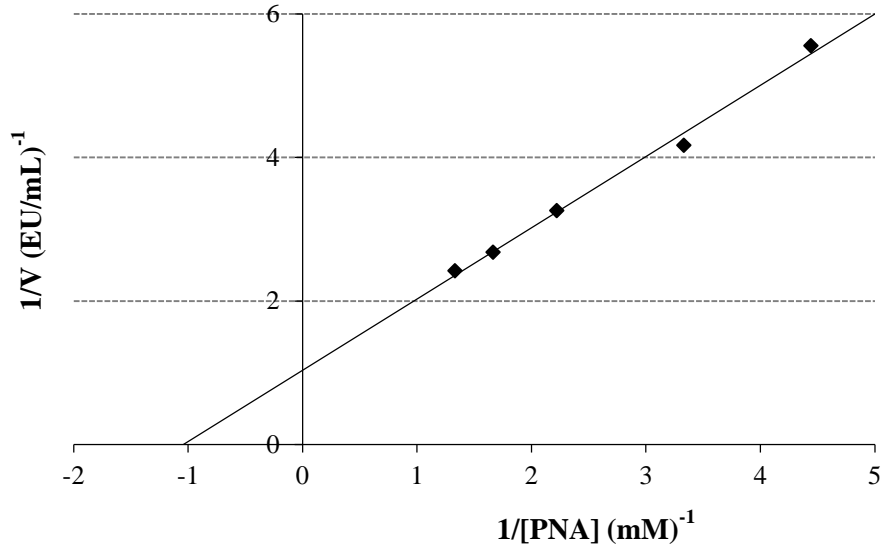
**Çizelge 5.5.** Afinite kromatografi tekniğinden faydalanılarak, insan kanından elde edilen enzim hemolizatından enzim ünitesi, spesifik aktivite ve ayrıca hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı sonuçları

Numune Türü		Aktivite (EU/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		1229,21	25	46,75	1168,75	30730,25	26,29	100	1
Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	hCA I	1691,50	9	0,37	3,33	15223,50	4571,62	49,54	173,90
	hCA II	2800	5,5	0,18	0,99	15400	15555,56	50,11	591,69

Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak, enzim için yapılan kinetik çalışma sonuçlarına göre  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. İnsan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. hCA I izoenzimine ait  $K_m$  0,827 mM ve  $V_{max}$  0,373 EU/mL.dak olarak hesaplandı. hCA II izoenzimine ait  $K_m$  0,956 mM ve  $V_{max}$  0,964 EU/mL.dak olarak hesaplandı (Şekil 5.2 ve 5.3).

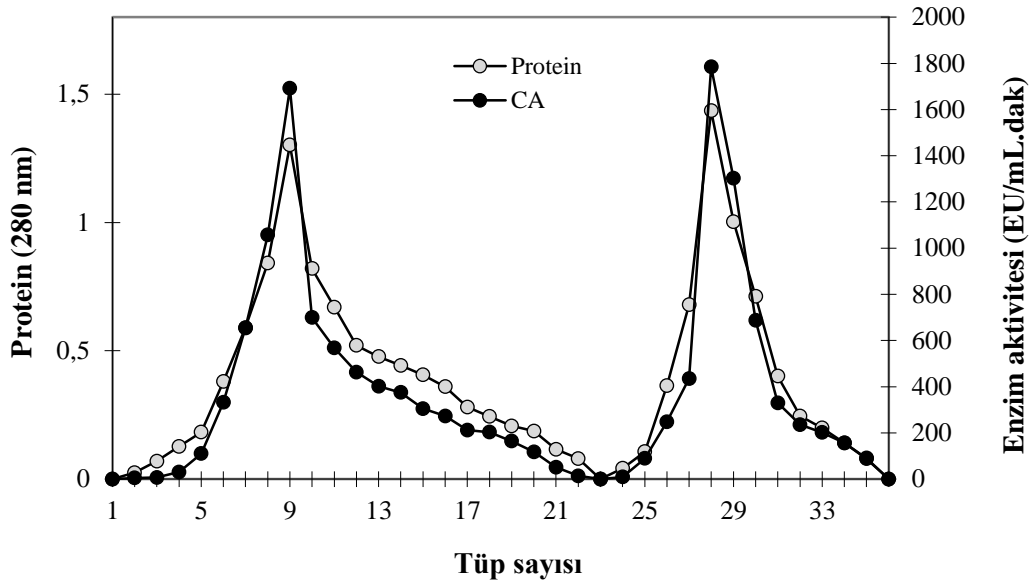


**Şekil 5.2.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 5.3.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Afinite kromatografisi tekniği sayesinde tek kademede yüksek saflıkta enzim saflaştırma işlemleri için oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında, afinite kolonundan eşit hacimlerde elüatlar alınıp, tüm fraksiyonlar için de 280 nm’de absorbansları ölçülerek kalitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntem ile yapılan kalitatif protein tayini prosedürü, proteinin yapısındaki aromatik ve konjuge çift bağlara sahip olan tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans vermesine dayanır (Segel 1968).



