

**BAZI KUMARİN TÜREVLERİ: ANTIOKSİDAN
KAPASİTELERİ ve İNSAN KARBONİK
ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve II) ile
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Lokman DURMAZ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI KUMARİN TÜREVLERİ: ANTIOKSİDAN
KAPASİTELERİ, İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA I ve II) İLE ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Lokman DURMAZ

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI KUMARİN TÜREVLERİ: ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİ VE İNSAN
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve II) İLE
ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Lokman DURMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 17/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 09/07/2015 tarih ve 27/907 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
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 KUMARİN TÜREVLERİ: ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve II) ile ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Lokman DURMAZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Çalışmanın ilk basamağında Tangeretin, Genistein, Formononetin, Scopoletin, Delphinidin chloride ve Pelargonidin chloride gibi bazı kumarin türevlerinin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi I ve II (hCA I ve II) ile asetilkolin esteraz enzimi (AChE) üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Bu amaçla hCA I ve II izoenzimleri Sepharose-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Enzim saflığını belirlemek için, SDS-PAGE yapıldı ve her bir izoenzim için tek bant gözlemlendi. Ardından kumarin türevlerinin hCA I, II ve AChE üzerine inhibisyon etkileri belirlendi ve IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Ayrıca çalışmamızda IC₅₀ ve K_i değerleri hCA I izoenzimi için sırasıyla 203,88-405,97 µM and 102,10 -969,00 µM aralığında olduğu bulundu. Aynı parametreler hCA II izoenzimi için 96,10-360,75 µM and 36,20 -905,05 µM aralığında hesaplandı. Enzim ile ilgili yapılan çalışmalarda son olarak IC₅₀ ve K_i değerleri AChE enzimi için sırasıyla 890,74-1262,29 mM and 14,60-47,23 µM aralığında olduğu bulundu. Her iki CA izoenzimi için Asetazolamit, AChE enzimi için ise Tacrin standard olarak kullanıldı. Çalışmamızın devamında kumarin türevlerinin antioksidan kapasiteleri belirlendi. Bu amaçla Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi, FRAP metodu ile Fe³⁺ indirgeme kapasitesi, DPPH· giderme, ABTS⁺ giderme, DMPD⁺ giderme, bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe²⁺) şelatlama aktiviteleri ayrı ayrı çalışıldı. Antioksidan çalışmalar için BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks, referans antioksidan bileşikler olarak kullanıldı.

2015, 141 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kumarin türevleri, Antioksidan aktivite, Enzim saflaştırma, Enzim inhibisyonu, Karbonik anhidraz; Asetilkolinesteraz

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

SOME COUMARIN DERIVATIVES: THEIRS ANTIOXIDANT CAPACITIES and INVESTIGATION of THEIR EFFECTS on HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA I and II) AND ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME

Lokman DURMAZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Biyokimya Bilim Dalı

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In the first stage of, the *in vitro* effects of some coumarine derivatives including Tangeretin, Genistein, Formononetin, Scopoletin, Delphinidin chloride and Pelargonidin was determined on human erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and II) and achetylcholine esterase (AChE) were investigated. For this purpose, hCA I, and II isoenzymes were purified from human erythrocytes by Sepharose-4B-L-Thyrosine affinity column chromatography. For determination of the enzyme purity, SDS-PAGE was performed and single band was observed for each isoenzymes. Then, the inhibition effects of coumarine derivatives on hCA I, II and AChE were determined and IC_{50} and K_i values were calculated. Also, in our study, for hCA I isoenzyme, IC_{50} and K_i values were found in range of 203.88-405.97 μ M and 102.10-969.00 μ M, separately. The same parameters were calculated in range of 96.10-360.75 μ M and 36.20-905.05 μ M, for hCA II isoenzyme. Finally, in studies related enzymes, IC_{50} and K_i values for AChE enzyme were determined in range of 890.74-1262.29 mM and 14.60-47.23 μ M separately. For both CA isoenzymes and AChE enzyme Acetazolamide and Tacrine were used as standards. In further work, antioxidant capacities of coumarin derivatives were determined. To this end, the following methods including Fe^{3+} - Fe^{2+} reducing capacity, cupric ion (Cu^{2+}) reduction capacity by CUPRAC method, reducing capacity by FRAP method, ABTS^{•+} scavenging, DPPH[•] scavenging and DMPD^{•+} scavenging activities, ferrous ions (Fe^{2+}) chelating activities using bipyridyl reagents were performed separately. For antioxidant studies, BHA, BHT, α -tocopherol and Trolox were used as the reference antioxidant compounds.

2015, 141 pages

Keywords: Coumarine derivatives, Antioxidant activity, Enzyme Purification, Enzyme Inhibition, Carbonic anhydrase; Acetylcholine esterase

TEŞEKKÜR

Doktora tezim olarak sunduğum bu çalışmamın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakóltemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını bize sağlayan dekanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e ve Kimya 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. şükrü BEYDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışma arkadaşlarım Sayın Uzman Dr. Hülya GÖÇER'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi TOPAL'a, Pınar KALIN'a, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı alışanı bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, saygıdeğer abilerime, ablalarıma, yengelerime ve değerli yeğerlerime özellikle bugünlere ulaşmamda büyük pay sahibi olan canım anneme, yaptığım herşeyde eseri ve desteği olan dayanağım biricik eşim Hediye'ye ve kızım Mükerrerem Elif'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu doktora tezi, rahmetli babacığıma ve akademisyen olmamı çok isteyen rahmetli Tahsin abime de ithaf olunur.

Lokman DURMAZ

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz.....	4
1.3. Esteraz Enzimi.....	7
1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi.....	9
1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri.....	11
1.6. Oksidatif Stres.....	12
1.7. Antioksidanlar.....	17
1.8. Sentetik Antioksidanlar.....	21
1.9. Doğal Antioksidanlar.....	22
1.10. Antioksidanların Etkisi.....	30
1.11. Antioksidan Metotlar.....	32
1.12. Kumarin Türevi Bileşikler.....	33
1.13. Çalışmanın Amacı.....	37
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	38
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal.....	41
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	41
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	41
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	42
3.2. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Kullanılacak Kanın Temini.....	49

3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimleri ile ilgili Safılaştırma	
Çalışmaları	49
3.3.1. CA izoenzim hemolizatının hazırlanması	49
3.3.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile safılaştırılmasıyla ilgili çalışmalar	49
3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini	51
3.4.1. Hidrataz aktivitesi.....	51
3.4.2. Esteraz aktivitesi.....	52
3.4.3. Asetilkolinesteraz aktivitesi tayini	54
3.5. Protein Tayini	55
3.5.1. Kalitatif protein tayini	55
3.5.2. Kantitatif protein tayini	56
3.6. CA İzoenzimleri İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar	56
3.6.1. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	56
3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflılığının Kontrolü	57
3.8. hCA İzoenzimleri Üzerine Kumarin Türevlerinin Etkilerinin Belirlenmesi	57
3.9. Antioksidan Çalışmaları	57
3.9.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi (FRAP metodu)	57
3.9.2. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesi	58
3.9.3. FRAP indirgeme aktivitesi	58
3.9.4. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi	58
3.9.5. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi	59
3.9.6. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi	59
3.9.7. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi	59
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	61
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	61
4.1.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile safılaştırılması sonuçları	62
4.1.3. hCA I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Safılaştırma Basamakları Sonuçları	63

4.1.4. hCA I ve II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları	63
4.1.5. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları	65
4.1.6. hCA I ve II izoenzimleri ve Asetilkolinesteraz enzimi esteraz aktiviteleri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları	66
4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	87
4.2.1. Fe ³⁺ -Fe ²⁺ indirgeme kuvveti bulguları	87
4.2.2. Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular	88
4.2.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları	89
4.2.4. DPPH [·] serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	90
4.2.5. ABTS ^{·+} radikal giderme aktivitesi bulguları	91
4.2.6. DMPD ^{·+} radikal giderme aktivitesi bulguları	93
4.2.7. Bipiridil Metal Şelatlama aktivitesi bulguları	94
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	96
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ	142

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ⁺	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ⁺	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazilradikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)
E	Enzim
EÜ	Enzim Ünitesi
E.C.:	Enzim kod numarası
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
I ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
LOO [•]	Lipit peroksit radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
M	Molar
M _A	Moleküler ağırlık
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
N	Normal
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

PER	Amonyum persülfat
PG	Propil gallat
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/ dakika
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBHQ	<i>tert</i> -Bütilhidrokinon
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim substrat ilişkisi.....	4
Şekil 1.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	6
Şekil 1.3. Asetilkolin reseptörü.....	8
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu	9
Şekil 1.5. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı	10
Şekil 1.6. Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki oksidatif stres durumu	12
Şekil 1.7. Reaktif oksijen ve azot türleri ile serbest olmayan radikal türler	16
Şekil 1.8. Oksidatif stres ve metabolizmaya verdiği hasarlar	17
Şekil 1.9. Kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlar.....	22
Şekil 1.10. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması	24
Şekil 1.11. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması.....	27
Şekil 1.12. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması.....	30
Şekil 1.13. BHT'nin lipit peroksi radikalini giderme mekanizması	31
Şekil 1.14. Metabolizmadaki antioksidan enzimlerin mekanizması.....	32
Şekil 1.15. Bir kumarin türeği olan Genistein'in açık kimyasal yapısı ve fonksiyonel gurupları	34
Şekil 1.16. Tez kapsamında çalışılan kumarin türevlerinin açık kimyasal yapıları.....	36
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	50
Şekil 3.2. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması	53
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	61
Şekil 4.2. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na ₂ HPO ₄ pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH ₃ COO / 0,5 M NaClO ₄ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği ...	62
Şekil 4.3. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	64
Şekil 4.4. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	64
Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı	65

Şekil 4.6. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği.....	66
Şekil 4.7. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	67
Şekil 4.8. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Formononetin grafiği.....	67
Şekil 4.9. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	68
Şekil 4.10. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği.....	68
Şekil 4.11. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	69
Şekil 4.12. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği	69
Şekil 4.13. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	70
Şekil 4.14. Karbonik anhidraz CA-I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scopoletin grafiği	70
Şekil 4.15. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	71
Şekil 4.16. Karbonik anhidraz CA-I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Tangeretin grafiği.....	71

Şekil 4.17. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 4.18. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği.....	73
Şekil 4.19. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	74
Şekil 4.20. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Formononetin grafiği.....	74
Şekil 4.21. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 4.22. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği.....	75
Şekil 4.23. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	76
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği	76
Şekil 4.25. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	77
Şekil 4.26. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scopoletin grafiği	77
Şekil 4.27. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	78

Şekil 4.28. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-Tangeretin grafiği.....	78
Şekil 4.29. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 4.30. Asetilkolinesteraz enziminin asetil kolin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği	80
Şekil 4.31. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.32. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite	81
Şekil 4.33. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	82
Şekil 4.34. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği.....	82
Şekil 4.35. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 4.36. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği.....	83
Şekil 4.37. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.	84
Şekil 4.38. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scopoletin grafiği	84
Şekil 4.39. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	85

Şekil 4.40. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Tangeretin grafiği.....	85
Şekil 4.41. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	86
Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) Kumarin türevlerin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	87
Şekil 4.43. Kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	88
Şekil 4.44. Farklı konsantrasyonlardaki Kumarin türevlerin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	89
Şekil 4.45. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	90
Şekil 4.46. Kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	91
Şekil 4.47. ABTS ⁺⁺ giderme aktivitesi tayinini için hazırlanan standart grafik.....	92
Şekil 4.48. Farklı konsantrasyonlardaki kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) ABTS ⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması	92
Şekil 4.49. DMPD ⁺⁺ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....	93
Şekil 4.50. Kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) konsantrasyonundaki DMPD ⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması	94
Şekil 4.51. Kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) konsantrasyonundaki Bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması	94
Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik mekanizması ve aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna inhibitörlerin bağlanma şekli.....	104
Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	105

Şekil 5.3. hCA II-inhibitör etkileşiminin süperpozisyonu: 4-(1S-3-metilbutil)-3-methoksi-sinamik asit mavi olarak gösterilmiştir. hCA II şerit diyagram olarak temsil edilmiştir. Ayrıca Zn ²⁺ koordinasyonu da gösterilmiştir.....	107
Şekil 5.4. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme	109
Şekil 5.5. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış AChE enziminin aktif merkez oyuğu (Küçükkılınç 2014).....	110
Şekil 5.6. Asetilkolinesteraz enziminin katalitik mekanizması	113
Şekil 5.7. Fe ³⁺ -TPTZ-Fe ³⁺ -TPTZ indirgeme kapasitesi gerçekleştirilen reaksiyonu ...	115
Şekil 5.8. Bir antioksidan tarafından kuprak metoduyla gerçekleştirilen indirgenme reaksiyonu	117
Şekil 5.9. Bipiridil molekülleri tarafından ferröz iyonları şelatlama mekanizması	119
Şekil 5.10. Tangeretinin muhtemel ferröz iyonları (Fe ²⁺) şelatlama mekanizması	119
Şekil 5.11. Bir antioksidan tarafından (AH) DPPH radikalinin giderilme mekanizması.....	121
Şekil 5.12. Konjuge gruplara sahip askorbik asit'in DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon	122
Şekil 5.13. Mono fenoller için muhtemel DPPH· radikali giderme mekanizması.....	122
Şekil 5.14. ABTS'nin K ₂ S ₂ O ₈ ile oksidasyonu sonucu ABTS radikalinin (ABTS ⁺) oluşumu ve antioksidan molekül tarafından tekrar giderilmesi mekanizması.....	123
Şekil 5.15. Kararlı bir radikal olan DMPD ^{•+} 'nin oluşumu ve giderilme mekanizması.....	125

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Doğal ve sentetik antioksidanların avantaj ve dezavantajları.....	19
Çizelge 1.2. Antioksidanların sınıflandırılması	20
Çizelge 1.3. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması	26
Çizelge 1.4. Flavonoidlerin molekül yapıları	28
Çizelge 3.1. hCA I enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği.....	53
Çizelge 3.2. hCA II enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği ...	54
Çizelge 3.3. AChE enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği	55
Çizelge 4.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları.....	63
Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri	72
Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri.....	79
Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri.....	86
Çizelge 4.5. Kumarin türevlerin 20 µg/mL konsantrasyonlarında Fe^{3+} , Cu^{2+} , ve FRAP metotlarına göre indirgeme kuvvetleri ve r^2 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması	90
Çizelge 4.6. Kumarin türevlerin DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ , DMPD \cdot^+ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} ve r^2 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.....	95
Çizelge 5.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları.....	102
Çizelge 5.2. Kumarin türevlerin DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ , DMPD \cdot^+ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} ve r^2 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması	120

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleşir. Enzimlerin katalizör görevi yanında aynı zamanda protein yapılarından dolayı DNA tarafından şifrelenmektedir. Bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenir ve kontrol edilir. Enzim denilen moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır (Küfrevioğlu *et al.* 2007).

Enzimler, olağanüstü katalizörlerdir. Kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklere katalizörler denir. Katalizörler, tepkime hızını aktivasyon enerjisinin düşürülmesiyle artırır. Enzimlerin neden olduğu hız artışları 10^5 - 10^{17} büyüklüğündedir. Karbonik anhidraz enzimiyle oluşturulan hız artışı 10^7 büyüklüğündedir. Karbonik anhidraz enziminin substratları CO_2 ve HCO_3^- 'dir (Lehninger 2005).

Enzimlerin adlandırılmasında geleneksel ve sistematik adlandırma denilen iki adlandırma biçimi vardır. Geleneksel adlandırmada; enzimler için önceleri genel tanıma uymayan, amigdalin, pityalin, zimaz gibi karışık bir isimlendirme kullanılmıştır. Daha sonra enzimler etkili oldukları substratın sonuna -az eki getirilerek (üreaz, amilaz, arginaz, proteaz, lipaz) veya katalizledikleri tepkimeyi tanımlayan (laktat dehidrogenaz, adenilat siklaz) isimler kullanılarak adlandırılmıştır. Sistematik adlandırmada; Uluslararası enzim komisyonu'nun (EC) 1961'deki aldığı karara göre adlandırmalar, enzimin katalizlediği tepkimenin türü ve mekanizmasına göre yapılmaktadır. Tepkimeler ve bu tepkimeleri katalizleyen enzimler altı ana gruba ayrılmıştır. Her

grubun dört ile on üç arasında değişen alt sınıfları bulunmaktadır. Her enzime dört sayı ile belirlenen bir kod numarası verilmiştir. Tepkimenin tipini 1. sayı, vericinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir. EC (Enzim komisyonu). Enzimler, genel olarak altı büyük sınıfta incelenmektedir. Bunlar sırasıyla;

1. Oksidoredüktazlar: Oksidoredüksiyon (redoks veya yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalizlerler. Hidroksilazlar, oksidazlar, peroksidazlar, katalaz, oksijenazlar, redüktazlar ve dehidrogenazlar gibi alt sınıfları vardır. Bu enzimlerin işlevleri sırasıyla; moleküle OH grubu katma, molekülün oksidasyonunu sağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen peroksiti parçalama, moleküle oksijen elementi katma, indirgeme görevi yapma, molekülden H atomu uzaklaştırma görevleri vardır.

2. Transferazlar: Hidrojen dışındaki fonksiyonel bir grubu bir molekülden diğerine aktarmaktadır. Glukozil transferazlar, kinazlar, açıl transferazlar, transaldolaz-transketolazlar, karbontransferazlar, aminotransferazlar gibi çeşitleri transferaz grubu enzim çeşitleridir. Bu enzimlerin işlevleri sırasıyla; karbohidrat, fosfat, açıl grubu, aldehid-ke-ton grubu, karbon atomu, amino grubu transfer ederler.

3. Hidrolazlar: Su katılması ile bağların parçalandığı hidroliz tepkimelerini katalizlemektedir. Fosfatazlar, peptidazlar, ribonükleazlar, glukozidazlar, esterazlar gibi enzim çeşitleri, hidrolaz grubu enzim çeşitleridir. Bu enzimlerin işlevleri sırasıyla; fosfat esterlerini, peptit bağlarını, fosfodiester bağlarını, glikozidik bağlarını, ester bağlarını hidroliz ederler.

4. Liyazlar: Bu gruptaki enzimler, hidrolizden farklı bir mekanizmalarla C-C, C-S ve bazı C-N bağlarının parçalandığı tepkimelerde görev yapmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi de 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. Aldolazlar, dekarboksilazlar, sentazlar, dehidratazlar gibi liyaz grubu enzim çeşitleri vardır. Bu enzimlerin işlevleri sırasıyla; molekülü parçalama, karbondioksit koparma,

iki bileşimin birleşmesi, molekülden su çıkararak çift bağ oluşumu gibi olaylarda görev alırlar.

5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik, optik ve yapısal izomerizasyon tepkimelerini katalizlerler. Rasemazlar - epimerazlar, cis-trans izomerazlar gibi enzim çeşitleri vardır. Bu enzimler sırasıyla; rasem ve epimer oluşumunu, cis-trans izomerlerini oluşumunu sağlarlar.

6. Ligazlar(Sentetazlar): Azot, karbon, oksijen, kükürt ve arasında yeni bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Bu tepkimelerde gerekli enerji, yüksek enerjili bir fosfat bileşiminin hidrolizi ile sağlanmaktadır.

Enzimlerin özellikleri arasında enzimlerin yapısı, aktif merkez, katalitik etki, özgüllük (spesifite), kofaktörler, enzim aktivesinin düzenlenmesi, enzimlerin hücre içi dağılımı, enzim kinetikleri şeklinde 8 başlıkta toplayabiliriz. Bazı RNA yapısındaki enzim benzeri maddeler (ribozimler) dışında, enzimlerin tümü protein yapısındadır. Bu nedenle proteinlere ait tüm yapısal özellikleri göstermektedirler. Enzim molekülü üzerinde substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgeye aktif merkez adı verilmektedir. Bir enzimin aktif merkezinde görev yapan amino asit ve gruplar arasında sisteinin SH grubu (oksidoredüktaz enzimleri), histidinin imidazol grubu, serinin hidroksil grubu (hidrolaz enzimleri), lizinin ϵ - amino grubu (bir primer amin) bulunmaktadır. Birçok enzimin aktif merkezinde değişik amino asitler yer almaktadır. Tripsinde serin ve histidin, laktat dehidrogenazda tirozin, sistein ve histidin, fumarazda metiyonin ve histidin, L-malat dehidrogenazda ise tirozin aktif merkezde görev almaktadır. Aktif merkez için, enzim- substrat bağlanmasını açıklayan iki model ileri sürülmektedir: Anahtar-kilit modeli (Fischer) modelinde substrat ve enzimin aktif bölgelerin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılmaktadır. Uyum oluşturma modelinde de aktif merkez esnek yapıdadır. Proteinin üçüncül yapısında oluşan bir değişiklik ile enzim, substratını katalizlemeye uygun ve en doğru biçimde bağlayacak şekilde biçimsel bir değişikliğe uğramaktadır (Onat *et al* 2006).

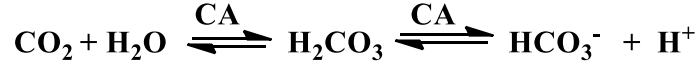


Şekil 1.1. Enzim substrat ilişkisi (Göçer 2014)

Laboratuvar koşullarında glukoz molekülünün CO_2 ve suya dönüşümünün termodinamik açıdan gerçekleşebilmesi için yüksek basınç ve sıcaklık gerekmektedir. Hücre içinde ise aynı tepkime enzimlerin etkisiyle çok kolaylıkla gerçekleşmektedir. Bir maddenin ürüne dönüşümünü hızlandıran enzim, bir dakikada milyonlarca molekülün değişimini sağlamaktadır. Tek bir tepkimeyi katalize etmesi ve bir veya birkaç substrata özgülük göstermesi enzimlerin en önemli özelliklerinden birisidir. Genel olarak enzimler, substrat molekülünün en azından bir kısmına karşı mutlaka optik spesifite göstermektedirler. Etkisini α -glukozidler üzerinde gösteren maltaz, β -glukozidlere etki etmemektedir. Bir enzim, sadece belirli bir kimyasal grup üzerine etkilidir. Glukozidazlar glukozidlere, alkol dehidrogenaz ise sadece alkol üzerine etki etmekte, pepsin ve tripsin peptid bağlarının parçalanmasını katalize etmektedir. Bazı enzimler ise daha ileri grup özgülüğü göstermektedir. Peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli olan kimotripsin, sadece aromatik amino asitlerin oluşturduğu peptid bağlarını parçalamaktadır. Benzer şekilde karboksipeptidaz, proteinin karboksil ucuna yakın olan, aminopeptidazlar ise amino ucuna yakın olan peptid bağlarının yıkımını kataliz etmektedirler (Onat *et al* 2006).

1.2. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA, Karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1), canlıların birçok dokularında mevcut olup bilinen en önemli görevi, metabolizma artışı karbon dioksitin (CO_2)'in ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamaktır.

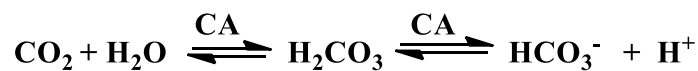


Oluşan H_2CO_3 bir denge reaksiyonu ile hemen HCO_3^- ve H^+ iyonlarına ayrışır. Aynı zamanda oluşan bikarbonat tampon sistemi, omurgalıların en önemli kan ve hücreler arası sıvısı tamponunu oluşturur. CA, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki dengeyi katalize eden metalloenzim ailesinden birisidir (Supuran *et al.* 2001; Boztaş *et al.* 2015).

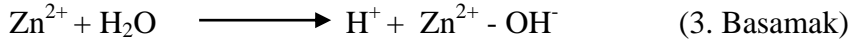
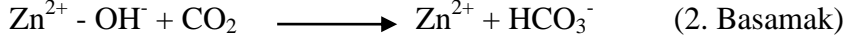
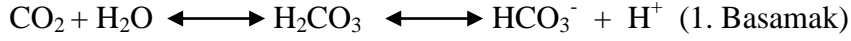
Karbon dioksit aerobik metabolizmanın son ürünüdür. CO_2 , memelilerde kana salınarak akciğerlere taşınır ve solunum yoluyla uzaklaştırılır. Alyuvarlarda bulunduğu süre içerisinde H_2O ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonun ürünü orta derece kuvvetli asit olan ve proton kaybederek bikarbonat iyonuna (HCO_3^-) çevrilen, karbonik asittir. Kataliz yokluğunda dahi bu reaksiyon oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Karbonik anhidrazlar bu hızlı reaksiyonu dahada hızlandıran enzimlerdir (Akbaba *et al.* 2014; Göksu *et al.* 2014).