**Şekil 5.4.** İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,3 ve 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> pH 5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği

Tez çalışması kapsamında; kalitatif protein tayinlerinin yanında bir de kantitatif protein tayinleri yapıldı. Kantitatif protein tayininde Bradford tarafından geliştirilen Coomassie-Blue yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin diğer protein tayinlerine göre daha çok tercih edilmesinin nedeni de; yöntemin kısa sürede gerçekleştirilmesi, hata payının yüksek olmaması, protein-boya kompleksinin uzun süre korunması ve hassasiyetinin iyi bir değer olarak sayılabilen bir değer olan 1-100 µg arasında olmasıdır (Bradford 1976).

hCA I ve II izoenzimlerinin aktivite tayini işlemleri için çalışma kapsamında iki yöntem kullanıldı. İlk olarak Maren ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemi olarak da bilinen CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesi yöntemini elüsyon grafiği için kullanıldı (Maren 1960). Yöntem; CO<sub>2</sub>'in H<sub>2</sub>O ile reaksiyonu sonucunda meydana gelen H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'in H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarını oluşturacak şekilde ayrışması ile ortamın pH değerini değiştirme süresinin ölçülmesi esasına dayanır. Ayrıca bu yöntem saflaştırma işlemleri sonucu elüatlardaki aktivitelerin belirlenmesi kademesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Tez kapsamında hCA I ve II izoenzimleri için kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesi yöntemidir. Amstrong ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemin esası ise CA'nın ester bağlarını hidrolizleyerek parçalamasına dayanmaktadır (Armstrong *et al.* 1966). CA enzimi, *p*-nitrofenil asetatı, *p*-nitrofenol ve asetik asite hidroliz eder. Oluşan *p*-nitrofenol bileşiği çözelti ortamında sarı bir renk oluşturur ki bu renk şiddetinin ise 348 nm'de absorpsiyonu ölçülmektedir. Amstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemin hassasiyeti Wilbur-Anderson (1948) metoduna göre daha yüksek olduğu için tercih edilmektedir. *p*-Nitrofenil asetat'ın sudaki çözünürlüğü yok denecek kadar az olduğu için ilk olarak 1 mL saf asetonda çözünmesi sağlandı, ardından saf su ile seyreltilerek sulu çözeltisi hazırlanarak çalışmalarda kullanıldı. Organik bir çözücü olan saf asetonun tercih edilmesinin nedeni ise asetonun bu hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden bir çözücü olmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967).

İnhibitör olarak işlev gören bir molekülün inhibisyon etkisinin belirlenmesinde IC<sub>50</sub> değerleri kullanılır. Bu işlem için de taze insan kanından saflaştırılarak elde edilen hCA I ve II izoenzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonlarında esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı. hCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ve tez kapsamında kullanılan fenolik bileşikler için Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan IC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 5.6 ve 5.7'de gösterildi.

**Çizelge 5.6.** hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	9,08	2,11	Yarışmasız	0,9952
<b>Dietilstilbestrol</b>	50,00	3,00	Yarışmasız	0,9970
<b>Enterodiol</b>	14,07	2,74	Yarışmasız	0,9961
<b>Enterolakton</b>	130,00	3,30	Yarışmasız	0,9945
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	17,40	2,81	Yarışmasız	0,9988
<b>Secoisolariciresinol</b>	180,00	2,14	Yarışmasız	0,9994
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	7,74	1,27	Yarışmasız	0,9966

**Çizelge 5.7.** hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ile inhibisyon türleri

İnhibitör	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	r <sup>2</sup>
<b>α-(-) Conidendrin</b>	17,47	2,03	Yarışmasız	0,9912
<b>Dietilstilbestrol</b>	223,60	2,78	Yarışmasız	0,9991
<b>Enterodiol</b>	22,78	2,68	Yarışmasız	0,9995
<b>Enterolakton</b>	26,05	2,63	Yarışmasız	0,9999
<b>Nordihidroguaretik Asit</b>	36,29	2,56	Yarışmasız	0,9977
<b>Secoisolariciresinol</b>	8,96	2,52	Yarışmasız	0,9916
<b>Secoisolariciresinol diglucoside</b>	48,54	1,11	Yarışmasız	0,9992



Daha sonra hCA I ve II izoenzimlerinin  $K_i$  değerlerinin ölçümü için üç farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda denemeler yapıldı. hCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşikler için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.