CA bütün organizmalarda bulunan Zn^{2+} iyon içeren bir metaloenzimdir. CA, 1932 yılında keşfedilmesinin ardından 10 yıl içerisinde Zn^{2+} iyonu içerdiği bulunmuştur. Enzimlerin ihtiva ettikleri metal iyonları kimyasal aktiviteyi artıran birçok özelliğe sahiptirler. Bunlar; kinetik olarak stabil bağ oluşturabilme yeteneklerinin olması, pozitif yüklerinin olması, ve bazı durumlarda birden fazla yükseltgenme halinde kararlı kalabilme özelliğidir. İlk olarak, sıgır eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 'in hidratasyonunu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Göçer ve Gülçin 2013; Arabacı *et al.* 2015).

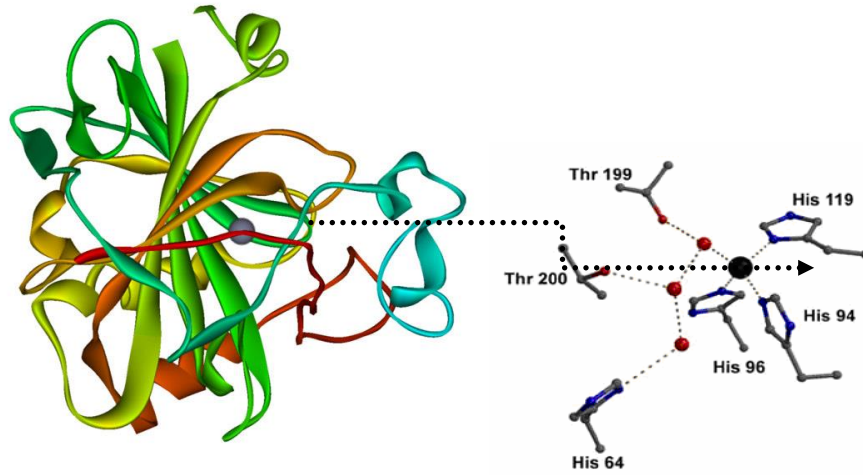
İlk olarak omurgalılarda ve memelilerde daha sonra ise yüksek bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde CA enzimi bulunduğu tespit edilmiştir (Krungrai *et al.* 2001).



Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği tepkimeler, 3 basamaktan oluşur.



1. Basamaktaki olay, CO₂ molekülünün hidratasyonunu göstermektedir.
2. Basamakta da çinkoya bağlı hidroksit iyonunun CO₂'le reaksiyonu gerçekleşmektedir.
3. Basamakta ise çinkoya bağlı su molekülünün iyonlaşması ve proton uzaklaştırılması gerçekleşmektedir (Tripp *et al* 2001).



Şekil 1.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96 ve His 119)

*Büyük küre Zn²⁺ iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir)

CA enzimi, genel olarak metabolik CO₂'in transportunu sağladığı gibi, birçok dokuda da proton (H⁺) ve HCO₃⁻ birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokulara örnek olarak böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi verilebilir. Çalışmalar devam ettikçe sonraki yıllarda enzim, sığır lökositleri, sığır kemiği, balık eritrositleri, insan eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, kaslar, tükürük bezleri, prostat, sinir miyelin kılıfı, pankreas, beyin ve endometrium dokularından, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki

molekül kütlesi yaklaşık 30 KDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Beydemir and Gülçin 2004; Güney *et al.* 2014).

Şimdiye kadar CA enziminin onaltı tane izoenzim tespit edilmiştir (Beydemir and Gülçin 2004). Karbonik anhidraz izoenzimleri yapı, görev ve lokalizasyonlarına göre farklı sınıflara ayrılmıştır. Bu izoenzimlerden beş tanesi sitozolde (CA I, II, III, VII ve XIII), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), bir tanesi mitokondride (V), bir tanesi salgı enzimi (CA VI) ve üç tanesinin de nonkatalitik (CA VIII, X ve XI) olduğu tespit edilmiştir (Beydemir and Gülçin 2004). Canlılarda yaygın olarak bulunan CA enzimi bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır. CA ayrıca bitkilerde fotosentez sırasında önemli görevleri vardır. CA, bitkilerde çoğunlukla kloroplastlarda bulunurken, az miktarda da sitozolde bulunur. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve elektron transport zincirine elektron vericisi olan bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarını sağlamış olur (Topal and Gülçin 2014; Çetinkaya *et al.* 2014).

1.3. Esteraz Enzimi

Esteraz, esterleri bir su molekülü ile kimyasal tepkimeye sokarak onlardan asit ve alkol molekülü üreten, hidrolaz tipi bir enzimdir. Çeşitli esteraz tipleri vardır, bunların biyolojik işlevleri, protein yapıları ve substrat spesifisiteleri farklıdır (Oakeshott *et al.* 1999). Esteraz enzimleri vermiş oldukları reaksiyonlara göre dört ana grupta incelenebilirler bunlar;

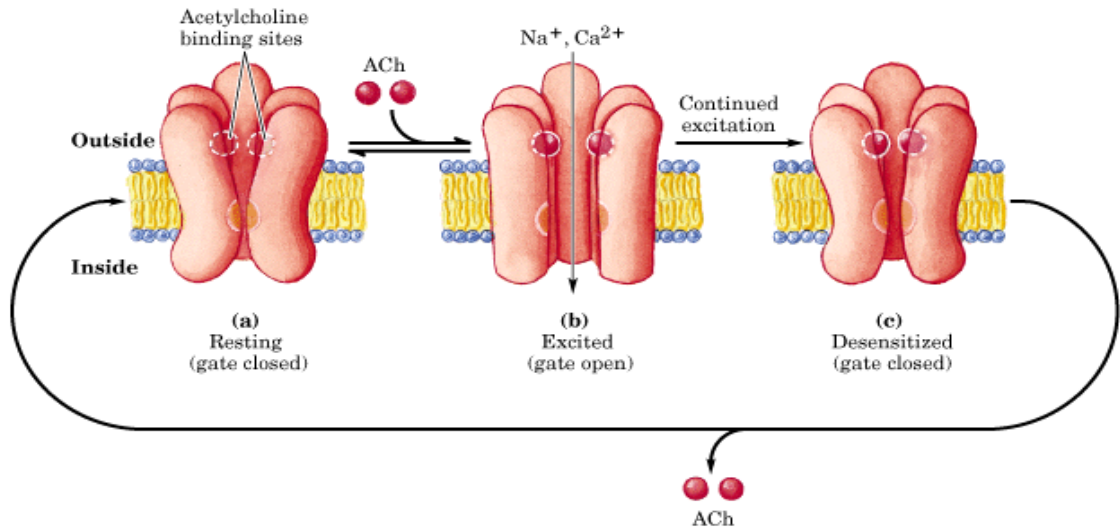
❖ **Aril esterazlar:** Sülfidril grubu taşıyan inhibitörler tarafından inhibe edilirler ve genellikle aromatik substratlar üzerine etkilidirler.

❖ **Karboksil esterazlar:** Organofosfor'lar (OF) tarafından inhibe edilirler ve asetik asitten daha uzun olan alifatik gruplar üzerine etkilidirler.

❖ **Asetil esterazlar:** Hiçbir inhibitörle etkileşmezler ve alifatik substratlar üzerine etkilidirler.

❖ **Kolin esterazlar:** Organofosfatlarca ve esterin sülfat inhibitörleri tarafından inhibe edilirler. Kolin esterleri, alifatik ve aromatik esterleri substrat olarak seçerler.

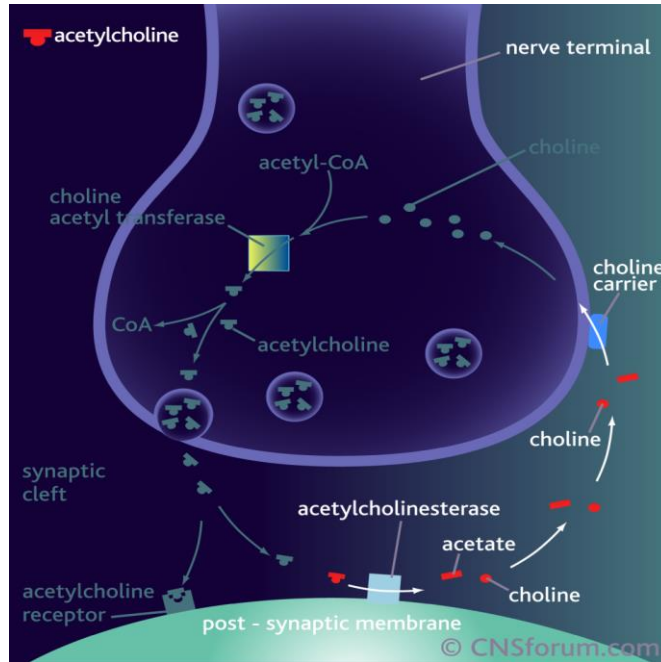
Bu esteraz gruplarından karboksil ve kolin esterazlar organofosfat inhibisyonunda önemlidir. Esterazlara, asetil fonksiyonel gruplarını kesen Asetilesteraz (EC.:3.1.1.6), geniş substrat spesifitesine sahip olan, karaciğer ve kan plazmasında bolca bulunan Kolinesteraz (EC.:3.1.1.8) ve meyve sularını berraklaştırılmasında kullanılan Pektinesteraz (EC.:3.1.1.11), asetilkolin nörotransmitterini etkisizleştiren Asetilkolinesteraz (EC.:3.1.1.7) gibi örnekler verilebilir. Asetilkolin, merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal transmitter (haberci) olup, hücre membranlarında reseptör görevi gören proteinlere bağlanırlar. Asetilkolin reseptörü Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Asetilkolin reseptörü (Lehninger 2005).

1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi

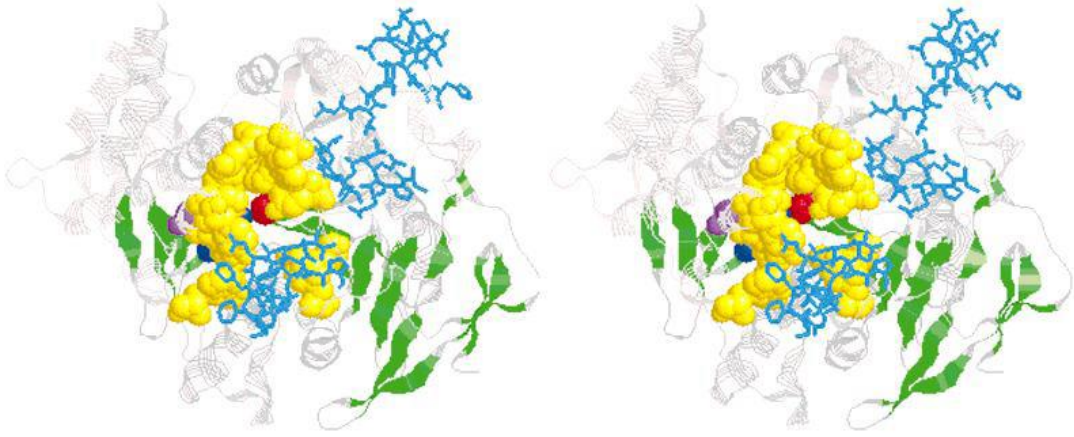
Hayatın her safhasında, enzimlere sürekli olarak ihtiyacımız vardır. Moleküler seviyede binlerce reaksiyon ve metabolik faaliyet enzimler sayesinde gerçekleşmektedir. Her bir enzim canlı için hayati öneme sahiptir. Asetilkolinesteraz (AChE; EC.:3.1.1.7) da bu enzimlerden biridir. Asetilkolinesteraz, sinir ucu önünde biriken kimyasalları süpürerek ortamdaki uzaklaştırır. Bu sayede, elektron taşıyıcıların önü devamlı olarak açılmak suretiyle sinirsel iletim kesintiye uğramadan dengeli bir şekilde gerçekleşir (Göçer *et al.* 2013; Akıncıoğlu *et al.* 2014).



Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu (Katzung 2001)

AChE metabolizmada Asetilkolini (ACh) hidrolizleme işleminin katalizinde görev alan önemli bir enzimdir. ACh, nörotransmitter madde olmakla beraber, biyolojik açıdan oldukça önemlidir. Onun güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur. ACh'in görevi araştırmacılar tarafından sadece sinir uçlarından etkilediği organa ya da sinir ucundan diğer bir sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevinin yanında ayrıca son zamanlarda ACh'nin sinir hücreleri ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın

oluşmasında da görevli olduğu açığa çıkarılmıştır (Carlson 1992). Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunur. Dokularda geniş bir dağılıma sahip olan enzimlerdir. Kolinesterazlar, aynı zamanda hücre farklılaşmasını ve hücre yenilenmesini bunun yanısıra çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese cevap vermede rol üstlenirler (Göçer *et al.* 2013).

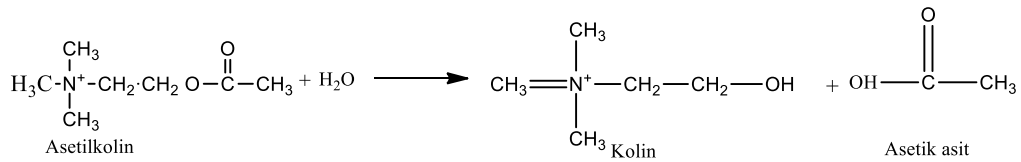


Şekil 1.5. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı (Oakeshott *et al.* 1999)

AChE; katalitik mekanizma ve aktif bölge açısından diğer enzimlerden farklı özelliklere sahiptir. AChE enziminin üç boyutlu yapısı ilk kez Oakeshott ve arkadaşları tarafından detaylı bir şekilde açığa kavuşturulmuştur (1999). Enzim β ve α -heliks tabakalarından oluşur. Ondört aromatik rezidü aktif merkezin çevresinde sıralanmış olup, sarı renk ile gösterilmiştir. Aktif merkezde bulunan Histidin, Glutamat ve Serin amino asitleri katalitik üçlü amino asitleri oluşturmaktadır. Şekil 1.5’de görüldüğü gibi aktif merkezi çevreleyen substrat bağlanma bölgeleri molekülün yüzeyinde mavi renk ile gösterilmiştir (Oakeshott *et al.* 1999).

AChE, 1938 yılında ilk defa elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından saflaştırılmıştır. Asetilkolinesteraz enzimini diğer esterazlardan ayıran özellik asetilkolini hidrolizlemesidir. Bu nedenle AChE olarak adlandırılır (Phillips 1996). AChE’nin aktif bölgesindeki az bir miktardaki protein, düşük konsantrasyondaki substratla dahi tepkimeye girer. Az miktardaki substrat enzimle kolayca reaksiyona girmektedir.

Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıkta en fazla azalma gösteren nörotransmitter ise ACh'dir (David *et al.* 2004). ACh; kolin asetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolinerjik nöronlarda asetilkoenzim A (CoA)'dan gelen asetil ve kolin'in birleştirilmesi ile oluşmaktadır. Asetil CoA glikolizde meydana gelen piruvatın beş farklı metabolik akıbetlerinden birinde oluşan metabolik bir üründür. Kolin ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidlerden elde edilir. Bununla birlikte AChE'nin ACh'yi hidrolizlemesi sonucu tekrar oluşan kolin de elde edilir. Elde edilen kolinin en önemli kaynağı, hidroliz sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. ACh'in sinapstaki miktarı, çokluğu ya da eksikliği ve varlığı, ChAT ve AChE enzimlerine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve nörona sinir uyarısı geldiğinde sinaptik boşluğa dökülür. Sinaptik boşluğa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanırlar. Reseptörlere bağlanamayanlar ise AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilir. Daha sonra reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Göçer, 2014). Genel mekanizma aşağıda verilmektedir.



1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri

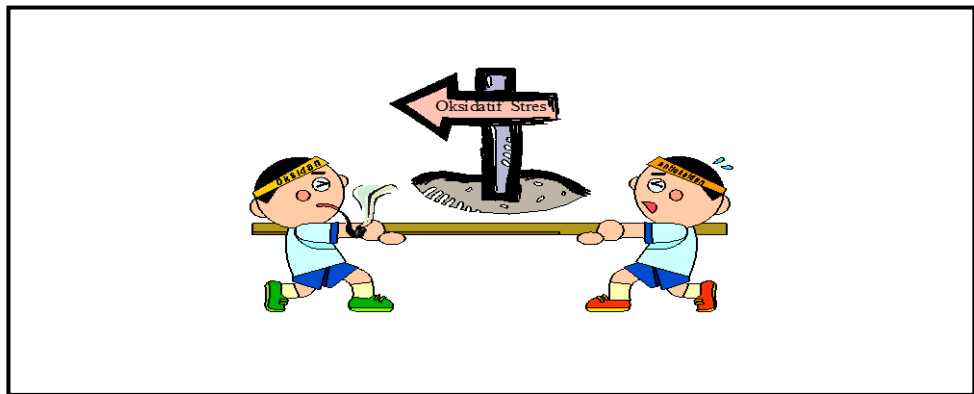
Atomlardaki elektronlar orbital denilen bölgelerde çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelir ve moleküler yapılar oluşur. Atomik ya da moleküler yapılarda ortaklanmamış elektron içeren yapılara "Serbest Radikal" denir. DNA hasarı, protein hasarı, membran hasarı, lipid peroksidasyonu, Aşırı Ca^{2+} girişi, geçirgenliğin artması, hücre şişmesi, mitokondrial hasar durumlar serbest radikallerin hücrel hedefleridir. Kısacası serbest radikaller ortaklanmamış elektrona sahip atom, atom grubu veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Başka moleküller ile çok

kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "Oksidan Moleküller" veya "Reaktif Oksijen Türleri (ROS)" de denilmektedir (Gülçin 2012). Organizmada farklı nedenlerle pek çok türde ROS oluşabilir. Serbest radikaller, protein, yağ ve karbohidratların oksijen ile tepkimeye girerek parçalandığı ve enerji kaynağı ATP'nin üretilme işlemi sırasında oluşur.

ROS, aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri (ETS) ve aktif fagositoz gibi metabolik yollarda devamlı olarak oluşmaktadır (Lichtenthaler *et al.* 2003). Bu süreçlerde oluşan başlıca ROS'lar; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($HO\cdot$), hidroperoksil radikali ($HOO\cdot$), peroksili radikal ($ROO\cdot$), alkoksil radikal ($RO\cdot$) olarak örneklendirilirken, serbest radikal olmayan türler ise hipoklorözait ($OHCl$), peroksinitrit ($ONOO^-$) singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) vs. şeklinde sayılabilir (Gülçin 2012).

1.6. Oksidatif Stres

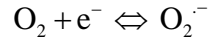
Vücudumuzda bulunan ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve bunun sonucunda moleküller fonksiyonlarını kaybetmektedir. Bu duruma oksidatif stres denir. Başka bir deyişle oksidatif stres, reaktif türler ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan, oksidasyon lehine olan dengesizliği ifade eden bir kavramdır. Oksidatif stres durumu Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



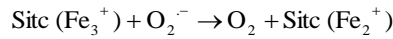
Şekil 1.6. Oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki oksidatif stres durumu (Durmaz 2011). Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde oksidasyon arttığı zaman oluşur.

Bazı radikal türleri ve önemli reaksiyonlar aşağıda verilmektedir. Bunlar:

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur.



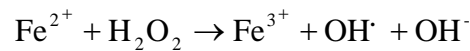
Süperoksit radikali hem yükseltgeyici ve hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin Ferrisitokrom-C ya da Nitroblue Tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur (Parejo *et al.* 2002).



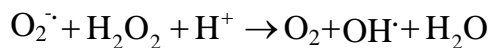
Süperoksit radikali adrenalın oksidasyonunda oksidan gibi görev yapar ve bir elektron alarak hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenir.

Hidroksil radikali (OH^{\cdot}): Moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelmektedir. H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da başka etkilerle OH^{\cdot} radikalini oluştururlar. Serbest radikallerin en zararlısı OH^{\cdot} radikalidir (Gülçin 2012).

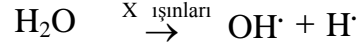
❖ **Fenton reaksiyonu:** H_2O_2 , Fe^{2+} ve diğer geçiş metalleri (Cu, Mn, Cr, Co, Ni, Mo, Zn) varlığında indirgenerek OH^{\cdot} radikali oluşturur.



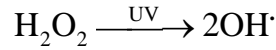
❖ **Haber-Weiss reaksiyonu:** H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek (Fe^{2+} ve Cu^{2+} katalizi ile) hidroksil radikalini oluşturur.



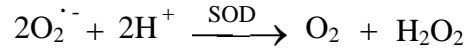
Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalmasıyla da OH \cdot oluşur.



H₂O₂'nin UV ışığına maruz kalması ile de OH \cdot oluşabilir.



❖ **Hidrojen peroksit (H₂O₂):** O₂⁻'e bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da O₂'ye iki elektronun transfer olması ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir.



Bunların yanında Hidrojen peroksitin uzaklaştırılabilmesi vücut için önemlidir. Hücre içindeki hidrojen peroksiti uzaklaştırmak için iki tip enzim mevcuttur. Bunlar katalaz ve peroksidazdır (Miyamoto *et al.* 2003).

Peroksizomlar, çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdır. Peroksizomlardaki oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda H₂O₂ üretirler. H₂O₂'nin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi çok yüksektir. Bundan dolayı peroksizomlardan sitozole ne kadar H₂O₂ geçtiği bilinmemektedir. Oksidasyon; bir atomdan diğerine elektron transferidir. Bu durum, metabolizmamızın ve oksijenli yaşamın temel bir bölümünü gösterir. Oksijen, en iyi elektron alıcısı ve elektron taşıma sisteminde; ATP, enerjinin üretilen şeklidir (Davies 2000). Ortaklanmamış elektron transferinde problemler, artar. Bununla birlikte serbest radikaller, üretilir (Gülçin 2012).

Serbest radikalın oksijen merkezli örnekleri bilinenleri ROS gibi, O₂⁻, HO \cdot , ROO \cdot , Alkoksi (RO \cdot) ve nitrik oksit (NO \cdot)'dir. Reaktif olup, hızla hücrelerin yakınındaki moleküllere saldırırlar. Ve büyük olasılıkla Hidroksi (Yarılanma ömrü 10⁻⁹ s) ve alkolsi

(ikinci yarılanma ömrü) serbest radikalleri; çok zarar verirler. Onlar tarafından sebebiyet verirler. Diğer taraftan; Süper oksit anyonu, lipit hidroperoksitler ve nitrik oksit daha az reaktiftir (Ames *et al.* 1993). Burada ROS radikallerine ilave olarak; Canlı organizmalarda; radikal olmayan diğer ROS' lar vardır. Bunlara örnek olarak singlet ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 ve hipoklorik asit (HOCl) verilebilir (Pietta 2000). ROS, sürekli olarak insan vücudunun normal oksijen kullanımında, solunum ve bazı hücre aracı bağışıklık fonksiyonlarında üretilir (Gülçin 2006a; 2006b).

Serbest bir radikal olarak tanımlanır; kimyasal türleri bağımsız olmaya eğilimlidir. Bir veya daha çok çift olmayan elektrona sahip olmaktadır. Serbest radikaller; yüksek derecede stabil olmayan moleküllerdir. ROS, radikaller ya da çift olmayan en az bir elektron veya reaktif radikal olmayan bileşikler içerirler. Biyomolekülleri yükseltgeyici eğilimlidirler. Bu yüzden burada bulunanlar; oksidanlar ve prooksidanlar olarak adlandırılırlar (Halliwell and Gutteridge 1989; Gülçin 2012).