Gerek glukoma gerekse diyabet hastalığı gibi hCA izoenzimlerinin fonksiyon bozukluğunda ortaya çıkan pek çok hastalıktan dolayı özellikle hCA II ile ilgili birçok inhibisyon çalışması yapılmış ve hali hazırda yapılmaktadır. Doğal kaynaklı fenolik bileşiklerin de glukoma hastalığı başta olmak üzere hCA kaynaklı birçok hastalık için sentezlenebilecek yeni ilaçların sentez tasarımında önemli bir rol oynayacağı şüphesizdir.

**KAYNAKLAR**

- Abuja, P.M., Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4091–4096.
- Ak, T., 2006. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbaba, Y., Akıncioğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 35-42.
- Akıncioğlu, 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.
- Al-Attar A.M. 2011. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18, 63–72.
- Albertazzi, P., Purdie, W.D., 2002. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas*, 173–185.
- Aldridge, W.N, Reiner E., 1969. Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. *Biochemical Journal*, 115, 147-162.
- 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.
- Alles, G.A. and Hawes, R.C., 1940. Cholinesterases in the blood of man. *Journal of Biological Chemistry*, 133, 375-390.
- Alterio, V., Fiore D.A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., 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.
- Altınışik, M., 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A. D. Aydın.
- 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, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Anonim, 2006. Bitkilerde Doğal Renk Maddeleri ve Fenolik Bileşikler. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.
- Anonmyous, 1984. Soymilk in Brief. A Case That Makes Sense. STS Soya Technology Systems Ltd. 11 Dhoby Ghaut 11-06, 0922 Cathay Building Singapore.

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Erça, E., 2006. The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity And Polyphenolic Content Of Some Herbal Teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292–304.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233-1240.
- Arısoy Ağırgöl, B., Yılmaz, U., İşleten, F., Semerci, E., Kutsal, C., 2008. Serum bütirilkolinesteraz aktivitesinin ameliyat öncesi anksiyete ve lipit düzeyleriyle ilişkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33, 9–13.
- Armstrong, J.M., Myers, D.R., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137-5149.
- Arouma, O.I., Cuppett, S.L., 1997. *Antioxidant Methodology-in vivo And in vitro Concepts*. AOCS Press, USA, 141-172.
- Arslan, O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. *Turkish Journal of Medical Sciences.*, 66, 982.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma tedavisinde kullanılmaya aday karbonik anhidrazi inhibitörlerinin sentezi ve inhibisyon etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Atkins, C.A., Patterson, B.D., Graham, D., 1972. Plant carbonic anhydrases. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218-223.
- Augustinsson, K.B., 1971. Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bulletin of the World Health Organization*, 44, 81-89.
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum ialmatei*) and Sorghum product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657.
- Barak, D., Kronman, C., Ordentlich, A., Ariel, N., Bromberg, A., Marcus, D., Lazar, A., Velan, B., Shafferman, A., 1994. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6296-6305.
- Barak, D., Ordentlich, A., Kaplan, D., Barak, R., Mizrahi, D., Kronman, C., Segall, Y., Velan, B., Shafferman, A., 2000. Evidence for P-N bond scission in phosphoroamidate nerve agent adducts of human acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 39, 1156-1161.
- Başer, C.H., 2002. Fonksiyonel Gıdalar Ve Nutrasötikler, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Baysal, T. and Ersus, S., 1999. Karotenoitler ve insan sağlığı. *Gıda*, 24, 177-185.
- Becker, L.B., Vanden Hoek, T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q., Schumacker, P.T., 1999. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology*, 277, 2240- 2246.
- Becker, B., 1954. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, Diamox. *American Journal of Ophthalmology*, 37, 13-15.
- Belgemen, T, Akar, N., 2004. Çinkonun Yaşamsal Fonksiyonları ve Çinko Metabolizması ile İlişkili Genler. *Tıp Fakültesi Mecmuası*, Ankara, 57, 161-166.
- Benzie, I.F.F. and 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., 2014. Biyokimya, Palme Yayıncılık, 1054 s, (Çeviri editörü: Denizli A., Özden A. K.), Ankara.
- 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., 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.
- 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.
- Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A., 1998. Phytoestrogens: where are we now? British Journal of Nutrition, 79, 393-406.
- 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-dihydroxyphenil acetic acid and a-tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. Grasasy Aceites, 49, 34-37.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant deteminations by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200.
- Bodur, E., Neşe Çokuğraş, A., Tezcan, E.F., 2001. Inhibition Effects of Benactyzine and Drofenine on Human Serum Butyrylcholinesterase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 386, 25-29.
- Bodur, E., Yildiz, O., Ozer, N., Cokugras, A.N., 2008. Steady-State Kinetics of Rat Intestinal Butyrylcholinesterase., Turkish Journal of Biochemistry, 33, 41-44.
- Boker, K.L., Schouw, D.T., Grabbee, E.D., Reeters, H.M.P., 2004. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. American Journal of Clinical Nutrition, 79, 282-288.
- 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.
- Bozdag, M., Carta, F., Vullo, D., Akdemir, A., Isik, S., Lanzi, C., Scozzafava, A., Masini, E., Supuran, C.T., 2015. Synthesis of a new series of dithiocarbamates with effective human carbonic anhydrase inhibitory activity and antiglaucoma action. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 23, 2368-2376.
- 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.
- Bramley, P.M., 2000. Is lycopene beneficial to human health ,Review. Phytochemistry. 54, 233-6.
- Brown, J.E., 1999. Nutrition Now. 2nd edition, West/Wadsworth, Belmont.