ROS, normal fizyolojik olaylar esnasında sürekli olarak üretilir. Ve kolaylıkla membran lipitlerinin peroksidasyonunun başlangıcında, lipit peroksitleri biriktirmeye teşkil eden olaylarda üretilir (Elmastaş *et al.* 2006; Gülçin 2010a). ROS'lar; ayrıca nükleik asitler, lipitler, proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi biyomoleküllere zarar verme eğilimindedir. Ayrıca onlar, mutasyonun neden olduğu DNA hasarına sebep olurlar. ROS için hücrel bileşenlerden tarafından etkili süpürme yapılmaz ise; ROS, serbest radikal zincir reaksiyonlarını uyarabilir. Sonradan; proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi hücrel biyomoleküllere zarar verirler. Sonunda onlar, hastalık durumuna neden olurlar (Halliwell and Gutteridge 1990). Bazı reaktif türleri insan vücudunda ya çok az üretilir ya da hiç üretilmez. Bazı reaktif türleri ise dış kaynaklardan alınır. Reaktif oksijen, azot ve serbest olmayan radikal türler Şekil 1.7'de gösterilmiştir.

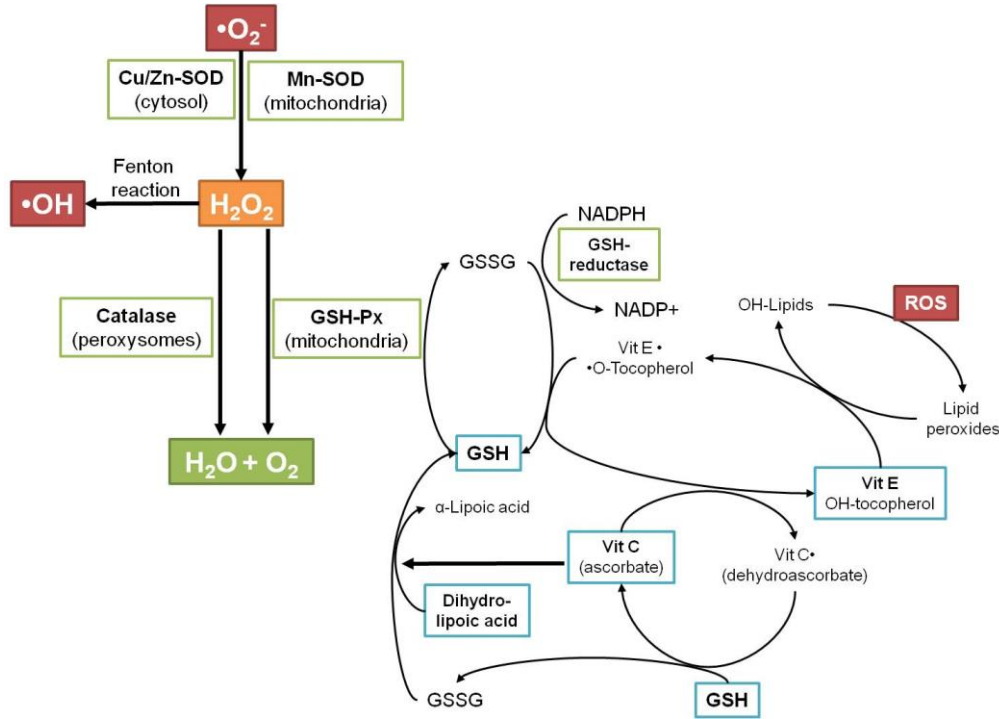
Reaktif Oksijen ve Azot Türleri	Gösterimi	Serbest radikal olmayan Türler	Gösterimi
Protein Radikali	P [·]	Ozon	O ₃
Nitrik Oksit	NO [·]	Singlet Oksijen	¹ O ₂
Peroksil radikali	ROO [·]	Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂
Hidroperoksi radikali	HOO [·]	Peroksinitrit	ONOO ⁻
Lipit radikali	L [·]	Nitroksil Anyonu	NO [·]
Azot dioksit	NO ₂ [·]	Nitril Klorit	NO ₂ Cl
Lipit alkoksil radikali	LO [·]	Nitroz Asit	HNO ₂
Lipit peroksi radikali	LOO [·]	Peroksinitroz asit	ONOOH
Tiyol Radikali	RS [·]	Hipoklorik asit	HOCl
Süperoksit radikali	O ₂ ^{-·}	Nitroz oksit	N ₂ O
Nitrozil Katyonu	NO ⁺	Diazot Trioksit	N ₂ O ₃
Hidroksil radikali	HO [·]	Lipit hidroperoksit	LOOH
Alkoksil	RO	Diazot Tetraoksit	N ₂ O ₄
		Nitronyum katyonu	NO ₂ ⁺
		Alkilperoksi nitritler	ROONO

Şekil 1.7. Reaktif oksijen ve azot türleri ile serbest olmayan radikal türler

Lipit peroksidasyonu, yağların bozulması olayıdır. Lipit peroksidasyonu sonucu başta aldehitler olmak üzere alkol, alkan, hidroksi yağ asitleri gibi pek çok ürün oluşur. Oluşan bu aldehitler oksidatif zararı artırmaktadır. Lipit peroksidasyonu sonucu membranı parçalanan ve stabilitesi bozulan hücreler, akciğer rahatsızlıklarına, böbrek hasarlarına, damar tıkanıklığına, yaşlanmaya ve kansere de sebep olduğu da bilinmektedir (Rice-Evans and Burdon 1993). Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonunda peroksit seviyelerinin belirlenmesinde indikatör olarak kullanılır. Genel olarak idrarda ve kanda tespit edilebildiği için önemlidir.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) ise membranlardan kolayca geçerek DNA hasarına sebep olurlar. Karbohidratlar serbest radikallere karşı yağ asitleri kadar hassas değildir ancak serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir. Serbest radikaller, bazı rahatsızlıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar. Hipertansiyon, Diyabet, koroner kalp hastalığı, romatizma, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Gülçin *et al.* 2006a; Gülçin 2012).

Vücutta oksidanların artması, oksidanların lehine denge bozulmasıyla oksidatif stres ortaya çıkması sonucu vücuda verdiği zararlar Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Oksidatif stres ve metabolizmaya verdiği hasarlar (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernández-Mejía 2013)

1.7. Antioksidanlar

Son zamanlarda; insan sağlığı ve gıda üzerine bitkiden türemiş antioksidanların rolüyle ilgili araştırmalara ilgi artmaktadır. Meyveler, sebzeler, çay, kahve ve kakao dâhil pek çok yiyeceğin ve içeceğin insan sağlığı üzerine faydalı etkilerinin onların antioksidan aktivitelerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu amaçla in vitroda en yaygın metotlar kullanılmış, gıda bileşenlerinin antioksidan kapasitesinin saptanması gösterilmiş ve yeniden incelenmiştir. Çalışılan her bir metodun en önemli avantajları ve eksiklikleri ortaya çıkarıldı. Buradaki metotların; kimyasal prensiplerinin yani ABTS^{•+} radikal giderme, DPPH• radikal giderme, FRAP metodu, CUPRAC metodu, FCR metodu, peroksi radikali giderme metodu, H₂O₂ giderme, hidroksi radikali (OH•) giderme, singlet oksijen (¹O₂) metodu ve nitrik oksit (NO•) giderme gibi analiz metodların taslağı

çıkarıldı. Bu genel içerik gıda, nütrosötikler, endüstriyel diyet tedarikleri için geliştirilen standart antioksidan kapasite metotları için, temel bir açıklama sağlamakla birlikte eleştirel bir şekilde tartışılmaktadır (Gülçin 2012).

Antioksidanlar, gıdalara ilave ettiklerinde doymamış yağların parçalanması sonucu ortaya çıkan kötü koku ve tadın engellendiği yani gıdaların bozulmadığını ortaya koydular. Oksidasyona bağlı olarak gerçekleşen kötü tat ve kokunun oluşmasının engellenmesinde antioksidanların rolü büyüktür. Ancak antioksidanlar oksidan ürünleri ortadan kaldırmaz ya da oksidasyonu tamamen engelleyemezler. Bu maddeler gıdalara ilave edilerek oksidasyon olayını geciktirir ya da kısmen engeller. Bu gelişmeler olurken, diğer taraftan devam eden araştırmalarda, insanların günlük besinlerle aldıkları vitaminlerin bazılarının antioksidan olarak sınıflandırılabileceği anlaşılmıştır (Gülçin 2002).

Endüstriyel işlemlerde gıdaların korunma süresini uzatmak için sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak pek çok araştırmacı uzun süredir besinlerin işlenmesinde kullanılan butillenmiş hidrokstitoluen (BHT), butillenmiş hidrokisianisol (BHA), tersiyer butilhidroksikinon (TBHQ) ve propil galat (PG) gibi sentetik antioksidanların canlı organizmada karsinojenik ve teratojenik etki gösterdiğine dikkat çekmektedir (Gülçin *et al.* 2003; Gülçin 2012).

Tüketiciler genelde doğal antioksidanları sentetik antioksidanlara tercih etmektedir. Bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Sherwin 1990; Wanasundara and Shahidi 1998; Fernandez Lopez 2005; Gülçin *et al.* 2005; 2006a). Bu nedenle uzun süreden beri, gıdaların koku ve tat gibi özelliklerini artırmak için katkı olarak besinlere katılan baharatlar, doğal aromatik bitkiler ve bitkisel kaynaklı antioksidanlar giderek önem kazanmıştır. Çizelge 1.1'de sentetik ve doğal antioksidanların karşılaştırmalı özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Doğal ve sentetik antioksidanların avantaj ve dezavantajları (Gülçin 2012).

Sentetik Antioksidanlar	Doğal Antioksidanlar
• Bazıları adipoz dokuda depolanmaktadır	• Tamamı metabolize olmaktadır
• Güvenirliliği giderek azalmaktadır	• Zararsız ve güvenilirdir
• Geniş uygulama alanına sahiptir	• Kullanım, uygulama alanı artmıştır
• Çözünürlükleri düşüktür	• Çözünürlükleri yüksektir
• Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır	• Bazı ürünlerin kullanımı sınırlıdır
• Bu antioksidanlara ilgi azalmaktadır	• Bu antioksidanlara ilgi artmaktadır
• Ucuzdurlar	• Pahalıdırlar

Serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları erteleyen, inhibe eden, önleyen fakat oksidasyonu tamamen engelleyemeyen maddelere “Antioksidan” adı verilir (Aruoma and Cuppett 1998). Antioksidanlar, reaktif türlerin olumsuz etkilerine karşı koruyucu etki yapan maddeler ve sistemler olarak da bilinir. Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Ou *et al.* 2002a; 2002b). Ayrıca antioksidanları genel olarak vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlar olmak üzere ikiye ayırmak da mümkündür (Halliwell and Gutteridge 1989; Durmaz 2011).

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Bu enzimler, reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinde en önemli enzimlerdir (Fujii *et al.* 2003). SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğu için bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptogloblin, seruloplasmin,

albumin, bilirubin, β -karoten ve α -1 antitripsin sorumludur (Halliwell 1991). Vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşın serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998). Pek çok çalışma, doğal antioksidanların biofonksiyonel ve işlevsellikle yakından ilgili olduğunu gösterir. Örneğin; DNA hasarı gibi kronik hastalıklar, mutagenizasyon, karsinogenez ve patojenik bakterilerin büyümesi sık sık biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin yayılmasının bir sonucudur (Covacci *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2002). Çizelge 1.2'de serbest radikalleri etkisiz hale getiren antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Vücutta Bulunan Antioksidanlar		Besin ve Dış Kaynaklı Antioksidanlar	
Küçük Moleküller	Enzimler	Sentetik Antioksidanlar	Doğal Antioksidanlar
Metal şelatlayıcılar (Ferritin, Seruloplazmin, Hemoglobin, Miyogloblin)	Süperoksit Dismutaz	BHA	Askorbik asit
	Katalaz	BHT	Tokoferoller
	Peroksidazlar	Troloks	Flavonoidler
Askorbik asit	Glutasyon peroksidaz	Propil gallat	Likopen
Melatonin	Glutasyon redüktaz	TBHQ	Karotenler
Glutasyon	Proteazlar		Karotenler
Serotonin	G6FD		Fenolik asitler

Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman hastalıklar oluşur. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve oksidatif stres oluşmasına neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerindeki ve serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarının, yaşlanma sürecinde ve hastalıkların ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Antioksidanlar, serbest radikal hasarına karşı ilk savunma sistemimizdir ve sağlığın korunması açısından kritiktir. Antioksidan ihtiyacı, serbest radikallere maruz kalma oranı arttıkça çok daha kritik hâle gelmektedir. Sigara kullanımı, kirlilik, ilaçlar, stres ve hastalık, serbest radikallere maruz kalma oranını

arttırabilmektedir. Oksidatif strese pek çok faktör etkili olduğu için duyarlılığın bireysel olarak değerlendirilmesi önemlidir (Gülçin 2012).

Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler de hidrojen verici, indirgen ajan, tekli oksijen yakalayıcı ve metal şelatlayıcı etki göstermeleri nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır (Rice-Evans *et al.* 1995). Selenyum, bakır, manganez ve çinko gibi mineraller de antioksidan enzimlerin yapıları ve katalitik aktiviteleri için gereklidir (Diplock 1998). Hücre ve organ sistemlerini ROS'a karşı korumak için insanlarda son derece ileri ve kompleks bir antioksidan koruma sistemi mevcuttur. Bu sistem, ROS ve serbest radikalleri etkisiz hâle getirmek için karşılıklı ve sinerjik olarak çalışan iç ve dış kaynaklı çeşitli bileşenler içerir. Bu bileşenler arasında askorbik asit (C vitamini), tokoferol ve tokotrienoller (E vitamini), karotenoidler ve glutatyon, melatonin ve adrenalin düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşmaktadır (Gülçin 2012).

1.8. Sentetik Antioksidanlar

Günümüzde kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlara birer fenolik bileşik olan BHA, BHT, TBHQ ve Troloks'tur (Gülçin 2012). Bu sentetik antioksidanların gıdalardaki kullanımı ilk olarak 1940'lı yıllarda BHA ve gallik asidin esterlerinin oksidasyonu önlediklerinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin zararlı etkileri sitrik asit, EDTA veya onların türevlerine metal deaktivatör veya şelatlayıcı olarak aktivite gösterdikleri bulunmuştur. 1954'te ABD'de BHT'nin gıdalarda kullanılmasına müsaade edilmiştir. Bundan sonra 1972'de TBHQ ticari olarak kullanılmaya başlamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla sentetik antioksidanların muhtemel karsinojenik etkileri kanıtlanmıştır. Sentetik antioksidanların bu istenmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanım alanları ciddi şekilde sınırlandırılmıştır. Aynı zamanda bu durum büyüyen bir tepkiye neden olmuştur. Günümüzde Japonya ve çok sayıdaki diğer ülkede BHA'nın gıdalarda kullanılması yasaklanmıştır. Bunun yanısıra TBHQ'nun da Kanada, Japonya ve Avrupa ülkelerinde kullanımına izin verilmemektedir. Bu yüzden sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidanların

tirozinden fenilalanin liaz ve tirozin liaz enzimlerinin katalitik etkisiyle meydana gelir. C6-C3 bileşiklerinin malonil koenzim A ile etkileşmesi sonucu şalkonlar oluşur ve akabinde asidik ortamda aromatik halkanın meydana gelmesi ile flavonoidler ve isoflavonoidler oluşur (Shahidi 1997; Larson 1997; Gülçin 2012).

Antioksidan özelliklerle beraber; çeşitli doğal ürünler, fenoller, polifenoller Reaktif Oksijen türlerini söndürmede çok aktiftirler (Görlach *et al.* 2007). Onlar, anti-enflamatuar aktivite veya anti viral, antibakteriyel, antimutajenik, anti- karsinojenik, anti- kanser etkiye sahip olduğu söylenir. Curcumin, resveratrol, dobutamin, kateşin, polifenol gibi bileşikler, güçlü antioksidan özellikleri vardır (Gülçin 2008; Gülçin 2010a).

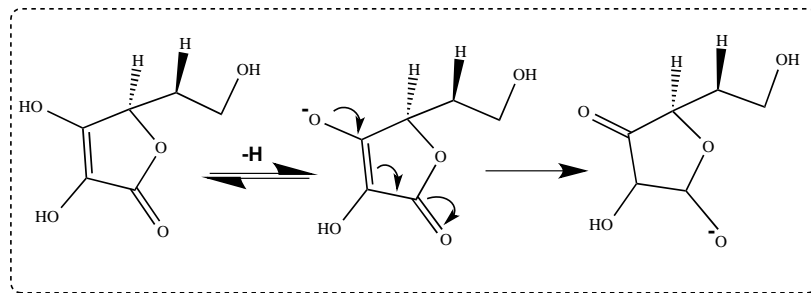
Metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen bileşikler, A vitamini öncülü olan karotenoidler ve fenolik yapılar, lipid peroksidasyon zincirini kıran E vitamini ve analogları gibi diyetle alınan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar, bilirubin, ürik asit gibi *in vivo* şartlarda sentezlenebilen düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerini oluşturmaktadır. Mannitol, Ebselen, Trimetazidin gibi ilaçlar antioksidan etkisi olan ilaçlardır (Gülçin 2012).

C vitamini, askorbik asit olarak da bilinen indirgeyici bir bileşiktir. Yapı itibariyle en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asitinin laktonundan ibarettir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dahil bazı omurgalıların gıdalarında muhakkak alınması gereklidir. Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit, geniş ölçüde bozulur. Diğer suda çözünen vitaminlere göre askorbik asit, hayvansal ve bitkisel dokularda oldukça yüksek konsantrasyonda mevcuttur. İnsan kan plazması, 100 mL'de 1 mg kadar askorbik asit bulundurur. Narenciye ve domates, askorbik asitçe oldukça zengindir. C vitamini kapiler duvarlarının geçirgenliğini azaltır. Eksikliğinde deride kanamalar meydana gelir; devam ederse askorbik asit eksikliğinde ise skorbüt hastalığı meydana gelir. Bu hastalıkta diş etlerinde şiddetli kanamalar olur (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Askorbik asit bitkiler ve birçok memeli tarafından karaciğerde glukozdan sentezlenebilir. Ancak insanda bir sentez yolu mevcut değildir. Askorbik asit bazı enzimlerin kofaktörü olarak kullanılır. Bunlardan en önemli iki tanesi, kollejenin biyosentezinde yer alan prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilazdır. Bu iki enzimde aktif merkezlerinde demir içerir. Askorbik asit ayrıca bakır içeren bir enzim olan dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi içinde gereklidir (Arrigoni and DeTullio 2002). Askorbik asit Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeyebilir. *In vivo* olarak, indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin detoksifikasyonunda yer alır. Hidroksilaz enzimlerinin aktif merkezlerindeki demir ve bakır iyonlarının, hidroksilasyonu gerçekleştirebilmeleri için, indirgenmiş halde bulunmaları gerekir. Bu kofaktör olan askorbik asit tarafından sağlanır (Padayatty *et al.* 2003).

Bir molekülün indirgeme gücü onun antioksidan potansiyelinin bir göstergesidir. Oksidasyona uğrayan moleküller, indirgeme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı askorbik asit tarafından indirgenebilirler. Bu sebeple askorbik asit, bir antioksidan moleküldür (Halliwell and Gutteridge 1989).

Metal iyonları mevcut olmadığı müddetçe askorbik asitin sulu çözeltileri kararlıdır. Metal iyonlarının varlığı, oksijenle askorbik asitin oksidasyonunu katalizler. Askorbik asit bakır katalizli oksidasyonu ise hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşturur. Bu sebeple metal iyonları varlığında askorbik asit kaynaklı bazı olumsuz etkilerinin olması muhtemeldir. Askorbik asit Cu^{2+} karışımları birçok proteini inaktive edebilmektedir. Ayrıca askorbat, hidrojen peroksit varlığında Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgenirken hidroksil radikali oluşumuna sebep olur. (Halliwell and Gutteridge 1989).

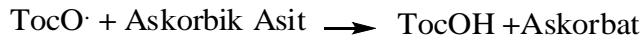
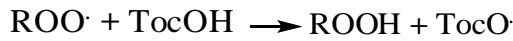


Şekil 1.10. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması

İnsan kan plazması 60 µmol askorbat içerir. Askorbat ROS ile etkileştiğinde dihidro-askorbik asit bileşiği askorbik asite oluşur. Dihidroaskorbatta dihidroaskorbat redüktaz enzimi tarafından geri dönüşümlü olarak askorbik asitte çevrilir. Bu nedenle, sadece dihidroaskorbat ile askorbat düzeyleri karşılaştırıldığında Dihidroaskorbat çok düşük seviyede bulunur. Şekil 1.10'da mekanizması verilmiştir.

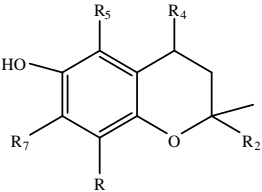
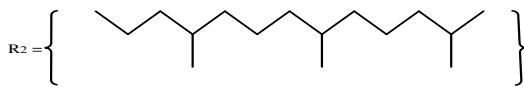
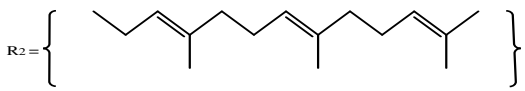
Askorbik asit ROS giderici olarak, O_2^- , $OH\cdot$, H_2O_2 ve 1O_2 karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Sulu çözeltilerde askorbik asit aynı zamanda reaktif azot türlerini de giderme özelliğine sahiptir. Askorbik asidin diyetdeki en önemli kaynakları narenciye, domates, kivi, kiraz, kavun iken ve brokoli, karnabahar, beyaz lahana ve brüksel lahanası gibi sebzeler ve meyvelerdir.

Son zamanlarda, Bursal ve Gülçin tarafından (2011) yapılan bir çalışmada liyofilize edilmiş kivi meyvesinin (*Actinida deliciosa*) 100 g su ekstraktında 105 mg C vitamini olduğu belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, C vitamini tokoferoksil radikalini rejenere ederek tokoferole dönüştürme olduğunu göstermiştir (Gülçin 2012).

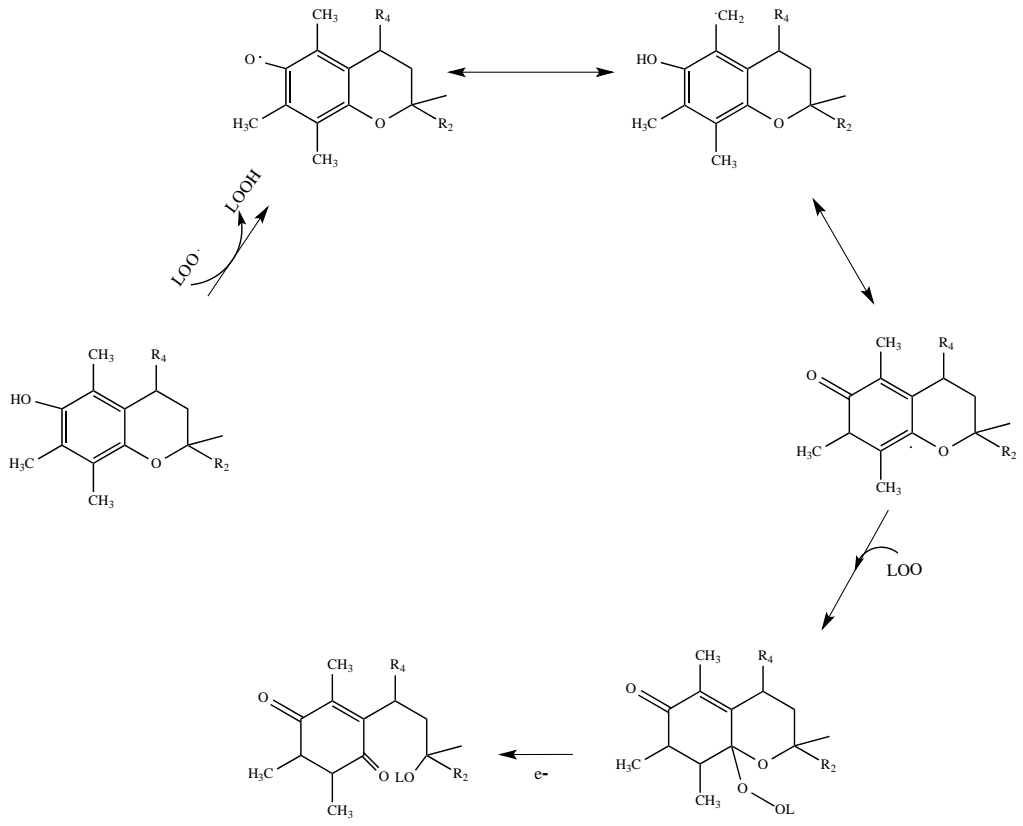


Tokoferoller, E vitamini olarak bilinir (Gülçin *et al.* 2005a; Gülçin 2012). Tokoferoller en yaygın olarak kullanılan antioksidanlar olduğu belirtilmiştir (Pokorny 1988). Tokoferoller, tokoferol ve tokotrienol olarak iki grup halinde sınıflandırılır. Tokoferollerin dört izomeri vardır (α -, β -, γ - ve δ -) ayrı iki grup olarak düşünüldüğünde toplamda sekiz izomeri oluşur. Tokoferoller kadar tokoferollerin lesitin ve askorbik asit ile kombinasyonları büyük miktarlardaki yağların, emülsiyonların ve öteki ürünlerin oksidasyonlarını geciktirmek amacıyla kullanılabilir. Tokoferollerin ve tokotrienollerin sınıflandırılması Çizelge 1.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması

									
Tokoferoller				Tokotrienoller					
									
	R ₄	R ₅	R ₇	R ₂		R ₄	R ₅	R ₇	R ₂
α -Tokoferol:	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃		H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -Tokoferol:	H	CH ₃	H	CH ₃		H	CH ₃	H	CH ₃
γ -Tokoferol:	H	H	CH ₃	CH ₃		H	H	CH ₃	CH ₃
δ -Tokoferol:	H	H	H	CH ₃		H	H	H	CH ₃

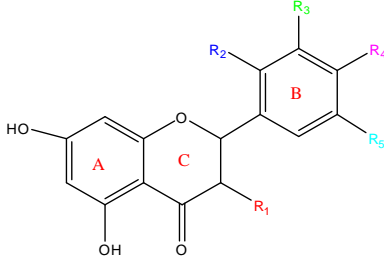
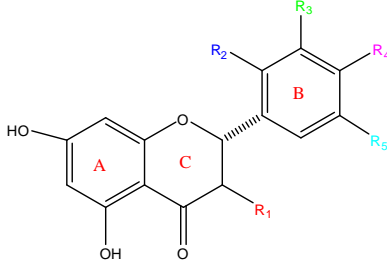
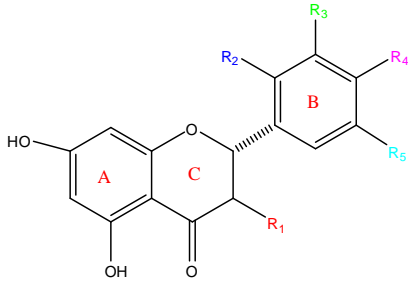
Tokoferoller iz miktarda da olsa bütün gıdalarda bulunur. Bitkisel yağlar, fındık ve kepekli tahıllar, tohumlar gibi gıda kaynakları yüksek konsantrasyonda E Vitamini içerir. En önemli Tokoferol grubu α -Tokoferoldür. Diğer Tokoferol grupları yenilebilir yağlarda daha düşük antioksidan kapasiteye sahiptir. α -Tokoferol yağda çözünebilir bir antioksidan bileşiktir. Buna ek olarak hücre içi etki göstererek lipid peroksidasyonunu azaltırlar. α -Tokoferol yağda çözünebilir hücre içinde ve hücre dışında bulunan bir vitamindir ve hücre membranını oksidasyondan korur (Godbout *et al.* 2004). α -Tokoferol'ün ana kaynağı Avrupa diyetiyken, γ -Tokoferol'ün en yaygın olduğu diyet Amerika diyetidir (Jiang *et al.* 2001). α -Tokoferol yaygın olarak gıda ürünlerine koruyucu olarak ilave edilir. Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.11. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması

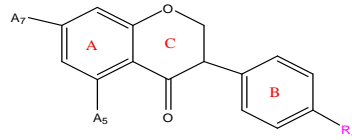
Doğal antioksidanlar fenolik bileşiklerdir, bunların en önemli grupları tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Gülçin 2012). Flavonoidler bitkilerde bulunan ortak bir bileşendir, çeşitli bitki türlerinin yaprak, kök, gövde, tohumlarından izole edilmiş 4000'den fazla flavonoid olmakla beraber toplamda 8000 polifenolik bileşik vardır ki bunların sayısı gün geçtikçe artmaktadır Flavonoidler bitkilerde birer aromatik amino asit olan fenilalanin ve tirozinden ayrıca malonattanda oluşmaktadır (Harborne *et al.* 1999). Genel olarak bahsettiğimiz flavonoidler aslında bir flavan çekirdeğidir ve bu flavan yapısı üç halkalı yapıdan düzenlenmiş 15 karbon içermektedir. Çizelge 1.4'te A, B ve C olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 1.4. Flavonoidlerin molekül yapıları (Gülçin 2012)

		R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	
							
Flavonlar	Apigenin	H	H	H	OH	H	
	Krsin	H	H	H	H	H	
	Luteolin	H	H	OH	OH	H	
Flavanoller	Datisetin	OH	H	OH	OH	H	
	Quersetin	OH	H	OH	OH	H	
	Myrisetin	OH	H	OH	OH	OH	
	Morin	OH	OH	H	OH	H	
	Kaempferol	OH	H	H	OH	H	
							
		R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	
Flavanonlar	Hesperetin	H	H	OH	OCH ₃	H	
	Naringenin	H	H	H	OH	H	
							
		R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	

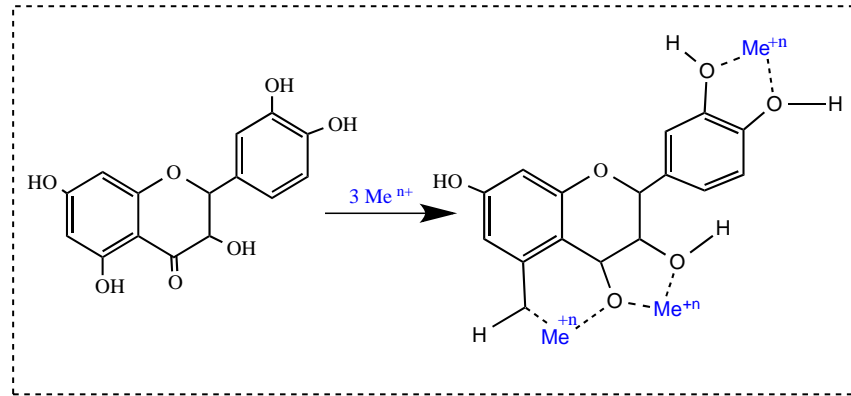
Çizelge 1.4 (devamı)

Flavanonol	Taksifolin	OH	H	OH	OH	H
-------------------	------------	----	---	----	----	---



İzoflavonlar	A₅	A₇	R₄
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	O-Glikozid	OH
Daidzein	H	OH	OH
Daidzin	H	O-Glikozid	OH
Biokanin A	OH	OH	OCH ₃
Formononetin	H	OH	OCH ₃

Flavonoidler çok etkili antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, insan besininin bileşiminde yer alan vazgeçilmez unsurlardır. Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışımdan koruma gibi bir dizi önemli özelliklere sahiptir. Geleneksel tıpta, gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir (Bilaloğlu ve Harmandar). Flavonoidlerin en önemli yararı oksidatif hasara karşı koruması ve bazı çeşitli enzimlerle spesifik etkileşerek aktivitesini arttırmasıdır (Rice Evans and van Acker 1996; Middleton and Kandaswami 1992; Williams *et al.* 2004). Flavonoidler antioksidan kapasitesine sahiptir bunu da özellikle metal şelatlayarak, radikal gidererek yapmaktadır. Şekil 1.12’de flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması verilmiştir (Gülçin 2012).



Şekil 1.12. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması

1.10. Antioksidanların Etkisi

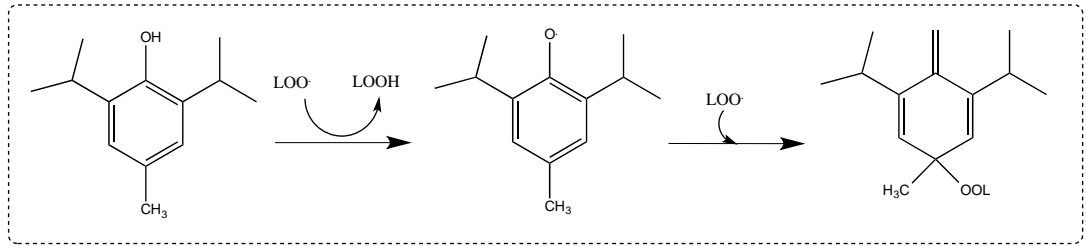
Antioksidan aktivite sergileyen bütün maddelerin etki mekanizması dört şekilde olur.

- ❖ Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılmasını sağlayan onarıcı etkidir.
- ❖ Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme denilen toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.
- ❖ Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme denilen bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoitler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- ❖ Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyen zincir kırıcı etkidir. Mineraller, seruloplazmin ve hemoglobin zincir kırıcı etki gösterirler.

Gıda açısından antioksidanlar acılaşmayı önleyen, tazeliği koruyan ya da gıdanın oksitlenmesini engelleyen maddeler olarak tanımlanır. Antioksidan gıdalar ya da takviyeler besinlerin indüksiyon sürelerini uzatarak acılaşmayı önler ya da geciktirir (Gülçin 2012).

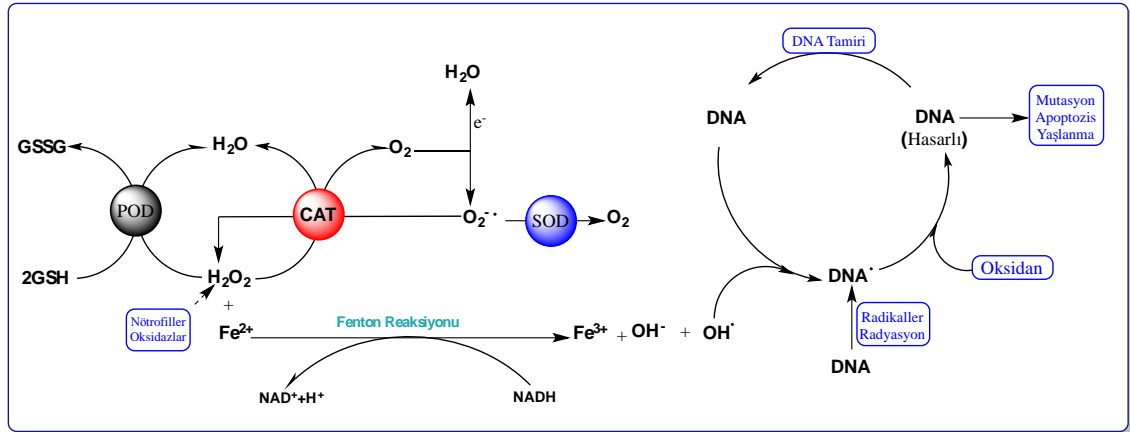
Antioksidanlar genelde serbest radikalleri gidererek oksidasyonu inhibe ederler veya geciktirirler. Bazende antioksidanlar indirek bir mekanizmayla radikali giderir. Böyle

antioksidanlar birincil antioksidan diye tanımlanır. Birincil antioksidanlara α -Tokoferol gibi fenolik bileşikler örnek verilebilirler. Bu antioksidanlar indüksiyon dönemi sırasında tüketilirler. İkincil antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile serbest oksijen radikallerini giderme ve metal şelatlama dahil olmak üzere radikal olmayan oksijen türlerini hidroperoksitlere dönüştürme özelliklerine sahiptir (Gülçin 2012). Antioksidan maddelerin antioksidan kapasiteleri üzerine sadece yapısal özellikleri ve girdiği reaksiyonlar değil aynı zamanda konsantrasyon, sıcaklık, ışık seviyesi, sistemin yüzey özellikleri, fiziksel durum oksidan olarak hareket eden çok sayıda mikro parçalar ve sinerjistler gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Gülçin 2012). Bazı antioksidanlar iyi bir şekilde antioksidan aktivite gösterirken, yüksek sıcaklık ve UV ışınlarının bulunduğu bazı şartlarda zincir reaksiyonları sırasında oksidan etki gösteren serbest radikal oluşturabilmektedir. Şekil 1.13'de BHT'nin lipit peroksidasyonunu önleme mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 1.13. BHT'nin lipit peroksi radikalini giderme mekanizması (Gülçin 2012)

Metabolizmada oksidan-antioksidan gibi dengeli bir sistem mevcuttur. Ancak bu dengede bozulma meydana geldiğinde oksidatif stres oluşumuyla tehlikeler oluşmaya başlar ve bu nedenle dışarıdan antioksidan takviyesi almak son zamanlarda giderek önem kazanmıştır. Şekil 1.14'te vücut savunmasında yer alan antioksidan enzimlerin mekanizması görülmektedir.



Şekil 1.14. Metabolizmadaki antioksidan enzimlerin mekanizması

Antioksidanlar sentetik antioksidanlar ve doğal antioksidanlar olarak sınıflandırmıştık. Sentetik antioksidanların zararlı olabilecekleri düşüncesi insanları daha çok A, C ve E vitaminleri, α -tokoferol, karotenoidler, flavanoidler gibi doğal antioksidanlara yönlendirmiştir (Gülçin 2012). Son zamanlarda, vitaminler ve fenolik bitki kimyasalları gibi doğal antioksidanlara ilginin artması doğaldır; Çünkü bunların oksidatif hasara karşı kimyasal önleyici ajanlar ve fonksiyonları olduğu bilinir (Gülçin 2008).

Bu antioksidanların kapasitelerinin araştırılması çalışmalarında *in vivo* olmasının yanı sıra *in vitro* da devam etmekte ve önemli sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan önemli *in vitro* antioksidan kapasitesi belirleme metodları, oksijen radikali absorblama kapasitesi metodu (ORAC), toplam radikal yakalama antioksidan metodu (TRAP), Fe³⁺ indirgeme metodu, Cu²⁺ indirgeme metodu (KUPRAK), ABTS radikal giderme metodu, DPPH radikal giderme metodu, DMPD radikal giderme metodu, O₂^{•-} giderme metodu ve metal şelatlama metodu örnek olarak gösterilebilir. Bir antioksidanın antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için farklı metotlarla değerlendirilmesi yapılmaktadır.

1.11. Antioksidan Metotlar

Antioksidan aktivitenin ilkesi, serbest radikali nötralize edecek bir elektronun varlığına dayanmaktadır. Ayrıca antioksidan aktivite aromatik halkadaki hidroksilasyon düzeni sayısı ve doğası ile ilişkilidir. Hidrojen verici olarak davranması ve oksidasyonu inhibe

etmesi, fenol halkasındaki OH gruplarının sayısının artmasıyla alakalıdır ve hidroksil gruplarının sayısı artıkça bu durum artar. Fenolik bileşikler, zeytinyağı, meyve, sebze, çay ve bunun gibi bitkilerde yaygın olarak bulunan fitokimyasalların bir grubudur. Son zamanlarda antioksidan özellik sergileyen maddelere ilgi, insan sağlığına yararları, gıda koruma açısından önemi nedeniyle artmaktadır.

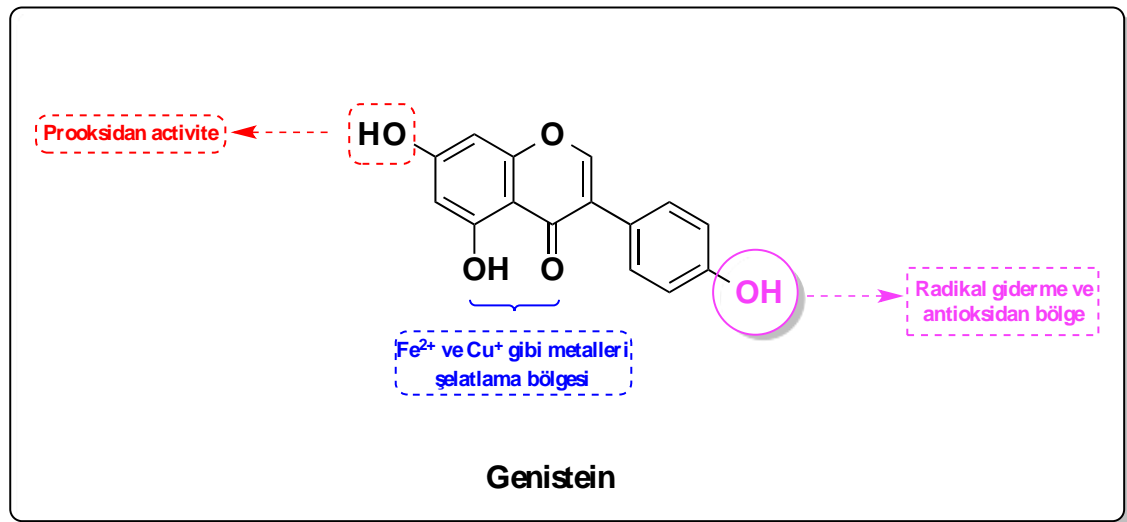
Sonuç olarak antioksidanlar sadece sağlık için değil gıda koruma teknolojisinin de vazgeçilmezleri arasındadır. Son yıllarda antioksidan maddelere artmakta olan ilgi beraberinde, bilim adamlarını daha çok araştırma ve çalışma yapmaya yönlendirmiştir. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan antioksidan metotlar Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, ABTS⁺ giderme, DPPH· giderme, DMPD⁺ giderme aktiviteleri, bipyridil reaktifleri şelatlama aktivite metotlarıdır.

1.12. Kumarin Türevi Bileşikler

Fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Fenolik bileşikler bitkiler âleminde o kadar yaygındır ki hemen her meyve ve sebze az ya da çok miktarda bulunmaktadır (Moure *et al.* 2001). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Kafkas *et al.* 2006). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir. Fenolik asitlerin antioksidan kapasiteleri molekül yapılarıyla ilişkilidir. Benzen halkasına bağlı OH gruplarının ya da diğer grupların pozisyonları son derece önemlidir (Hoult and Paya 1996; Wu *et al.* 2007).

Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan bileşiklerdir, Bitkilerin sekonder metabolitlerindedir. Yasamsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Flavonoidler, genelde diyetlerdeki sebze ve meyveler gibi farklı doğal kaynaklardan elde edilir (Kumar *et al.* 2012). Flavonoidler; sağlıklı, faydalı özellikleri temelde onların

antioksidan ve şelatlama özelliklerinden kaynaklanır. Flavonoidler; ultraviyole radyasyonuna, patojenlere ve bitkilerdeki herbivorlara karşı koruyucu olarak önemli bir rol oynarlar. Onlar, yiyecek üretiminde, kozmetiklerde ve çeşitli hazırlık aşamalarında kullanılır. Flavonoidler; farmakolojik aktiviteden farklı olarak antioksidan, damar genişletici, antikarsinojenik, antienflamatuar, antibakteriyel, bağışıklık uyarıcısı, anti-allergenik, antiviral ve östrojenik aktiviteye sahiptirler (Gadewar *et al.* 2012). Flavonoidlerden biri kumarin türevi olan Genistein'in temel kimyasal yapısı Şekil 1.15'de gösterilmiştir.



Şekil 1.15. Bir kumarin türevi olan Genistein'in açık kimyasal yapısı ve fonksiyonel gurupları

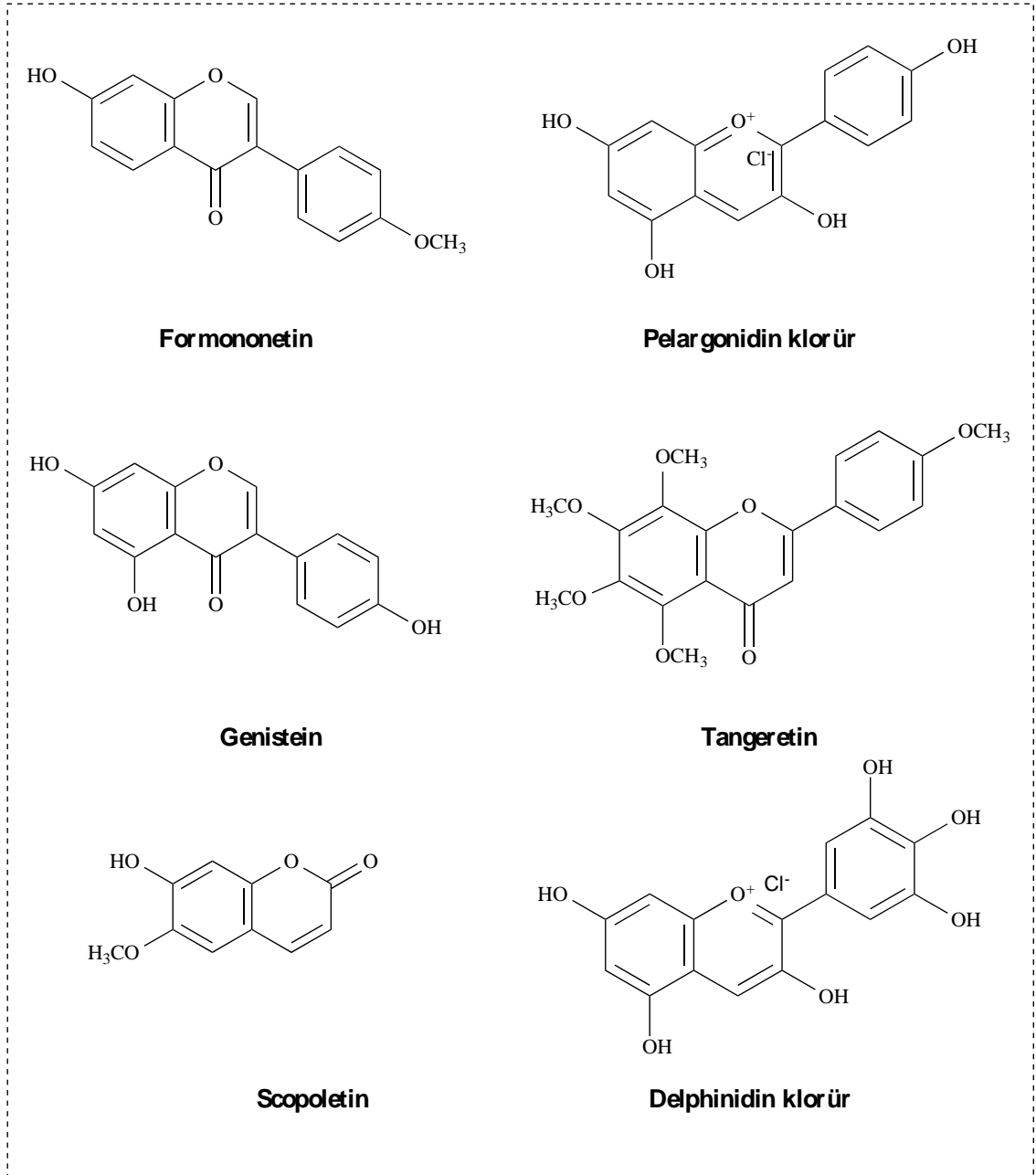
Antosiyaninler; doğal olarak flavonoidlerden oluşur. Günlük diyetle geniş çapta meyve ve sebzelerde bulunur (Habermeier *et al.* 2005). Antosiyaninler; temelde farklı renklere sahiptir. Sebzeler, meyveler, çiçekler ve tahıllardaki kırmızı, mor, mavi gibi renklere sorumludur. Onlar, kanser, diyabet, mutajenez, kanser oluşumu ve kardiyovasküler çeşitli hastalıkları önlemede önemli rol üstlenirler. Antosiyaninler; antioksidan, anti-anjiyogenik ve anti-enflamatuar aktivite gösterir (Shipp *et al.* 2010; Miguel 2011).