- Brown, S.S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., Woronick, C.L., 1981. The plasma cholinesterases: a new perspective. *Advances in Clinical Chemistry*, 22, 1-123.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 535–543.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 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., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Büyüktuncer, Z., 2000. Fitoöstrojenlerin menopoz üzerine etkileri. IV. Uluslararası Beslenme Diyetetik Kongresi Bildiriler Kitabı, Kayseri.
- 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 Science*, 4, 337-53.
- Carlson, P., 1992. Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya (Editör:Telefoncu, A.) Kırıkkale. 420.
- Cassidy, A., 2004. Phytoestrogens and women's health. *Women's Health Medicine*, 1, 30-33.
- Caton, P.W., Potheary, M.R., Lees, D.M., Khan, N.Q., Wood, E.G., Shoji, T., Kanda, T., Rull, G., Corder, R., 2010. Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 4008–4113.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilimdalı, 37-38, Yayın No:6:, Ankara.
- Cemeroğlu, B., Yemencioğlu, A., Özkan, M., 2004. Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi, Meyve Sebze İşleme Teknolojisi, Başkent Matbaacılık, 1-174., Meyve Sebze Teknolojisi. 2. Baskı, , Ankara.
- Ceruso, M., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2014. Sulfonamides incorporating fluorine and 1,3,5-triazine moieties are effective inhibitors of three  $\beta$ -class carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 686–689.

- Chatonnet, A. and Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 260, 625-634.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrase-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhstein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible productive criteria for tissue injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90, 1102-1106.
- 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: spesific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 127, 233-242.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I., 2004. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65, 995-1016.
- Coşkun, T., 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84.
- Cuatracases, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059.
- Çapanoğlu, E., Boyacıoğlu, D., 2009. Meyve ve sebzelerin flavonoid içeriği üzerine işlemin etkisi. *Akademik Gıda* 7, 41-46.
- 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. *Archive Der Parmazie*, 345, 323-334.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi 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., Ekinçi, 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* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56, 443-470.
- Daimon, M., Hama, K., Susa, S., Kimura, M., Yamatani, K., Ohnuma, H., Manaka, H., Kato, T., 1998. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 21, 1525-1528.

- Darvesh, S., Macdonald, I.R., Martin, E., 2013. Selectivity of phenothiazine cholinesterase inhibitors for neurotransmitter systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23, 3822-3825.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., 2004. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer's disease. the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 453-478.
- Davies, K., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289.
- Davis, S., Dalais, F., Simpson, E., Murkies, A., 1999. Phytoestrogens In Health And Disease. *Recent Progress in Hormone Research*, 54, 185-211.
- Dawes, H.W., Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwi fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2398-2403.
- Defeng and W., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 27, 4, 277-284.
- 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*, 62, 731-742.
- Demir, H., Turkoglu, V., 2005. Effects of neostigmine methylsulphate on enzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plasma, muscle and liver *in vivo*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animals*, 32, 25-30.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry With Clinical Correlations*. Kanada.
- Di Mambroa, V.M., Azzolini, A., Valim, Y., Fonseca, M., 2003. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 262, 93-99.
- Diplock, A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p. Belgium.
- Diplock, A.T., 1997. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radical Research*, 27, 511-532.
- 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.
- Disilvestro, R.A., 2001. Flavonoids as Antioxidants. In R.E.C. Wildman (ed), *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, USA. New York.
- Dizdaroğlu, M., 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10, 225-242.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S., Waterhouse, A.L., 1998. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1247-1252.
- Dragsted, L.O., Strube, M., Leth, T., 1997. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer?. *European Journal of Cancer Prevention*, 6, 522-528.
- Duthie, A.G., Skinner, J.D., Robinson, T.J., 1989. The Distribution and status of the endangered Riverine Rabbit, *Bunolagus monticularis*. *Biological Conservation*, 47, 195-202.