Kumarin türevi bileşikler, izoflavonoid sınıfı bileşiklerinden olup; turuncgillerde, sebzelerde, birçok baklagil çeşidinde ve orkidelerde bulunmaktadır. Bu bileşikler bruselloz, yanık, romatizmal hastalıklar ve bazı kanser tedavisinde de kullanılabilen farmakolojik etkiye sahip doğal ürünlerdir. D vitamini, kalsiyum, koenzim Q, kereviz

tohumu yağı, maydanoz yağı, izoflavonlar, lignanlar, proteaz inhibitörleri ve çay polifenolleri gibi doğal ürünler, maydanoz yaprağında bol miktarda bulunan kumarinlere benzer etkiler gösterir. Kumarinler, doğal fenolik bileşiklerin bir grubunu oluşturmaktadır. Sebze, domates, narenciye ve yeşil çay gibi doğal besin ürünlerinde ve pek çok bitkide bulunur. 1300'den fazla kumarin doğal kaynaklardan izole edilmiş ve bazıları laboratuvarında sentezlenmiştir (Egan *et al.* 1990; Hoult and Paya 1996).

Kumarin bileşikleri, son 30 yıl içinde üzerinde oldukça fazla çalışılmış ve yapıları daha iyi aydınlatılmıştır. Fenolik bileşikler temel yapılarında benzen halkası içeren maddelerdir. Fenolik bileşikler, bitkilerde fazla miktarda bulunan sekonder metabolitlerdir. Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Anonymous 1984).

Tez kapsamında çalışılan kumarin türevlerinin açık yapıları Şekil 1.16'da gösterilmektedir.



Şekil 1.16. Tez kapsamında çalışılan kumarin türevlerinin açık kimyasal yapıları

1.13. Çalışmanın Amacı

Bazı fenolik maddelerin besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları da bilinmektedir. Fenolik bileşiklerden izoflavonoid yapısında olan kumarin türevlerinin kimyasal yapılarından dolayı potansiyel olarak antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir.

Bu nedenlerden dolayı kumarin türevlerinin çalışmamızda antioksidan özellikleri araştırıldı. Kumarin türevlerinin çalışmamız kapsamında antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra taze insan kanından saflaştırılacak olan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) üzerinde inhibisyon etkileri ve AcHE üzerine inhibisyon etkileri de araştırıldı. Bu iki enzim metabolizmada oldukça önem arz etmektedir. Her iki enzimde araştırmalarda üzerinde durulması gereken önemli enzimlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Flavonoidler, bitkilerde enzim inhibitörü, antioksidan ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi bir dizi önemli özelliklere sahiptir. Aynı zamanda flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi araştırılarak, eritrosit oluşumunu (eritropoezi) teşvik ettiği ve kanda lökositlerin miktarını artırdığı açıklanmıştır. Flavonoidler, bitkilerin sekonder metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Günümüze kadar bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmektedir. Flavonoidlerin sınıfları içerisinde bulunan Antosiyanidinler grubunda; Cyanidinlerin yanında Delphinidin ve Pelargonidin maddeleri yer almaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 2000). Saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları daha çok hayvan dokularından yapılmıştır. Bitkilerde ise bu konuda son yıllarda çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bitki CA enzimleri ile hayvan CA enzimleri arasında çeşitli farklılıkların olduğu çalışmalar ile tespit edilmiştir (Atkins *et al.* 1972). CA sığır eritrositlerinden saflaştırması ise 1930'lu yılların sonlarında ancak gerçekleştirilebilmiştir. Daha sonraları Martin and Keilin (1944) hCA aktivitesi ile Zn içeriği arasında bağlantı olduğunu belirterek Zn'nun katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Bu şekilde hCA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçti (Bilaloğlu ve Harmandar 2000). Antitrombotik (Yamahara *et al.* 1989 Voora *et al.* 2005) anti enflamatuar (Ozaki *et al.* 1986) antiviral (Aquino *et al.* 1992) anti tümör (Okuyama *et al.* 1990) özelliklerinde olduğu gibi farmakolojik nitelikler dizisi gösterdiğinden dolayı onların popülaritesi artış gösterdi.

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) tanımında antioksidanlar “gıdada yağın acılaşmasını ve renk değişimleri gibi oksidasyon tepkimeleri sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar yağların oksidatif bozulmalarını diğer bir deyişle renk, koku, tat, görünüş ve gıda değeri gibi önemli özelliklerinin kaybolmasını önleyerek gıda kalitesini korumakta ve aynı zamanda bakteri ve küflerin neden olduğu bozulmalara karşı da iyi bir koruyucu olarak görev yapmaktadır. Askorbik asit (AA, E300) ve E vitamini (E306)

doğal antioksidanlar arasında sayılabilirken BHA (E320) ve BHT (E321) ve TBHQ (E319) ise sentetik antioksidanlar olarak sınıflandırılmıştır (Bjelakovic 2007).

Bunun yanında, genel olarak bahsedildiği gibi Asetilkolin gibi nörotransmitter madde miktarındaki azalma yada artmalar çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin asetilkolin'nin çok fazla hidrolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı meydana gelmekte ve bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan ilaçlar aranmakta ve çalışılmaktadır. AChE inhibitörleri olarak kumarin türevleri üzerinde durulmuştur.

Genistein, nörokoruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılır. (Matsuda et al 2015). Doğal olarak soya içerisinde bulunur ve fitoöstrojenleri oluşturur. Bununla birlikte diğer fitoöstrojenlerle de karşılaştırıldığında östrojen reseptörlerine daha yüksek bir afiniteyle bağlanır (Kohara *et al.* 2015).

Tangeretin, turunçgillerin içerisinde bulunur. Aynı zamanda metoksi grupları içeren bir flavondur. Tangeretin, antioksidan etkisinden dolayı birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. (Lakshmi *et al.* 2014).

Formononetin, "*Astragalus membranaceus*" tarafından üretilen bir fitoöstrojendir. Kan artırıcısı ve düzenleyici olarak kullanılır (Huh *et al.* 2011).

Delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin, malvinidin gibi antosiyanidinler, farmakolojik aktivitelerde geniş ölçüde kullanılır. Delphinidin, çiçeğin ve meyvenin epidermal dokusunda temelde mevcut olup, önemli bir antosiyanidindir. Delphinidin; antioksidan, antimutajenik, anti-enflamatuar ve anti-anjiyojenik gibi çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterir (Patel *et al.* 2013).

Flavonoidlerin flavanonlar, flavonlar, flavanoller, izoflavonoidler, antosiyaninler ve flavanlar gibi farklı sınıfları bulunur. Ultraviyole ışığı absorbe edilmelerinden dolayı; DNA hasarına karşı koruyucu etkiye sahiptirler ve kardiovasküler hastalıkların riskini

azaltırlar (Schmitt *et al.* 2001). Tez kapsamında çalışılan kumarin türevlerinin açık yapıları Şekil 1.16'da gösterilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, standart serum albumin, *p*-nitrofenil asetat ve L-tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum asetat, sodyum perklorat, sodyum sülfat, 2-merkaptoetanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, glisin, sülfirik asit, fosforik asit, etanol, metanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, coomassie brillant blue R-250, G-250, N,N'-metilen bisakrilamid ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı laboratuardan sağlanmıştır. Tangeretin, Genistein, Scopoletin, Formononetin, Delphinidin chloride, Pelargonidin chloride ve trikloroasetik asit (TCA), asetilkolinesteraz enzimi, asetilkolin tiyoyodür, aseton, N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), 5,5'Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), riboflavin, neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 3-(2-piridil)- 5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit), α - tokoferol Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV mini -1240
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	: Siemens, Gardırop tipi KA5 6NV40NE
pH metre	: Thermo
Hassas terazi	: Denver Instrument
İnkübatör	: Wiseven
Otomatik pipetler	: Eppendorf ve Socorex
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350

Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: IsoLab LWD-3008 PXOQXV27950
Magnetik karıştırıcı	: Jeio Tech
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanılış yerleri aşağıda belirtilmiştir.

a) İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimlerinin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. 0,15 M Na₂CO₃ / 0,1 M NaHCO₃ pH:10 (CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4g (0,1 mol) NaHCO₃'ın 1 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
2. 0,2 M NaHCO₃, pH:8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
3. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,026 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 L'ye tamamlandı.
4. 25 mM Tris-HCl /0,1M Na₂SO₄, pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

5. 25 mM Na_2HPO_4 / 1 M NaCl , pH: 6,3 (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na_2HPO_4 ve 14,625 g NaCl alınıp, pH: 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
6. 0,1 M CH_3COONa / 0,5 M NaClO_4 , pH: 5,6 (kolona tutunmuş HCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO_4 tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 120mL destile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.
7. 0,05 M Tris-SO_4 , pH: 7,4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 mL destile su içerisinde çözümlenerek, 1 N H_2SO_4 ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
8. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
9. 0,025 M veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbitalin 900 mL suda çözümlenip pH:8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
10. CO_2 çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C 'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO_2 gazı geçirilerek hazırlandı.
11. %0,04'lük Brom Timol Mavisi Çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N'lük NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
12. İndikatör çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,218 g NaHCO_3 ün 1 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

13. Stok fenolik maddelerin çözeltilerinin hazırlanması: 1mg Tangeretin, Genistein, Scopoletin, Delphinidin chloride, Pelargonidin chloride, Formononetin çözeltileri 1 mg/mL olacak şekilde çözücülerinde çözüldü.

- 10 mg Scopoletin 10 mL etanolde çözüldü.
- 1 mg Delphinidin chloride üzerine 1 mL etanolde çözüldü.
- 5 mg Tangeretin, 5 mg Genistein, 5 mg Formononetin ve 5 mg Pelargonidin chloride maddelerinin ayrı ayrı 5 mL etanolde çözüldü.

b) SodyumDodesil Sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

1. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 mL 1M Tris-HCl (pH:6,8) 1 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µL numune tamponundan 50 µL olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edildi.

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

3. Akrlamid-Bisakrlamid çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrlamid karışımı 100 mL suda çözüldü.

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

5. 3 M'lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH 8,8): 36,3 g Tris alındı ve 48 mL 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

6. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS, 90 g saf suda çözüldü.

7. Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.

8. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışım hazırlandı.

c) ABTS⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 2,84 g Na₂HPO₄ 180 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

2. 2 mM'lık ABTS⁺ çözeltisinin hazırlanması: 11 mg ABTS 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3. 2,5 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg K₂O₈S₂ 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

d) DPPH[·] serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

1. 10⁻³ M'lık DPPH[·] çözeltisinin hazırlanması: 40 mg DPPH[·] 100 mL etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

e) DMPD⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık asetat tamponunun hazırlanması (pH 5,3): 2,05 g CH₃COONa 230 mL saf suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 5,3'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M'lık DMPD⁺ çözeltisinin hazırlanması: 210 mg DMPD 10 mL destile suda çözülerek hazırlandı.
3. 0,001 M'lık DMPD⁺ çözeltisinin hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltisinden 1 mL alındı. 100 mL'lik ve 0,1 M'lık (pH: 5,3) asetat tamponuna aktarıldı. Bu çözelti içerisine 0,2 mL ve 0,05 M'lık FeCl₃ ilave edilerek hazırlandı.
4. 0,05 M'lık FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 0,81 g FeCl₃ 100 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

f) Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 5,68 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 mL destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g K₃Fe(CN)₆ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması: 170 mg FeCl₃.6H₂O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

g) Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 8,2 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
2. $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolda çözüldü.
3. 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisinin hazırlanması: 67 mg CuCl_2 alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.

h) FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

1. 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması: 2,46 g NaCH_3COO alındı ve 80 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 40 mM'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 0,334 mL %37'lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. 20 mM'lık FeCl_3 Çözeltisinin Hazırlanması: 0,54 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 100 mL destile suda çözüldü.
4. 10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,312 g TPTZ alındı ve 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.
5. FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 10 hacim 0,3M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20mM'lık $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden oluşur.

i) Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 1,211 g Tris alındı ve 90 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 0,2 M'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 1,60 mL %37'lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. 2 mM'lık FeSO₄ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,028 g FeSO₄.7H₂O alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
4. %0,2'lik Bipiridil Çözeltisinin Hazırlanması: 0,2 g Bipiridil alındı ve 100 mL'lik, 0,2 M'lık HCl çözeltisinde çözüldü.

D) Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 10mM'lık Asetilkolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması: 0.145 g Asetilkolinyodat alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
3. 10mM'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.

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

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

3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) izoenzimleri ile ilgili Saflaştırma Çalışmaları

3.3.1. CA izoenzim hemolizatının hazırlanması

Alınan taze insan eritrositleri hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 10.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklı dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi (Beydemir 1998; Çoban *et al.*2008).

3.3.2. CA enziminin affinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

a) Sepharose-4B-L-tirozin affinite jelinin hazırlanması

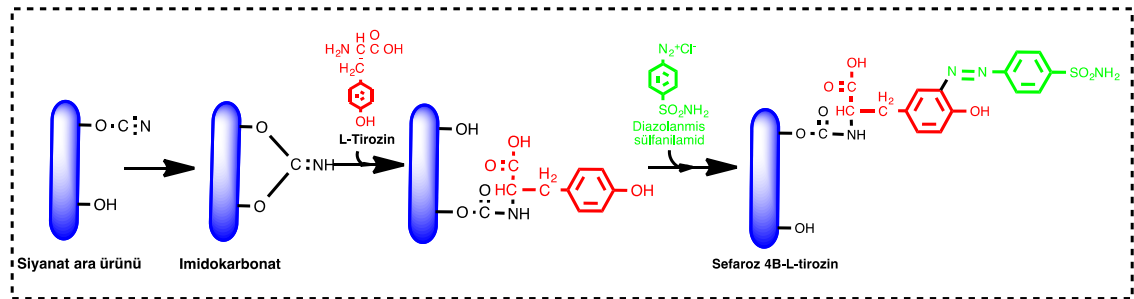
Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamit diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin affinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, affinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

b) CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

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

c) Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterildi (Öztürk Sarıkaya 2009).



Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

d) Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

e) Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

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

3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini**3.4.1. Hidrataz aktivitesi**

Bu amaçla öncelikle hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir. CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 mL veronal tamponu (pH: 8.2, 25 mM), 0,1 mL %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t_o). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre (t_c) bir kronometre vasıtasıyla belirlendi.

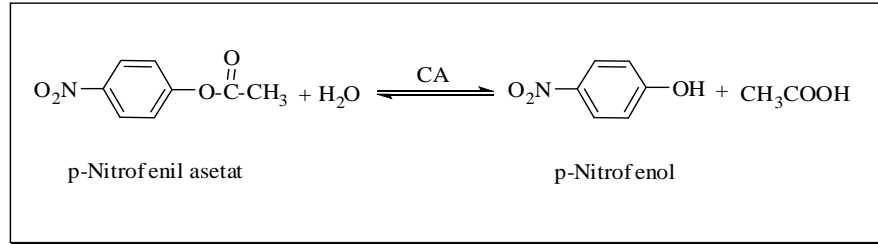
Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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

3.4.2. Esteraz aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.2'de verildiği gibidir.



Şekil 3.2. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm’de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967; Göçer and Gülçin 2013). Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 3 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.1. hCA I enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (μL)	Numune Tüpü
Tris- SO_4 (pH:7.4, 0.5 M)	1400	1400
p-Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	3000

1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin deney yapılan ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı:

Çizelge 3.2. hCA II enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (pH:7.4, 0.05 M)	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sifira ayarlandı. Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.4.3. Asetilkolinesteraz aktivitesi tayini

Asetilkolinesteraz enzimi Ellman ve arkadaşlarının metodlarına göre belirlendi (1961). Bu amaçla Asetiltiyokolin iyodat (AChI) substrat olarak kullanıldı. Öncelikle, 100 mL Tris/HCl tampon çözeltisine (1 M, pH 8.0) yılan balığından (*Electrophorus electricus*) saflaştırılmış 50 mL AChE enzimi ilave edildi ve karışım 10 dakika boyunca 25°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 50 mL of DTNB (0.5 mM) ilave edildi. Reaksiyon 50 mL AChI (10 mM) ilavesiyle başlatıldı. Substratların hidrolizi ve daha sonra

DTNB'nin tiyokolin ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu 412 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir (Göçer *et al.* 2015).

1 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin deney yapılan ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı:

Çizelge 3.3. AChE enziminin esteraz aktivitesiyle yapılan çalışmanın küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris/HCl (pH:8.0, 1.0 M)	100	100
AChE	-	30
DTNB	50	50
Saf su	800	770
AChI	50	50
Toplam hacim	1000	1000

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.5.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilisi ve hemolizattaki protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlendi (1976). Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanması, kompleks oluşması ve oluşan bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Proteine-boya kompleksinin oluşması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlanarak 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırdı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu.

Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.6. CA İzoenzimleri İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.6.1. K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

İnsan kanından saflaştırılan hCA izoenziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az beş farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü

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

3.8. hCA İzoenzimleri Üzerine Kumarin Türevlerinin Etkilerinin Belirlenmesi

Kumarin türevlerinin, saflaştırılacak olan hCA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hem esteraz hem de hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

3.9. Antioksidan Çalışmaları

3.9.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi (FRAP metodu)

İndirgeme kuvveti tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmiş şekline göre yapıldı (Gülçin 2009). Bunun için öncelikle 1mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözülden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere aktarıldı, hacim destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH:6,6) ve 2,5 mL %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ ilave edilerek karışım $50^{\circ}C$ 'de 20 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL $FeCl_3$ (%0,1) ilave edildikten sonra absorbans 700 nm 'de köre karşı okundu. Köre olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

3.9.2. Cu²⁺-Cu⁺ indirgeme kapasitesi

Fenolik yapıdaki bileşiklerin Cu²⁺ indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2007) hafif bir modifikasyonu ile yapıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşik tüplerine 0,25 mL CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M) ve 0,25 mL CH₃COONH₄ tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

3.9.3. FRAP indirgeme aktivitesi

Total antioksidan için hazırlanan stok çözelti bu deneyde de kullanılır. Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde kumarin türevleri ve standart çözeltiler aktarılır. Hacimleri 0,5 mL'ye tampon çözelti ile tamamlanır. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µL, 20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi ve 2250 µL FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 mL'ye tamamlanır. Deney tüpleri Vortex'de karıştırılır ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbansları kaydedilir. Kör olarak asetat tamponu kullanılır (Gülçin 2012).

3.9.4. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi

Fe²⁺ şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı. Bu amaçla deney tüplerine 0,25 mL FeSO₄ çözeltisi (2 mM) aktarıldı. Bu çözeltinin üzerine 0,12 mL kumarin türevleri veya standart çözelti ilave edildi. Daha sonra sırasıyla 1 mL Tris-HCl tamponu (pH: 7,4) ve HCl (0,2 M) içerisinde çözünmüş 1,5 mL'lık bipiridil çözeltisi (%0,2) ilave edildi. 2,5 mL etanol ve 0,63 mL saf su içeren numunenin absorbansı 522 nm de ölçüldü. Kör olarak Tris-HCl tamponu kullanıldı. Kontrol olarak da numune yerine Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı.

3.9.5. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (Blois 1958). Serbest radikal olarak DPPH[•]'in 10⁻³M'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıya 10 ve 20 µg/µL konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 mL olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir nümune tüpüne stok DPPH[•]çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH[•] çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH[•] çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

3.9.6. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi. Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilere 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 0,700±0,025 nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılan kumarin türevlerin farklı konsantrasyonlarına (10-20 µg/ml) birer mL ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar kaydedildi.

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

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

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

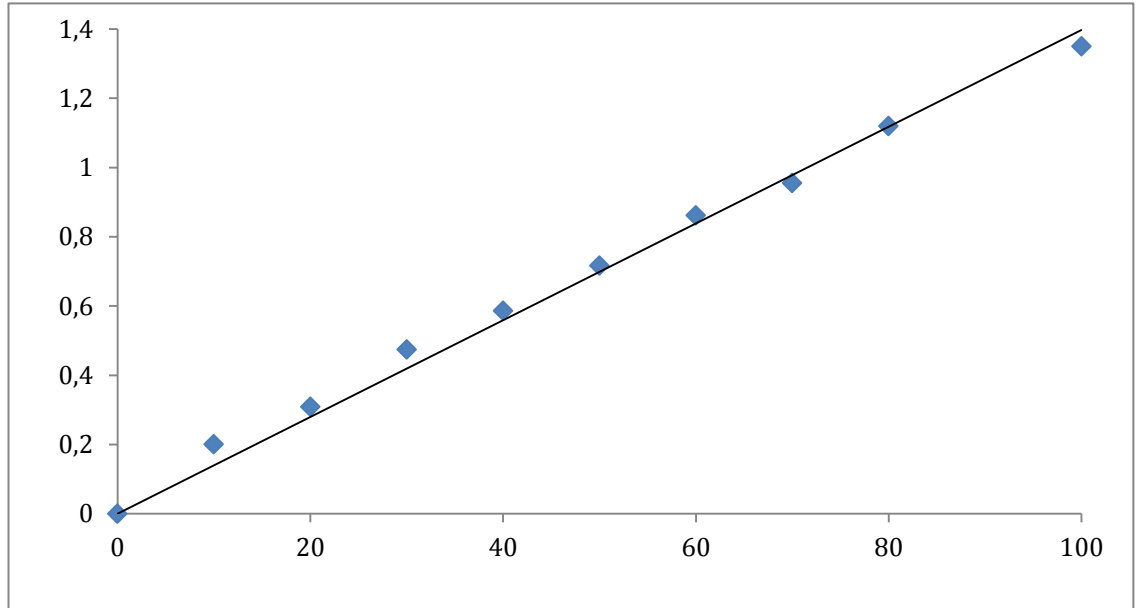
Kumarin türevlerinin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10–20 µg/mL) deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 0,5 mL ye tamamlandı. Bunun üzerine 1 mL DMPD^{•+} çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorbans değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

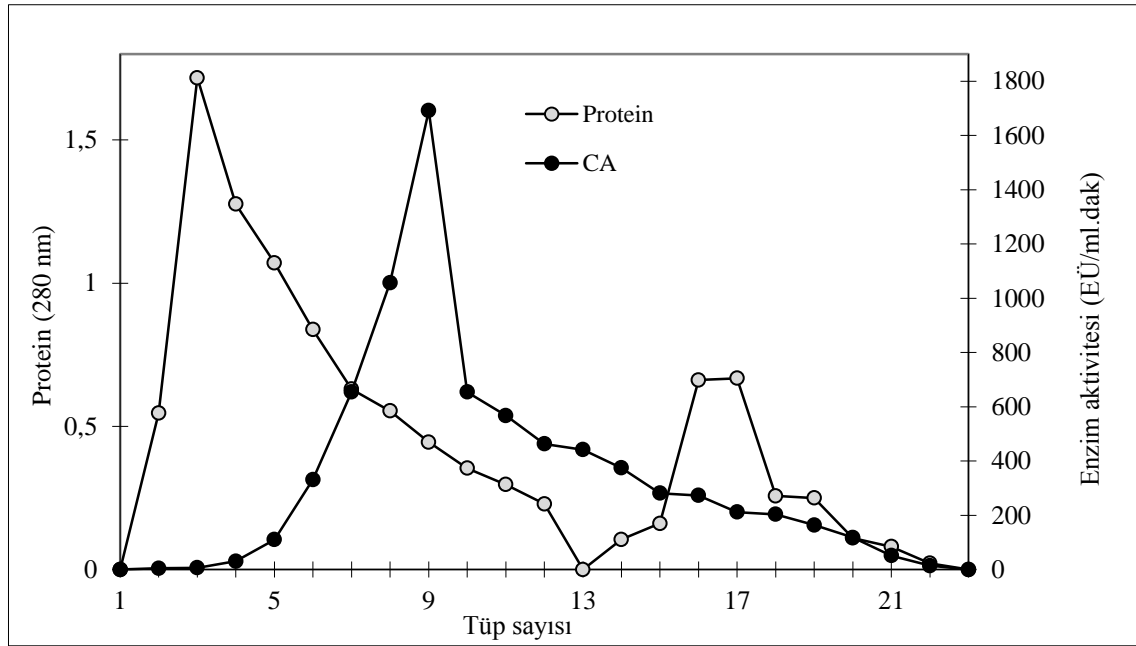
Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Bu yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'den elde edilen denklemden hesaplandı (R^2 : 0,9927).



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik

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

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



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

4.1.3. hCA I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları

İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizattan Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.

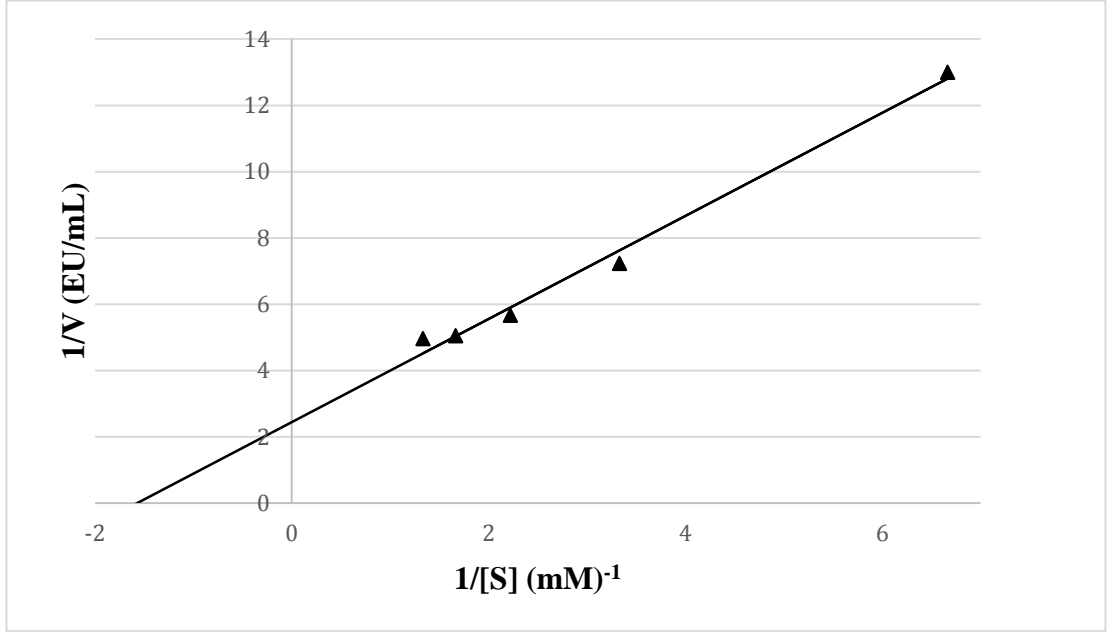
Çizelge 4.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizattan ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktive (EÜ/mL)	Toplam hacim(ml)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı	
Hemolizat	350	27	26.21	707,67	9450	13,35	100	1	
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	CA- I	2600	3,50	0,490	3,430	9100	2653	96,29	198,73
	CA-II	2176	3,00	0,075	0,225	6528	29013	69,00	2173,20

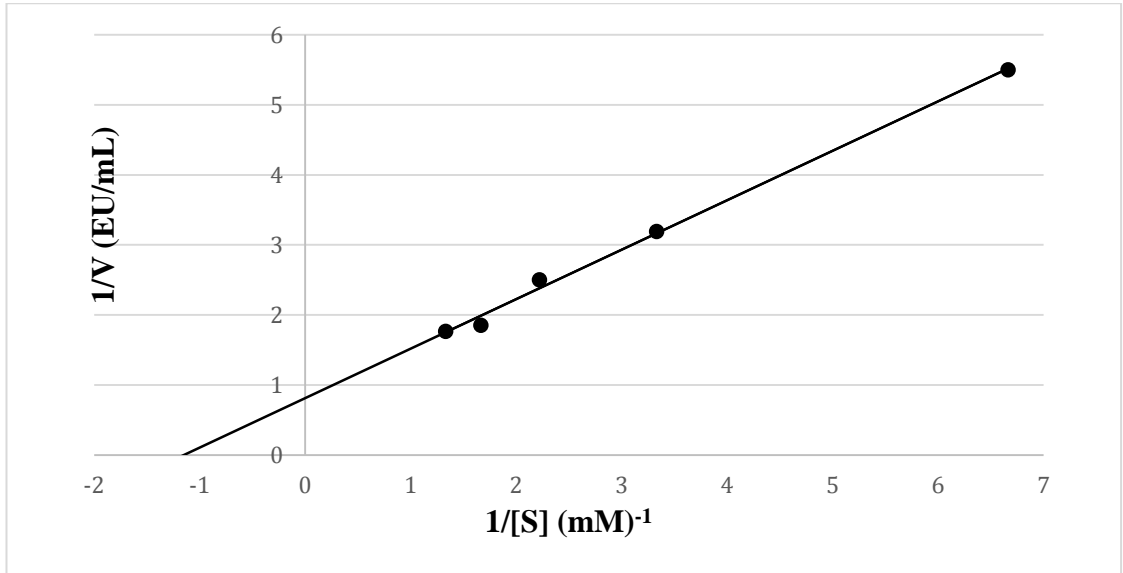
4.1.4. hCA I ve II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları

a) Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması 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 konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı.



Şekil 4.3. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



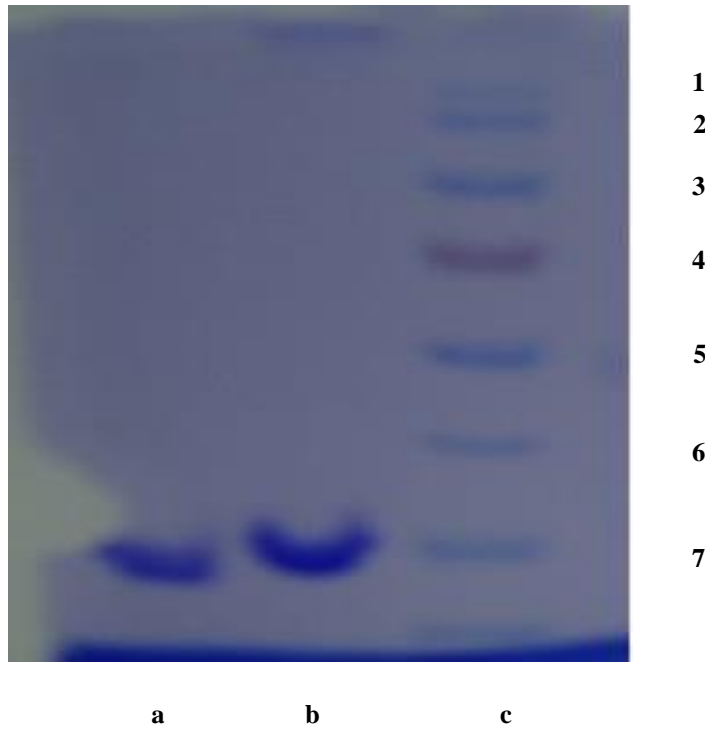
Şekil 4.4. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak bulundu (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). hCA I izoenzimi

için K_m 0,637 mM, V_{max} ise 0,409EU/mL.dak olarak hesaplandı. hCA II izoenzimi için K_m 0,872 mM, V_{max} 1,234EU/mL.dak olarak hesaplandı.

4.1.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Afinite kromatografisi yöntemi sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCAI ve II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamid jel elektroforezine insandan saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.5).

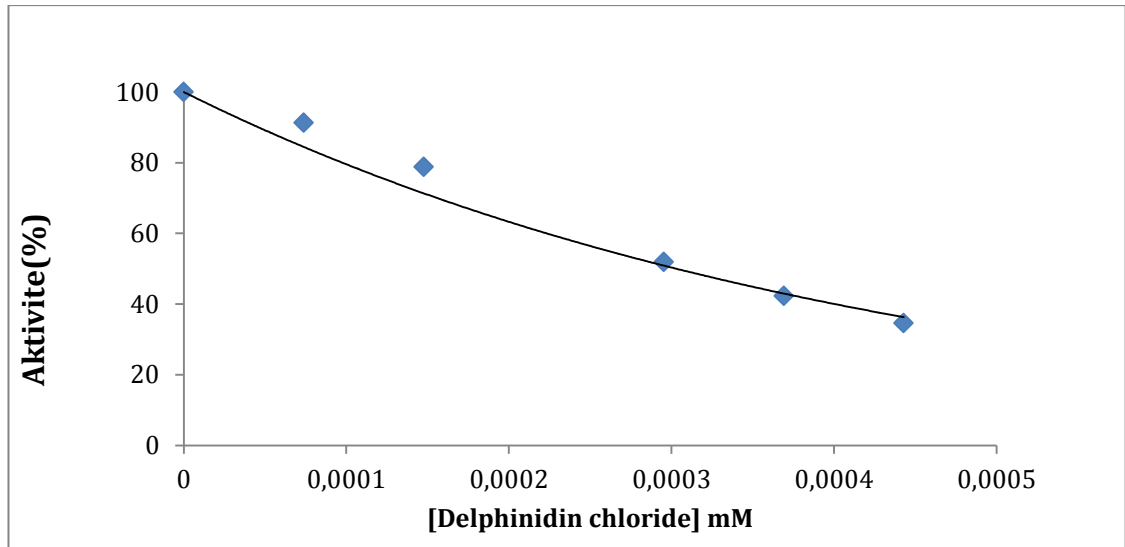


Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı (a:hCA-II, b: hCA-I, c:Standartlar)*c: Standart proteinler (1: 170 kDa 2: 130 kDa 3: 100 kDa, 4: 70 kDa 5: 55 kDa 6: 40 kDa 7: 35 kDa)

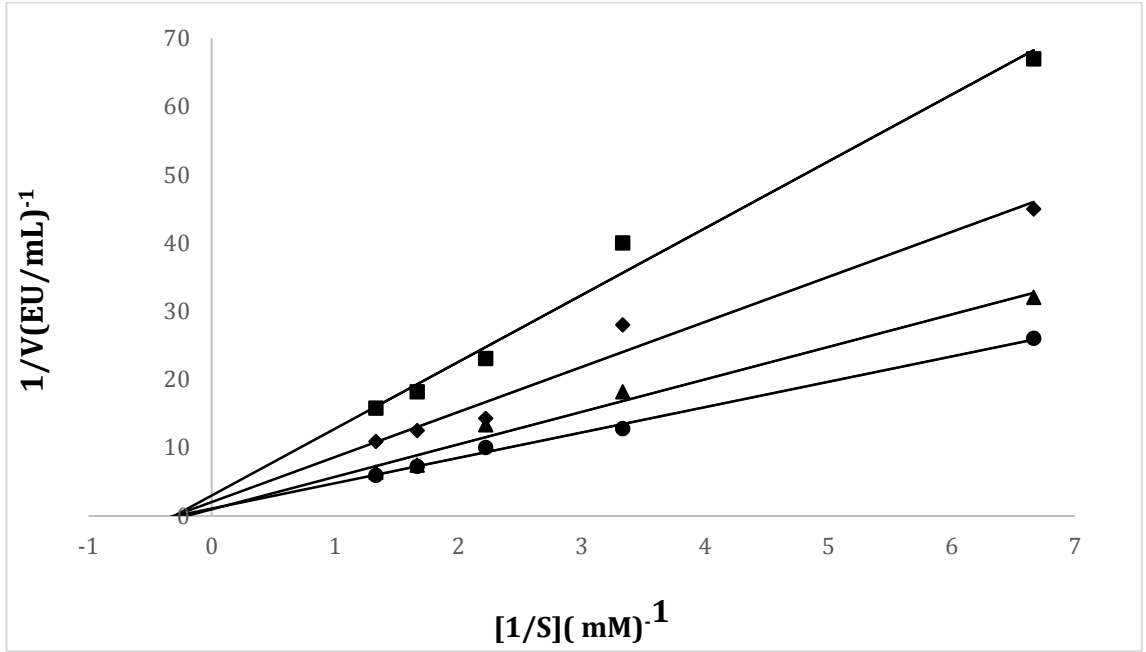
4.1.6. hCA I ve II izoenzimleri ve Asetilkolinesteraz enzimi esteraz aktiviteleri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

a) hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Kumarin türevleriyle ilgili sonuçları

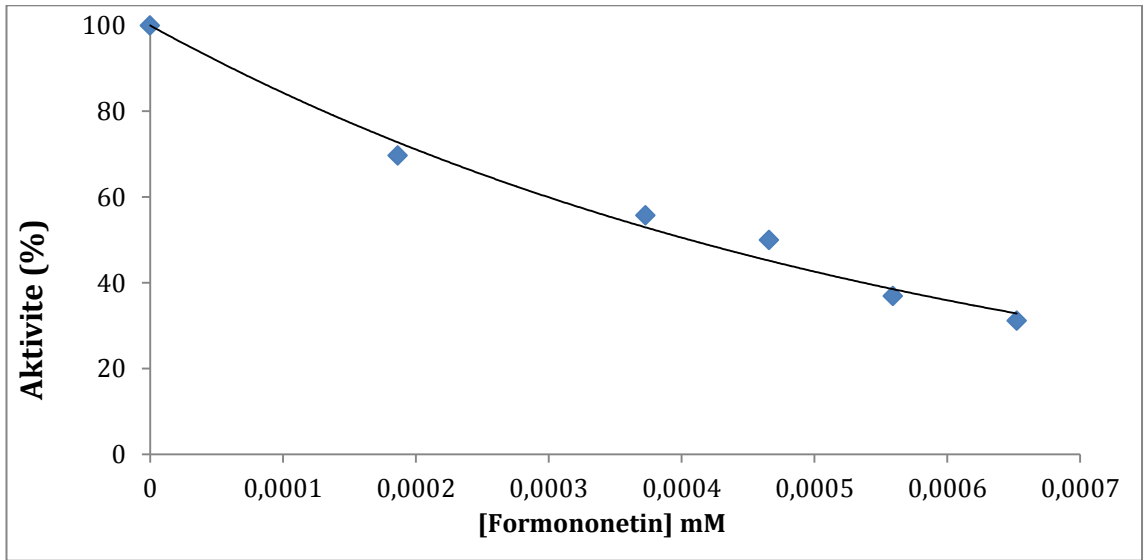
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA I izoenzimi için, kumarin türevlerinin saflaştırılan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren kumarin türevleri için Aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



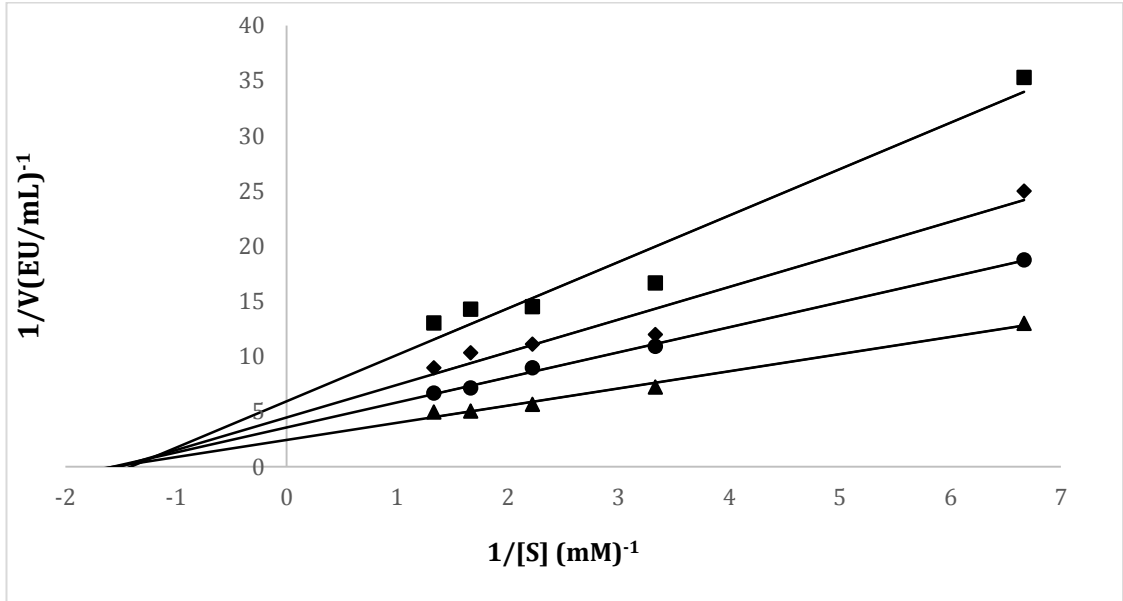
Şekil 4.6. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği



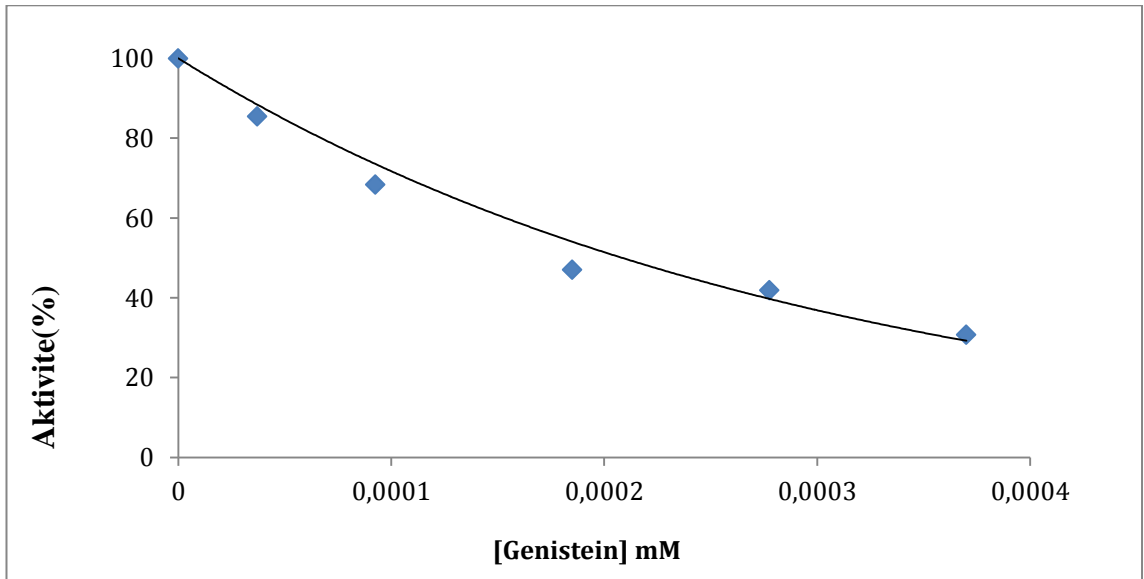
Şekil 4.7. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



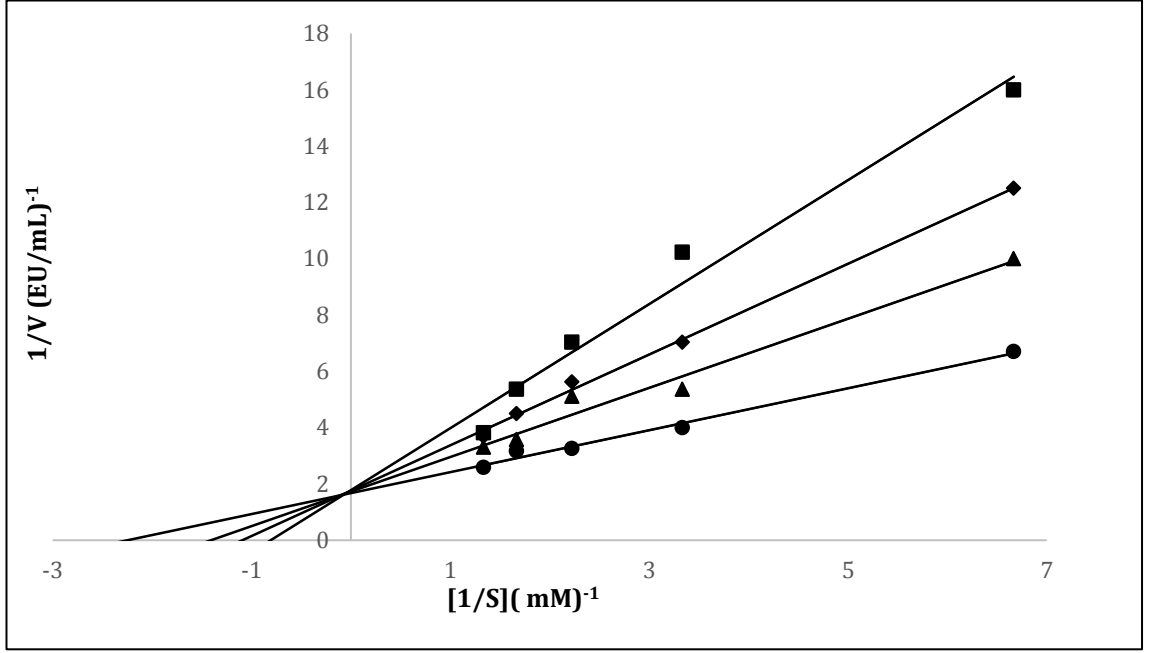
Şekil 4.8. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Formononetin grafiği



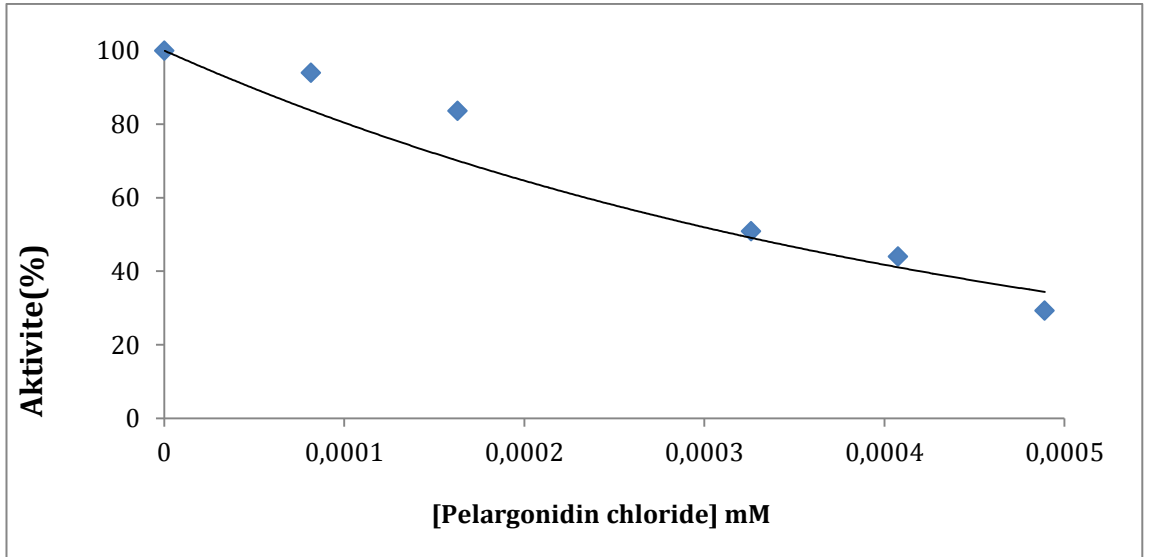
Şekil 4.9. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



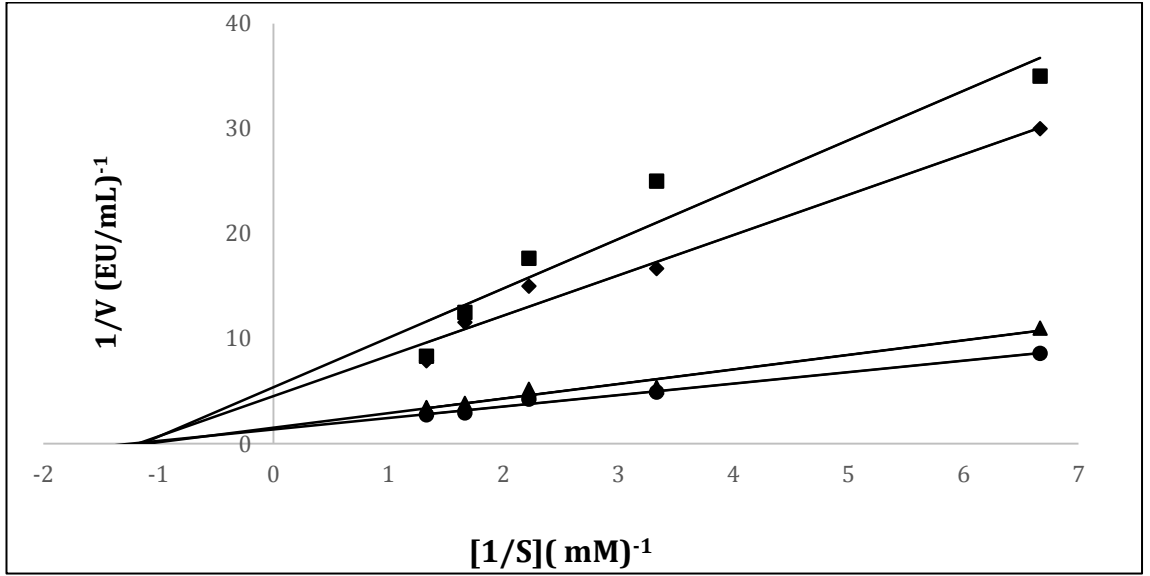
Şekil 4.10. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği



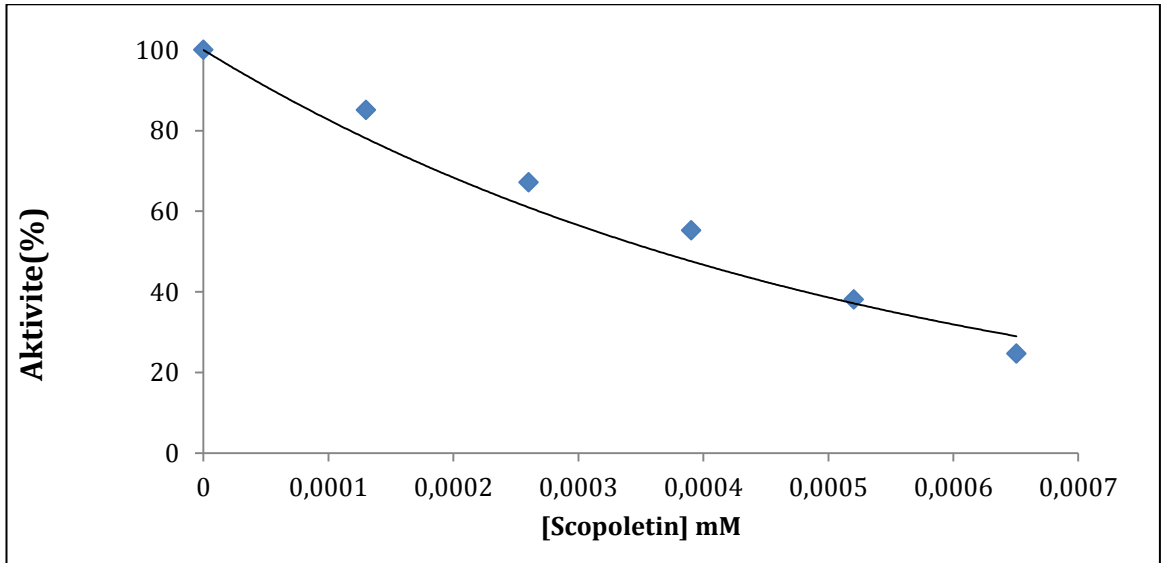
Şekil 4.11. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



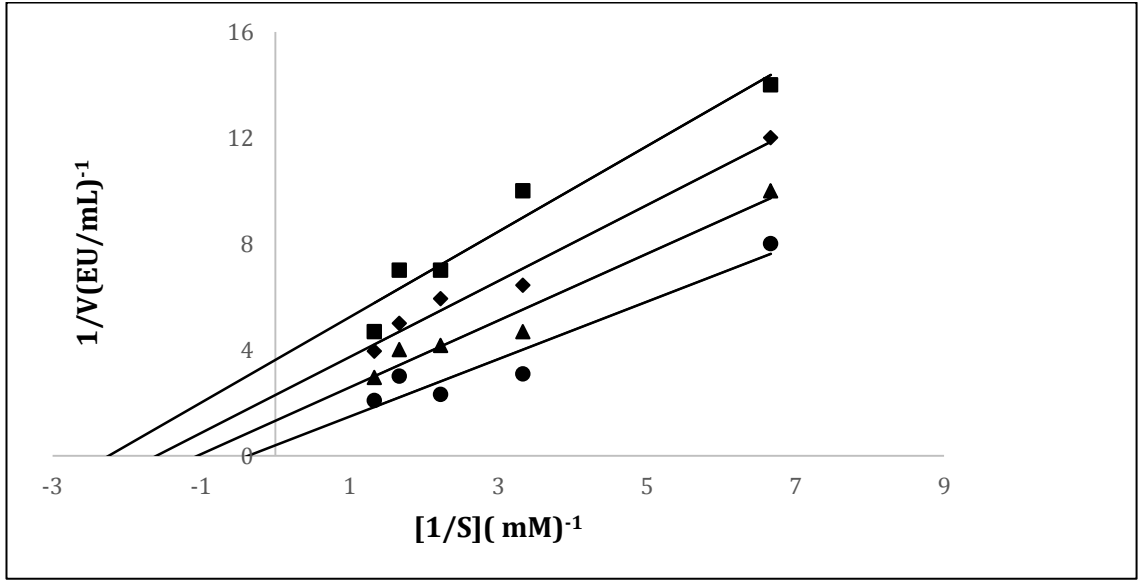
Şekil 4.12. Karbonik anhidraz CA I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği



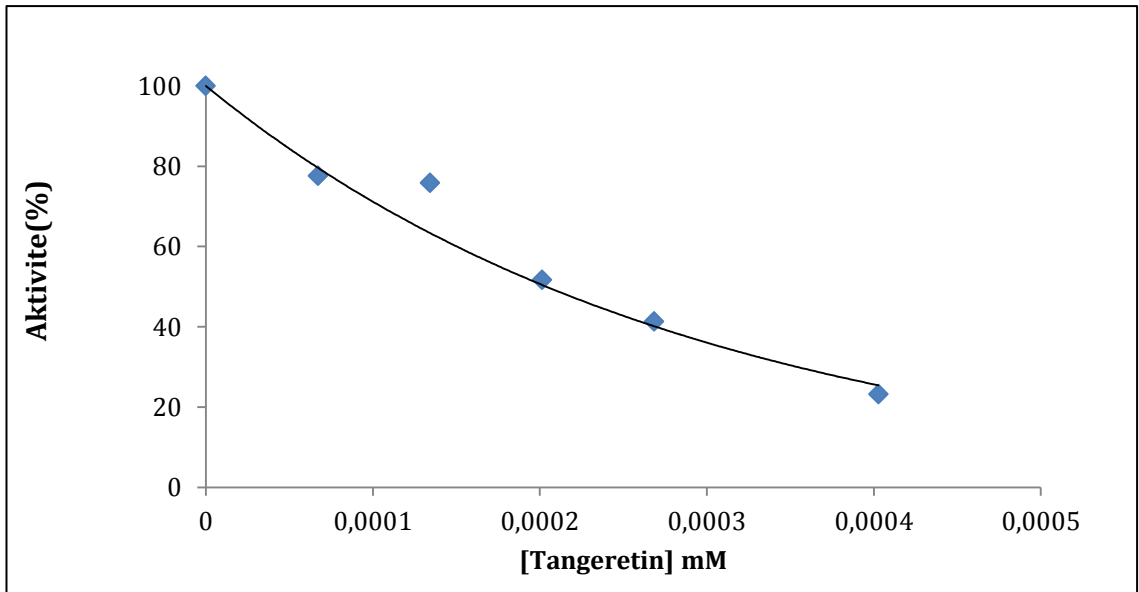
Şekil 4.13. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



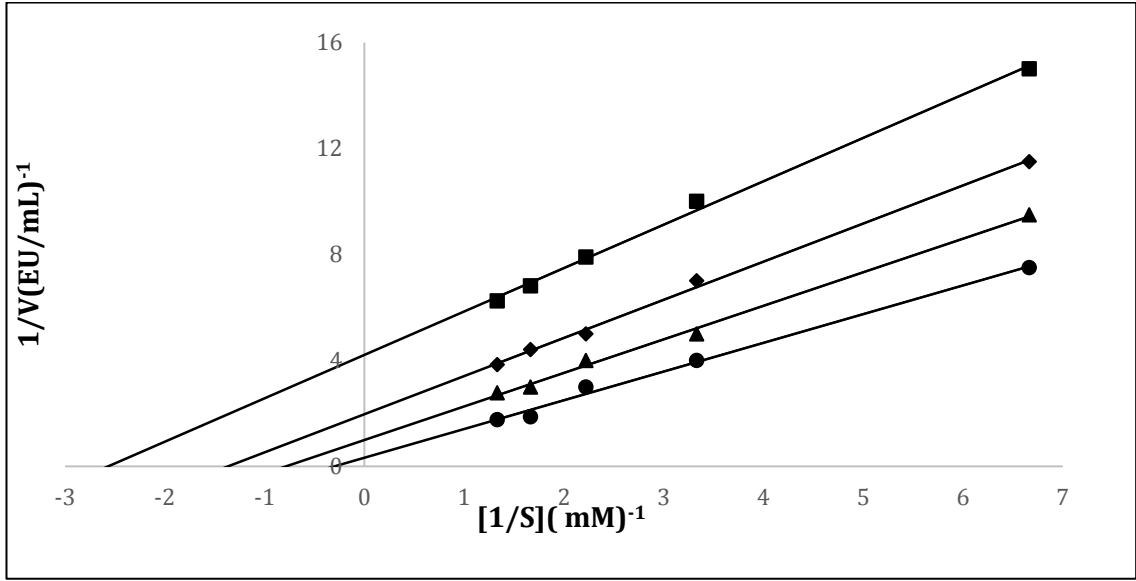
Şekil 4.14. Karbonik anhidraz CA-I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scooletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scooletin grafiği



Şekil 4.15. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.16. Karbonik anhidraz CA-I izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Tangeretin grafiği



Şekil 4.17. Karbonik anhidraz CA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

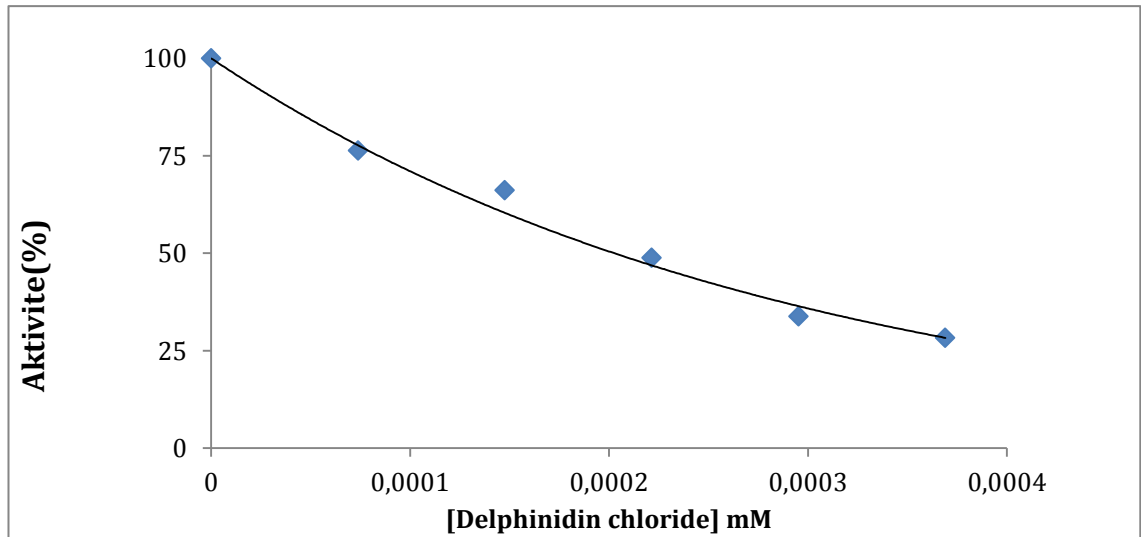
Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50} (μM)	K_i Ortalama (μM)	R^2	İnhibisyon türü
Tangeretin	203,88	131,13	0,9697	Yarı Yarışmalı
Genistein	208,42	139,23	0,9694	Yarışmalı
Pelargonidin	317,31	969,00	0,9370	Yarışmasız
Scopoletin	364,35	102,10	0,9515	Yarı yarışmalı
Formononetin	405,97	157,15	0,9781	Yarışmasız
Delphinidin	302,75	479,05	0,9800	Yarışmasız

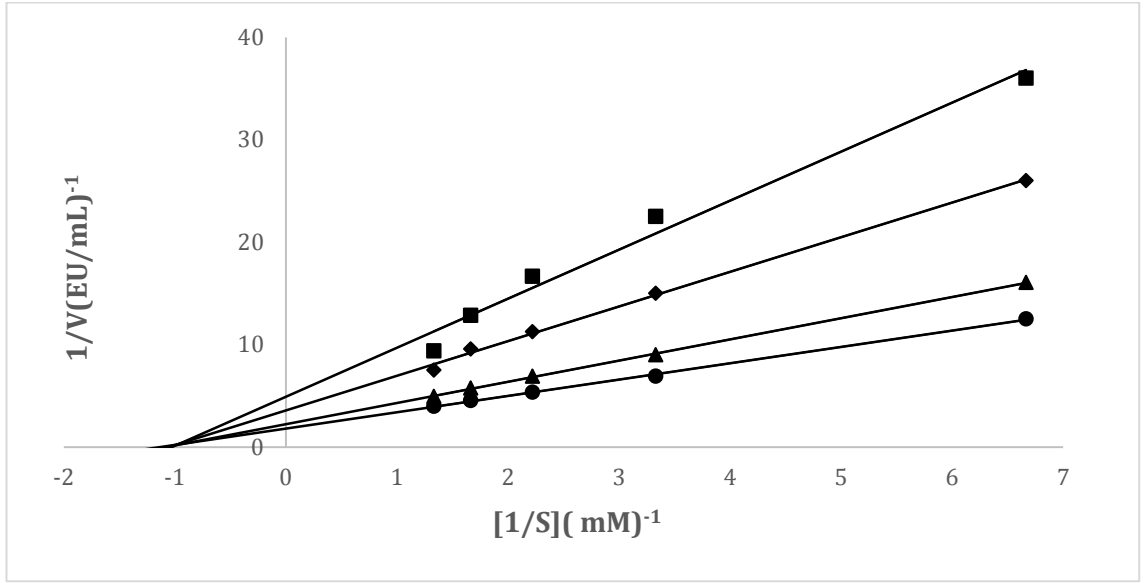
b) hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Kumarin türevi bileşikleriyle ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA II izoenzimi için kumarin türevlerinin, saflaştırılan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

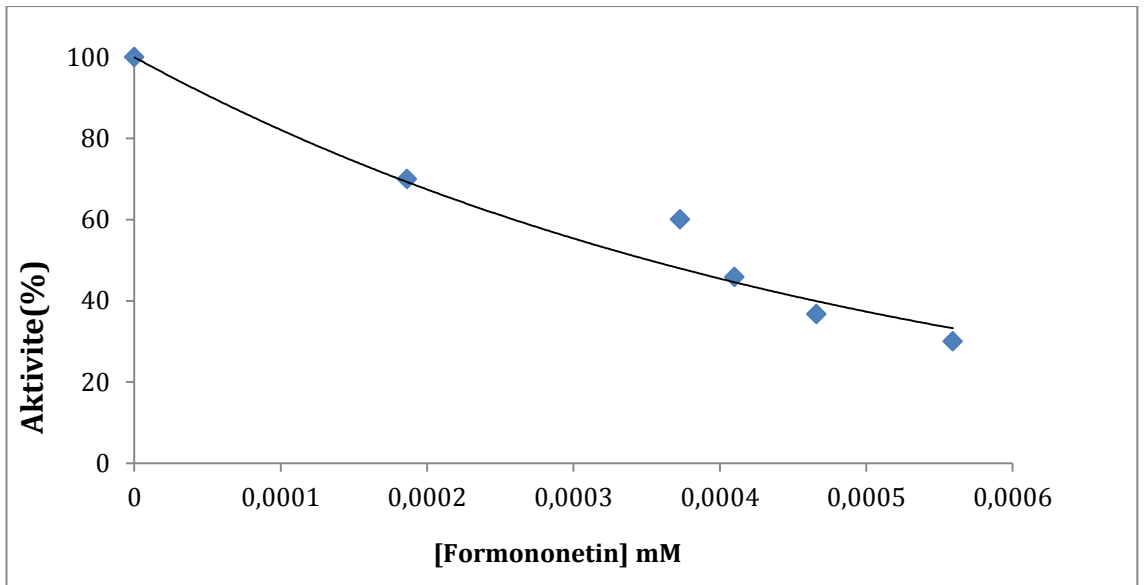
Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Kumarin türevleri için Aktivite (%) - [I] ve K_i grafikleri çizildi. Daha sonra çizilen grafiklerden her bir madde için K_i değerleri hesaplandı.



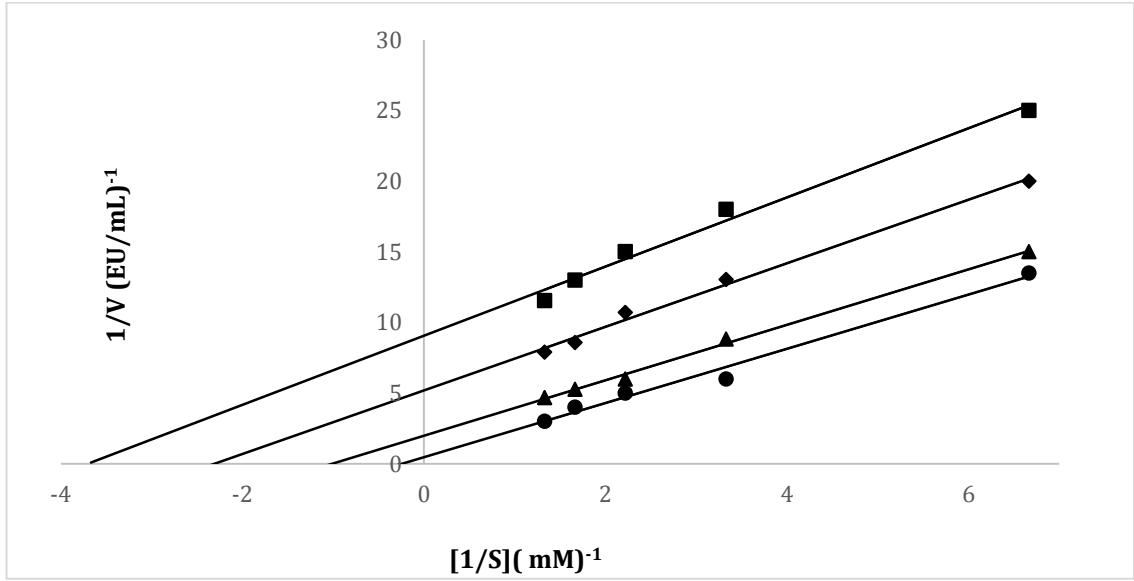
Şekil 4.18. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği



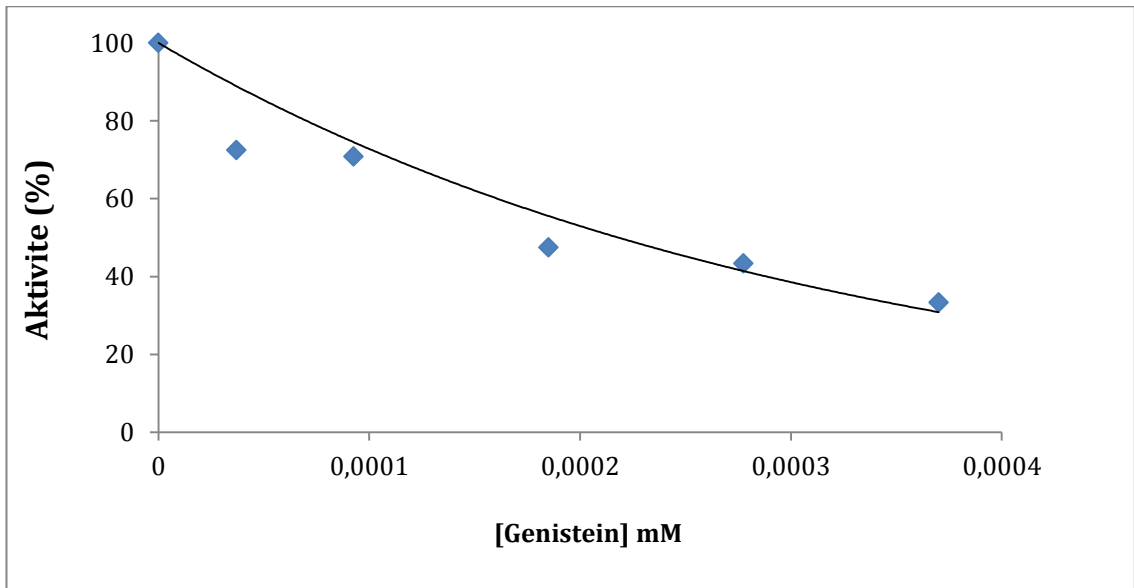
Şekil 4.19. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



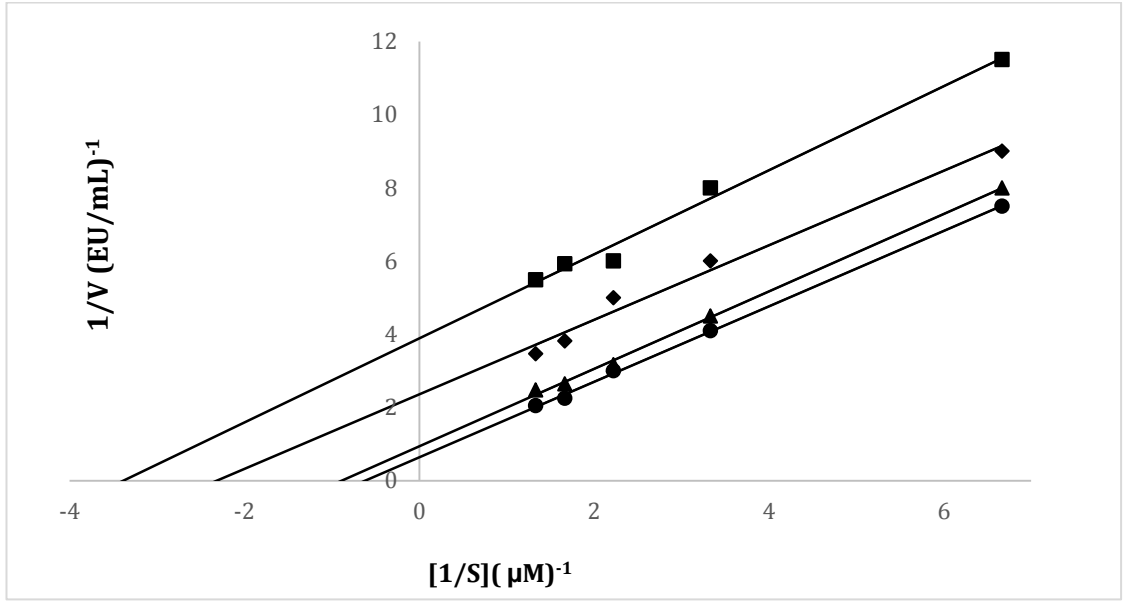
Şekil 4.20. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Formononetin grafiği