- Duysen, E.G., Cashman, J.R., Schopfer, L.M., Nachon, F., Masson, P., Lockridge, O., 2012. Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin 55 thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chemico-Biological Interactions*, 195, 189-198.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*, 53, 46-48.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- 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.
- 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.
- 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.
- Erbaş, M., 2006. Yeni Bir Gıda Grubu Olarak Fonksiyonel Gıdalar. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Erbaş, M., Gül, S., Şekerci, H., 2008. Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Diyetisel Antioksidanlar. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- 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.
- Farell, J.M., Barber, M., Krause, D., Litovitz, T.A., 1997. Effects of low frequency electromagnetic fields on the activity of ornithine decarboxylase in developing chicken embryos. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 91-96.
- Fawole, O.A., Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Light, M.E., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2010. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 235-241.
- Feldstein, J.B., Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Fennema, O.R., 1997. *Food Chemistry*. Third Edition, University of Wisconsin-Madison.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, I., Perez-Alvarez, A., Kuri, V., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extract, application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.
- 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.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 66, 137-47.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ Health Perspect*, 87, 245-254.
- Gervais, M.R. and Tufts. B.L., 1999. Carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 123, 343-350.
- Gibson, G.E. and Huang, H.M., 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26, 575-578.
- 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.
- Giovanucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, V.C., 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 1767-1776.
- Godbout, J.P., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2004.  $\alpha$ -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*, 149, 101-109.
- Golberg, G., 2001. Plants: Diet and Health. *British Journal Foundation*, 138-146.
- Göçer, H. and 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. and Gülçin, İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. *Archiv der Pharmazie*, 346, 783-792.
- Gökalp, N., 2006. Doğal antioksidanlar, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H., 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264, 672-686.
- Guus, H.E., Jansen Ilja, C.W., Arts Michel, W.F., Michael Müller, N., Peter, C.H., Jaap Keijer, H., 2005. Uptake and metabolism of enterolactone and enterodiol by human colon epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435, 74-82.

- Gülçin İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s 114, Erzurum.
- 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., 2006a. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, 78, 803-811.
- 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., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- 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, 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., 2004f. *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., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.İ., 2002. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 33, 167-171.
- 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., Topal, F., Çakmıkcı, R., Bilsel, M., Gören, A.C., Erdogan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus L.*). *Journal of Food Science*, 76, C585-C593.
- 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., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006a. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Sehitoglu, M.H., 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., 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. and Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, 685-695.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003a. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum L.*) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004d. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205-215.
- 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., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004a. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata Thunb*) buds and lavender (*Lavandula stoechas L.*). *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Koksall, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., Bingöl, Z., Huyut, Z., Alwasel, S.H., 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 87, 1-5.
- Güven, A., 2000. Importance of Acetylcholinesterase and Its Inhibitors. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6, 145-151, Kars.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42, 569-605.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- Halliwell B. 1999. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 255-259.

- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P., 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*, 2nd edn. Taylor and Francis, London.
- Harborne, J.B., 1994. *The Flavonoids advances in research since 1986*. Chapman and Hall/CRC, p.638, USA.
- 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.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10, 481-490.
- Heinrich, M. and 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.
- Herbert, V., 1997. The value of antioxidant supplements vs their natural counterparts. *Journal of the American Dietetic Association*, 375-376.
- Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57, 43-46.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hudson, B.J.F., 1990. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London and New York, p 1-316.
- Hunaiti, A.A. and Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *The Science of the Total Environment*, 248, 45-50.
- Jabusch, J.R., and Deutsch, H.F., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238, 170-177.
- Jiang, Q., Christen, S., Shigenaga, M.K., Ames, B.N., 2001. Gammatocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 714-722.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., 2006. Bazı üzüksü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. II. Ulusal Üzüksü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312.
- Kasnak, C. and Palamutoğlu, R., 2015. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3, 226-234.
- Kaviarasan, S., Naik, G.H., Ganga Bhagirathi, R., Anuradha, C.V., Priyadarsini, K.I., 2007. *In vitro* studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103, 31-37.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 642 s, Erzurum.
- Keilin, D., Martin, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B., 2002. Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health Review. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 227, 845-51.

- Kitchen, B.J., Masters, C.J., Winzor, D.J., 1973. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase. *Biochemical Journal*, 135, 93.
- Kneepkens, C.M., Lepage, G., Roy, C.C., 1994. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 17, 127–160.
- Koca, N. and Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki Doğal Antioksidan Bileşikler. *Gıda*, 30, 229-236.
- Koellner, G., Kryger, G., Millard, C.B., Silman, I., Sussman, J.L. Steiner, T., 2000. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Journal of Molecular Biology*, 296, 713-735.
- 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.
- Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., 2009. On the *in vitro* antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 395–405.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- La Du, B.N. and Dewald, B., 1970. Genetic regulation of plasma cholinesterase in man. *Advances in Enzyme Regulation*, 9, 317-332.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lakkis, M.M., Bergenheim, N.C.H., Tashian, R.E., 1996. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in E-Coli and demonstration of its CO<sub>2</sub> hydrase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 268-272.
- Layer, P.G., Allebrandt, K., Andermann, P., Bodur, E., Boopathy, R., Bytyqi, A.H., Paraoanu, L.E., 2005. On the multifunctionality of cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 37-41.
- Liang, Y.I. and 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.
- Lichtenthaler, R., Marx, F., Kind, O.M., 2003. Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay. *European Food Research and Technology*, 216, 166–173.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*, 74, 1-20.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquatic Toxicology*, 48, 561-571.
- Lloyd, R.V., Hanna, P.M., Mason, R.P., 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 885-888.

- Lockridge, O., 1990. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacology and Therapeutics*, 47, 35-60.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41, 1814-1818.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046–2056.
- Magalhaes, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2009. Flow injection based method for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta* 77, 1559-1566.
- Magee, J.P. and Rowland, R., 2004. Phytoestrogens, their mechanism of action; current evidence for a role in breast and prostate cancer. *British Journal of Nutrition*, 91, 513–531.
- Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiological Reviews*, 47, 595-781.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126-130.
- Maren, T.H., 1987. Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucoma research. *Drug Development Research*, 10, 255.
- Massie, B.M., Szlachcic, Y., Tabau, J.F., 1993. Scintigraphic and electrocardiographic evidence of silent coronary artery disease in asymptomatic hypertension: a case control study. *Journal of the American College of Cardiology*, 22, 1598-1606.
- Masson, P. and Lockridge, O., 2010. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494, 107-120.
- Masson, P., Fortier, P.L., Albaret, C., Froment, M.T., Bartels, C.F., Lockridge, O., 1997. Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 327, 601-607.
- Masson, P., Froment, M., Bartels, C., Lockridge, O., 1997a. Importance of aspartate-70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 325, 53-61.
- Masson, P., Froment, M.T., Fortier, P.L., Visicchio, J.E., Bartels, C.F., Lockridge, O., 1998. Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1387, 41-52.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.
- Megep, 2006. Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167-1179.

- Miller, D.D., 1996. Mineral. Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, 618-649.
- 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.
- Mukherjee, A., Fryar, A.E., Howell, P.D., 2007. Regional hydrostratigraphy and groundwater flow modeling in the arsenic affected areas of the western Bengal Basin, West Bengal, India. Hydrogeology Journal, 15, 1397-1418.
- Nachmansohn, D., 1952. In Modern Trends in Physiology, Biochemistry. Academic Press, 229 p, New York.
- Nachon, F., Asojo, O.A., Borgstahl, G.E., Masson, P., Lockridge, O., 2005. Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: the crystal structure suggests two alternative mechanisms of aging. Biochemistry, 44, 1154-1162.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Palme yayıncılık, 1152 s, Türkiye.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. 3D structure of Proteins. Principles of Biochemistry, New York, Worth Publishers Inc., 2th Edition., 198-239.
- Neşe, Ç., 2003, Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance. Turkish Journal of Biochemistry, 28, 54-61.
- Neuzil, J., Thomas, S.R., Stocker, R., 1997. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radicalinduced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. Free Radical Biology & Medicine, 22, 57-71.
- Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y., 1985. Oxidation of lipids: VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 58, 1971-1975.
- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y., 1982. Regeneration of vitamin E from a-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. Chemistry Letters, 27, 789-792.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for Lascorbic acid biosynthesis missing in man. Journal of Biological Chemistry, 269, 13685-13688.
- Nishikimi, M., Yagi, K., 1996. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. Subcellular Biochemistry, 25, 17-39.
- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., Nivano, Y., 2005. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53, 714-716.
- Oakeshott, J.G., Van Papeenrecht, E.A., Boyce T.M., Healy, M.J., Russell, R.J., 1993. Evolutionary Genetics of Drosophila Esterases. Genetica, 90, 239- 268.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J., Robin, G.C., 1999. Carboxyl/cholinesterases: A Case Study Of The Evolution Of A Successful Multigene Family. BioEssays, 21, 1031-1042.
- Oktay, K., Polat Kose, L., Şendil, K., Gültekin, M.S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015, The synthesis of (Z)-4-oxo-4-(arylamino)but-2enoic acids derivatives and

- determination of their inhibition properties against human carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 939–945.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of isgın (*Rheum ribes L.*). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047- 3055.
- Oliveira, I., Valentao, P., Lopes, R., Andrade, P.A., Bento, A., Pereira, J.A., 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleraceae L.* leaves and stems. *Microchemical Journal*, 92, 129-134.
- Omura, K., 1995. Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1565–1570.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002b. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122–3128.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özbey, F., Taslimi, P., Gülçin, İ., Maras, A., Göksu, S., Supuran, C.T., 2016. Synthesis of diaryl ethers with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27, 1-7.
- Özcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Sciences*, 68, 487-490.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Palace, P.V., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P.K., 1999. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 746 –761.
- Payzın, S., 2000. Hiper tansiyon ve Damarlar. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji Dergis*, 13, 349-351.
- Pehlivan, M., Güler, M., 2004. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 33, 51- 57.
- Pezzementi, L., Johnson, K., Tsigelny, I., Cotney, J., Manning, E., Barker, A., Merritt, S., 2003. Amino acids defining the acyl pocket of an invertebrate cholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136, 813-832.
- Phillips, D.C., 1996. The Tree-dimensional structure of an enzymes molecule. *Science*, 215, 78.
- Pokorny, J., 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan. H., (ed) Academic Press, 141 p, London.
- Polat Kose, L., Gülçin, İ., Özdemir, H., Atasever, A., Alwasel, S.H., Supuran, C.T., 2015. the effects of some avermectins on bovine carbonic anhydrase enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 773–778.



- 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, 712–21.
- 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*, 19, 433-446.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Prior, R.L., Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.
- 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.
- Puupponen-Pimia, R., Aura, A.M., Oksman-Caldentey, K.M., Mylly Rinen, P., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Poutanen, K., 2002. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in food science and Technology*, 13, 3-11.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87, 955-79.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P., 1993. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32, 12074-12084.
- Ramos, S., 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* 52, 507–526.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reaven, P.D., Khouw, A., Beltz, W.F., Parthasarathy, S., Witztum, J.L., 1993. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb*, 13, 590-600.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 81-86.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790–795.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J.T., 1964. Carbonic Anhydrase, From Human Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 1065-1078.
- Rowland, I., Faughan, M., Hoey, L., Wahala, K., 2003. Bioavailability of phyto-oestrogens. *British Journal of Nutrition*, 89, 45–58.

- Sağiroglu, A. ve Özcan, H.M., 2007. Bitki ekstraktlarındaki flavonoid aglikonlarının tayini. 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., De Pasquale, A., Bonina, F., 1998. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics*, 175, 85–94.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Saleh, E.A., Watkins, S.E., England, J.A., Waldroup, P.W., 1998. Utilization of high-oil corn in broiler diets varying in energy content. *Journal of Applied Poultry Research*, 6, 107-115.
- Scalbert, A., Johnston, I.T., Saltmarsh, M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 215–217.
- Schoneich, C., 1999. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. *Experimental Gerontology*, 34, 19-34.
- Schulz, V., 2003. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trial and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10, 74-79.
- Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2002a. Carbonic anhydrase activators: human isozyme II is strongly activated by oligopeptides incorporating the carboxyterminal sequence of the bicarbonate anion exchanger AE1. *Biorganic Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1177–1180.
- Scozzafava, A., Kalın, P., Supuran, C.T., Gülçin, İ., Alwasel, S.H., 2015a. 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, 941-6.
- Scozzafava, A., Passaponti, M. Supuran, C.T., Gülçin, İ., (2015b). 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, 213 p, New York.
- Setchell, K.D.R., Cassidy, A., 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129, 758–767.
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Borriello, S.P., 1981. Lignan formation in man–microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 2 (8236), 4–7.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shahidi, F., Naczk, M., 1995. *Food phenolics sources chemistry effects applications*. Technomic Publication, 235-277.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 44, 158-163.
- Sherwin, E.R., 1990. *Food Additives*. Ed. by L. Branen,. Marcel Dekker, New York. 139–193.
- Sherwin, E.R., 1972. Antioxidants for food fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 49, 468-472.
- Sies, H. and Stahl, W., 1995. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315–1321.

- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., Kelm, M., 2005. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 304–312.
- Simic, M.G., 1981. Free radical mechanism of autoxidation process. *Journal of Chemical Education*, 58, 125–131.
- 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.
- Slanina, J., Glatz, Z., 2004. Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*, 812, 215–229.
- Sly, S.W. and Hu, Y.P., 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Reviews*, 64, 375-401.
- Soreq, H. and Zakut, H., 1993. Human acetylcholinesterases and anticholinesterases. *The American Society of Human Genetics*, 55, 593-594.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşuğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S., 2007. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102, 764–770.
- St Angelo, A.J., 1996. Lipid oxidation in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 175–224.
- Sujayev, A., Garibov, E., Taslimi, P., Gülçin, İ., Gojayeva, S., Farzaliyev, V., Alwasel, S.H., Supuran, C.T., 2016. Synthesis of some tetrahydropyrimidine-5-carboxylates, determination of their metal chelating effects and inhibition profiles against acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 41, 1-9.
- Sunay, M., 2010. Selenyum ve vitamin E'nin prostat kanseri riski üzerine etkileri. *Türk Uroloji Seminerleri*, 1, 164-167.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12, 217–242.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168–181.
- Supuran, C.T., 2013. Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnological use for CO<sub>2</sub> capture. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, 229–230.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253 (5022), 872-879.
- Şahin, H., Yazıcı, T., 2007. Alzheimer hastalığı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun, Klinik Gelişim Dergisi*, 48- 52, 2007.
- Şanlı, Y. 1988. Veteriner farmakoloji kemoterapotik ilaçlar. *Veteriner Fakültesi Yayınları*, 658- 696.

- Şerbetçi Tohma, H. and Gülçin, İ., 2009. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *International Journal of Food Properties* 13, 657-671.
- Taner, G., 2005. Serbest radikallere karşı antioksidan savunma. *Bilim Teknik*, 113, 453.
- Tee, E.S., 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 103-163.
- Temel, H.E., 2008. Demanslı hastalarda asetilkolin esterase aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolin esterase enzim inhibitörleri ile değişimi. *Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir*.
- Tobin, A.J., 1970. Carbonic anhydrase from parsley leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2656-2666.
- Topal, F., Nar, M., Gocer, H., Kalin, p., Kocyigit, U.M., Gülçin, İ., Alwasel, S.H., 2016. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 674–683.
- Topal, M., Göçer, H., Topal, F., Kalin, P., Polat Köse, L., Gülçin, İ., Çetin Çakmak, K., Küçük, M., Durmaz, L., Gören, A.C., Alwasel, S.H., 2016. Antioxidant, antiradical and anticholinergic properties of cynarin purified from the illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 266–275.
- Tuovinen, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. *Toxicology*, 196, 31–39.
- Tüylü Küçükılınç, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39, 126-131.
- Uçar, E.Ö., Karagöz, A., Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77, 556-560.
- Ünal, G., Gürkan, M.O., 2001. İnsektisitler: Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri. I. Baskı, Ethemoğlu Ofset Matbaacılık, 97-98.
- Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102-103, 649-652.
- Valenzuela, A.B. and Nieto, S.K., 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47, 186–196.
- Van den Berg, G.J. and van Ours, J.C., 1999. Duration dependence and heterogeneity in French youth unemployment durations. *Journal of Population Economics* 12, 273-285.
- Velioğlu, S., 2000. Doğal Antioksidanların İnsan Sağlığına Etkileri. *Gıda*, 25, 167-176.
- 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.
- Wanasundara, U.N. and Shahidi, F., 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63, 335-342.
- Wang, D., Zheng, F., Holmberg, S., Kohlhaw, G.B., 1999. Yeast transcriptional regulator leu3p: Self-Masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of leu3p. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 19017-19024.
- Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 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.

- Wichi, H.P., 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717–723.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-54.
- Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838–849.
- Wilson, I.B. and Nachmansohn, D., 1954. In *Ion Transport Across Membranes*. Academic Press Inc., 35 p, New York.
- Wilson, T., Temple, N.J., 2001. Health benefits of soy isoflavones. *Nutritional Health Strategies for Disease Prevention*, 75-85.
- Wong, L., Radic, Z., Brüggemann, R.J., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P., 2000. Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis. *Biochemistry*, 39, 5750-5757.
- Wright, A., Bubb, W.A., Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2002. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochemistry and Photobiology*, 76, 35-46.
- 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*, 49, 4083-4089.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 64-69.
- Yıldız, Ö., Bodur, E., Çokuğraş, A.N., Özer, N., 2004. The effects of some anti-tumoral drugs on rat intestinal butyrylcholinesterase. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29, 286-289.
- Yoshino, M. and Murakami, K., 1998. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Analytical Biochemistry*, 257, 40-44.
- 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*, 143, 190–194.
- Zhang, Y., Kua, J., McCammon, J.A., 2002. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM Study. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 10572-10577.

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Ağrı Eleşkirt'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini ise İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2008 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Organik kimya Anabilim Dalında yüksek lisans çalışmalarına başladı ve yüksek lisans öğrenimini 2011 yılında tamamladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı ve çalışmalarına halen devam etmektedir.