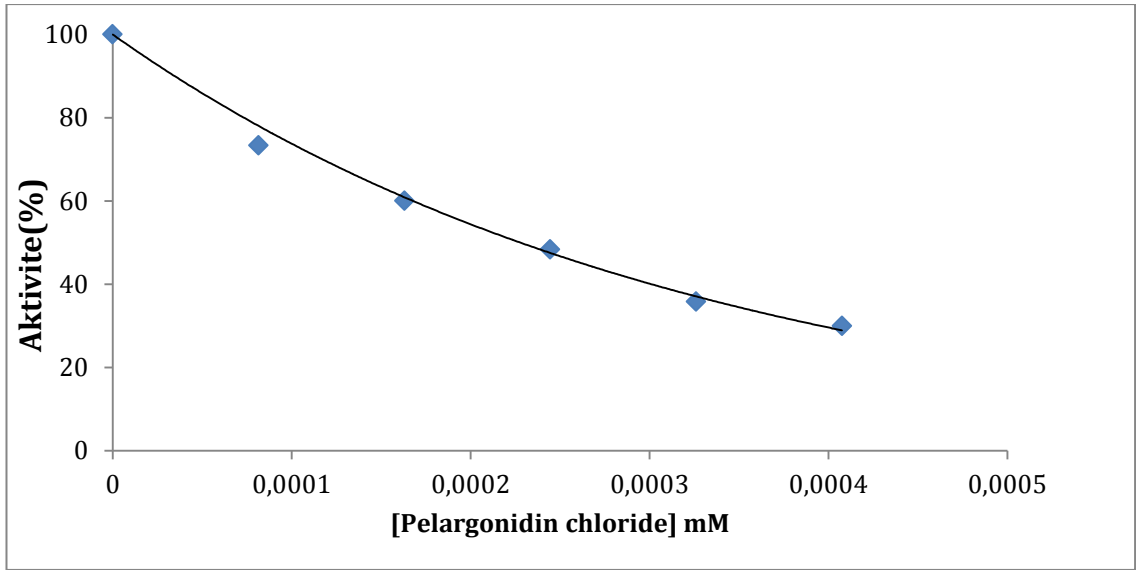
Şekil 4.21. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



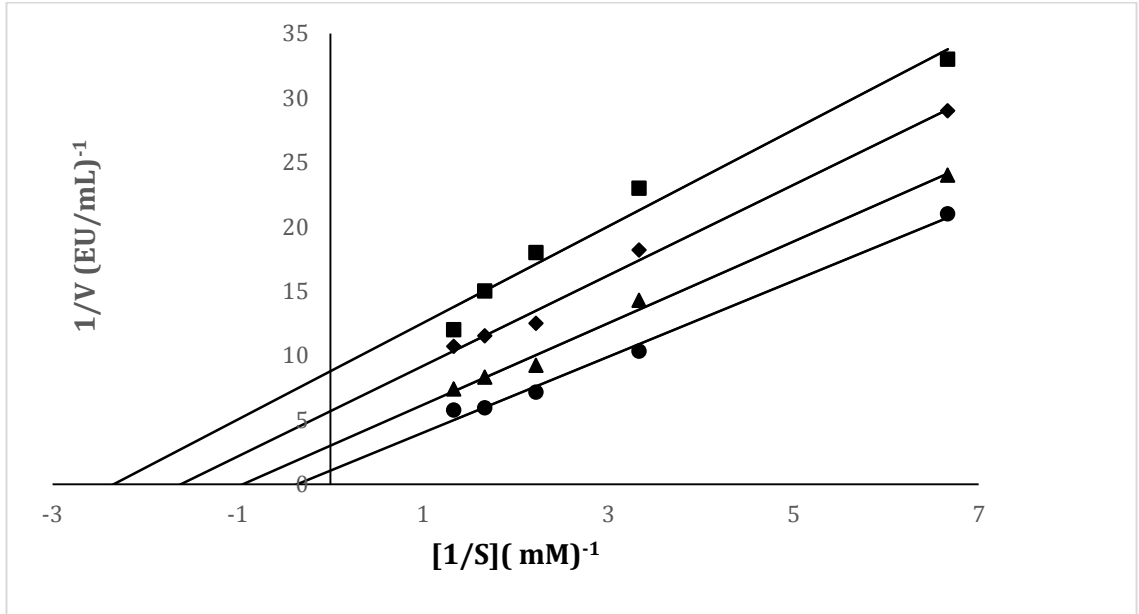
Şekil 4.22. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği



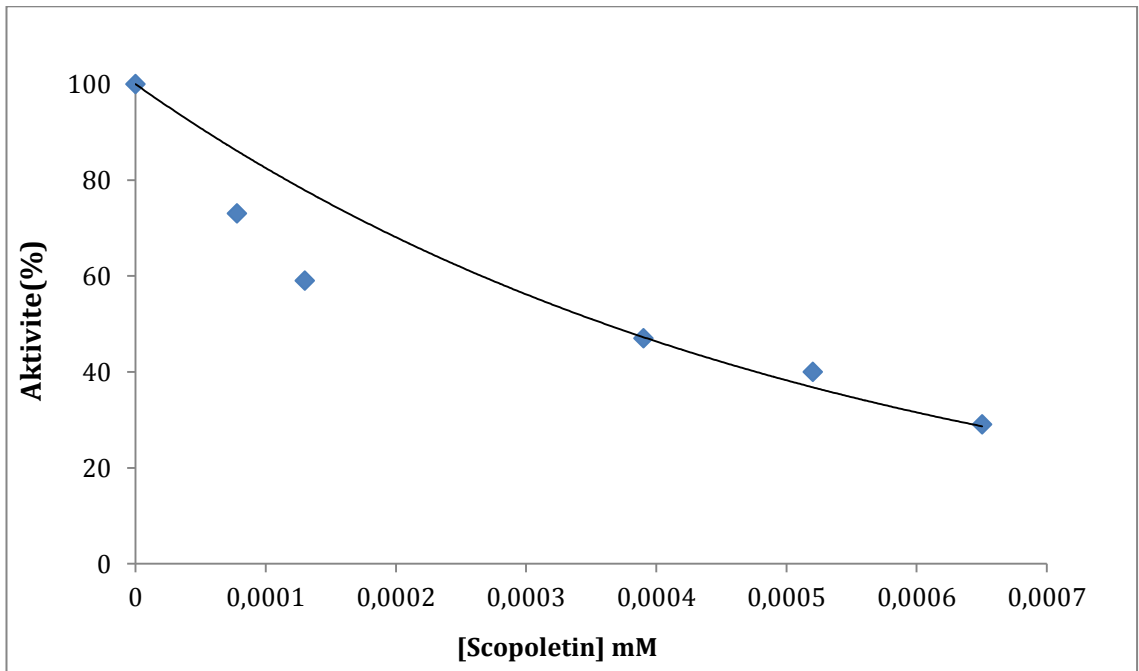
Şekil 4.23. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



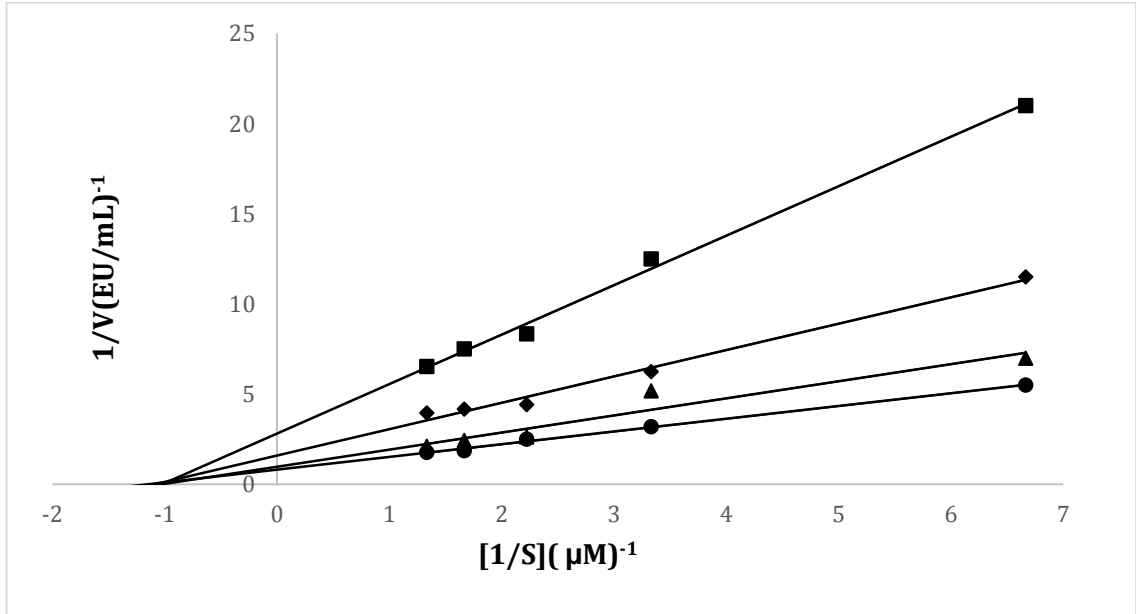
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği



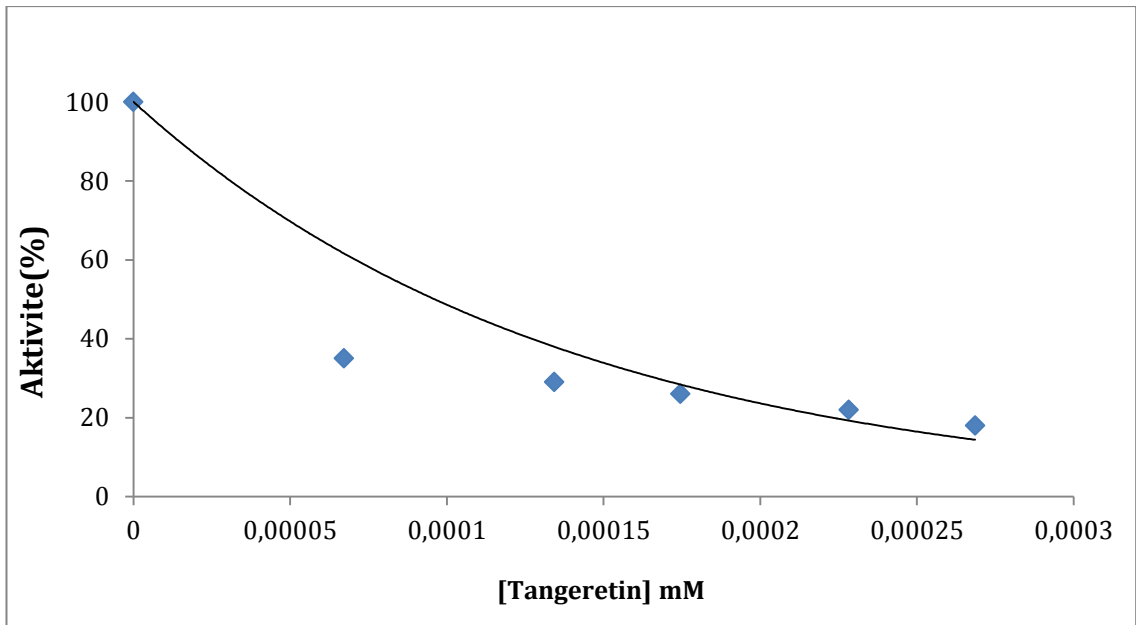
Şekil 4.25. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



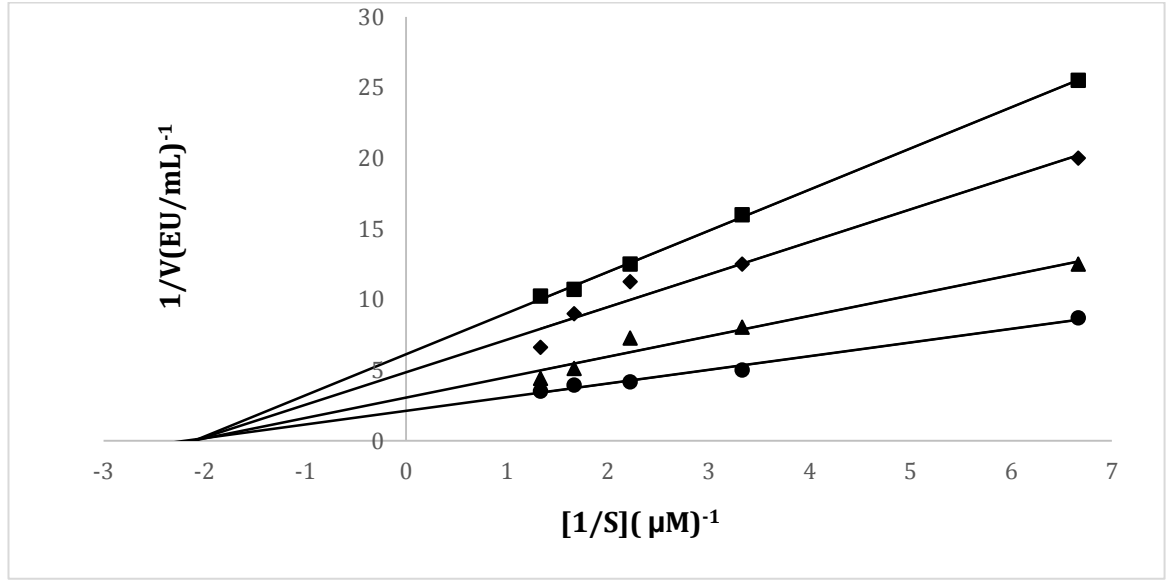
Şekil 4.26. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scopoletin grafiği



Şekil 4.27. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.28. Karbonik anhidraz CA II izoenziminin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-Tangeretin grafiği



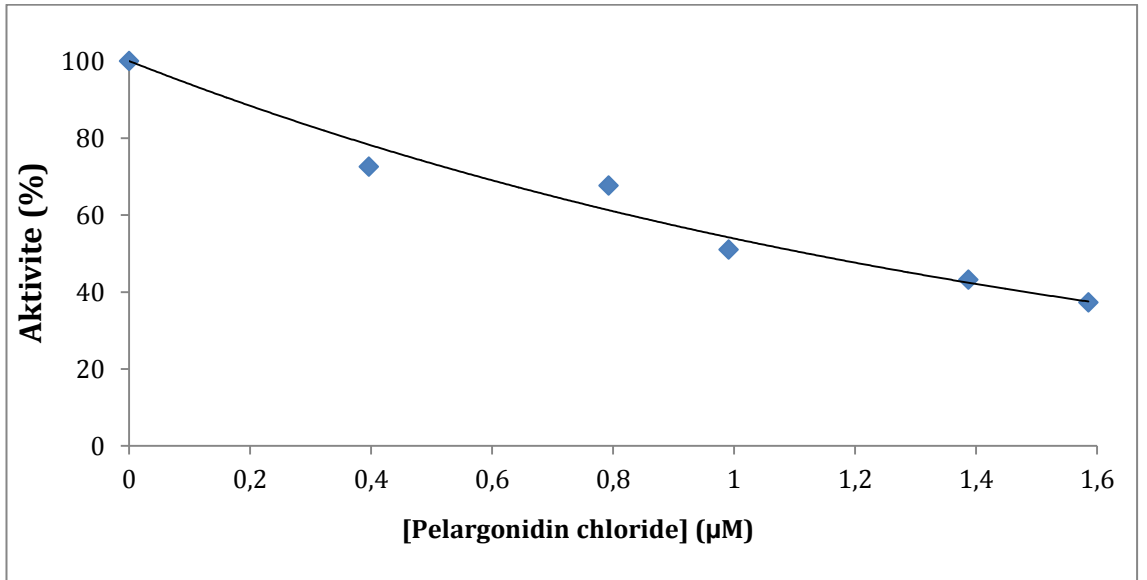
Şekil 4.29. Karbonik anhidraz CA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri

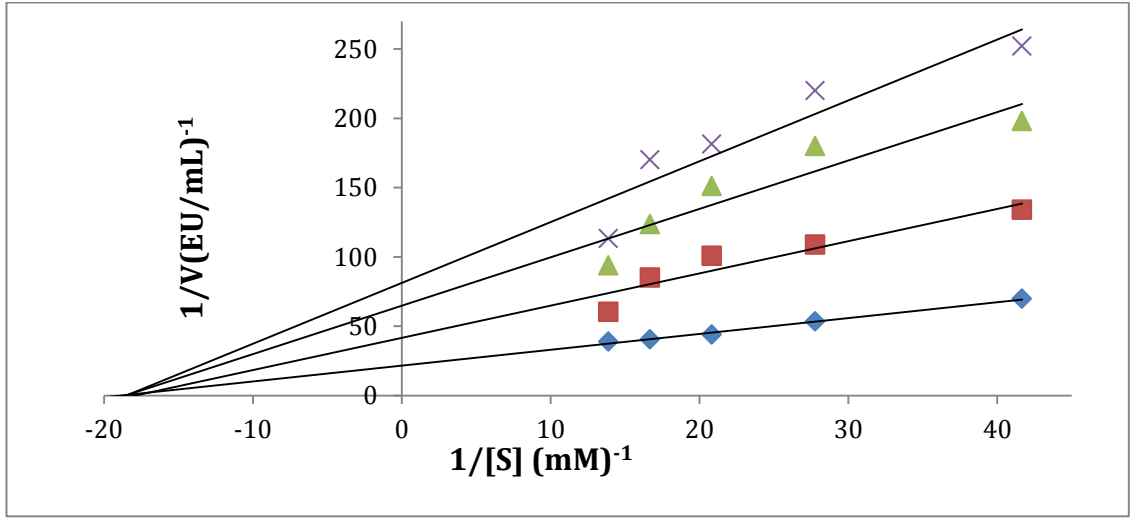
İnhibitör	IC_{50} (μM)	K_i Ortalama (μM)	R^2	İnhibisyon türü
Delphinidin	202,63	366,30	0,9868	Yarışmasız
Formononetin	351,78	36,20	0,9297	Yarı Yarışmalı
Genistein	218,13	320,13	0,9061	Yarı yarışmalı
Pelargonidin	227,81	37,03	0,9932	Yarı yarışmalı
Scopoletin	360,75	905,05	0,8856	Yarışmasız
Tangeretin	96,10	161,11	0,7448	Yarışmasız

c) Asetilkolinesteraz enziminin aktiviteyi üzerine kumarin türevlerinin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

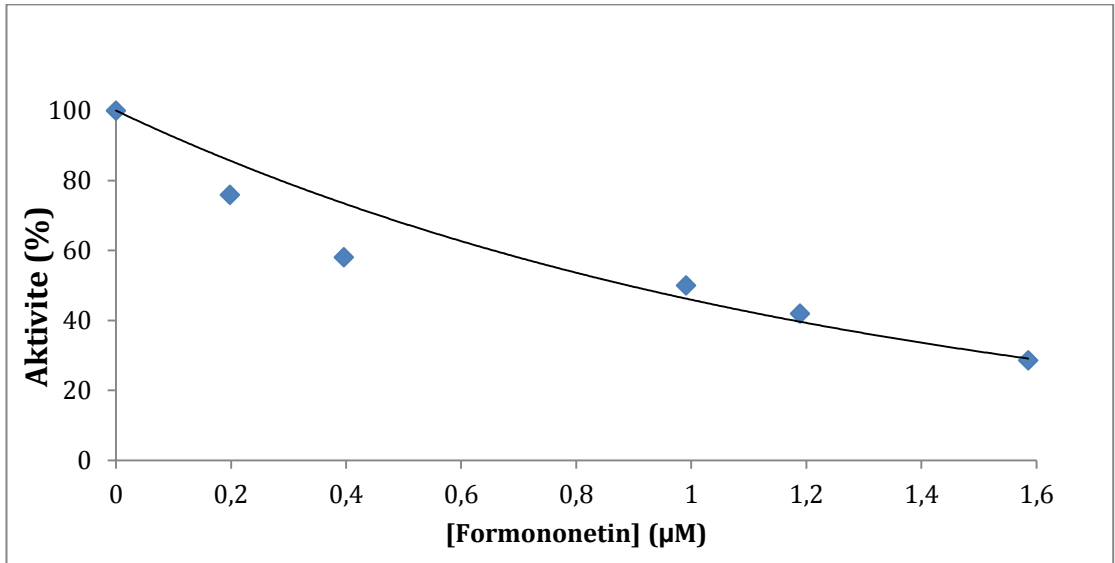
Doygun substrat konsantrasyonunda asetilkolin enzimi kumarin türevlerinin inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler asetilkolinesteraz yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisigösteren kumarin maddeleri için Aktivite (%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



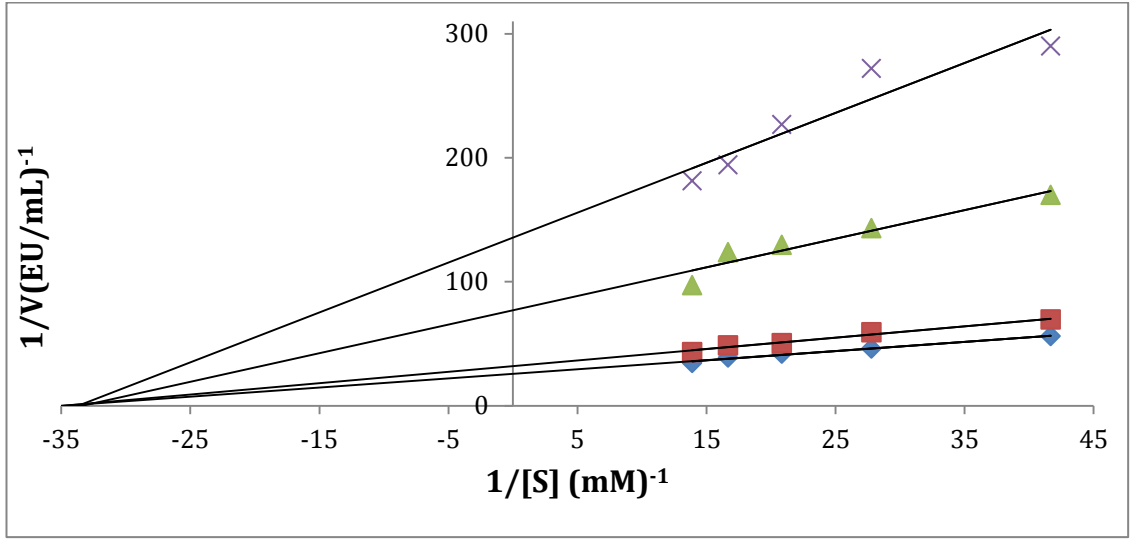
Şekil 4.30. Asetilkolinesteraz enziminin asetil kolin esteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Pelargonidin chloride grafiği



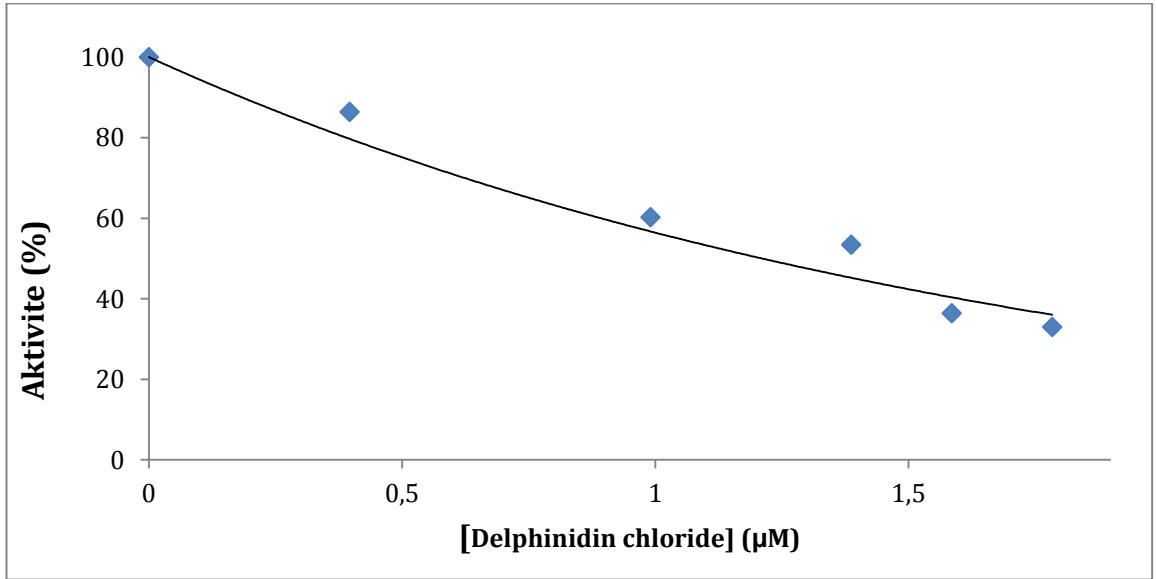
Şekil 4.31. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Pelargonidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



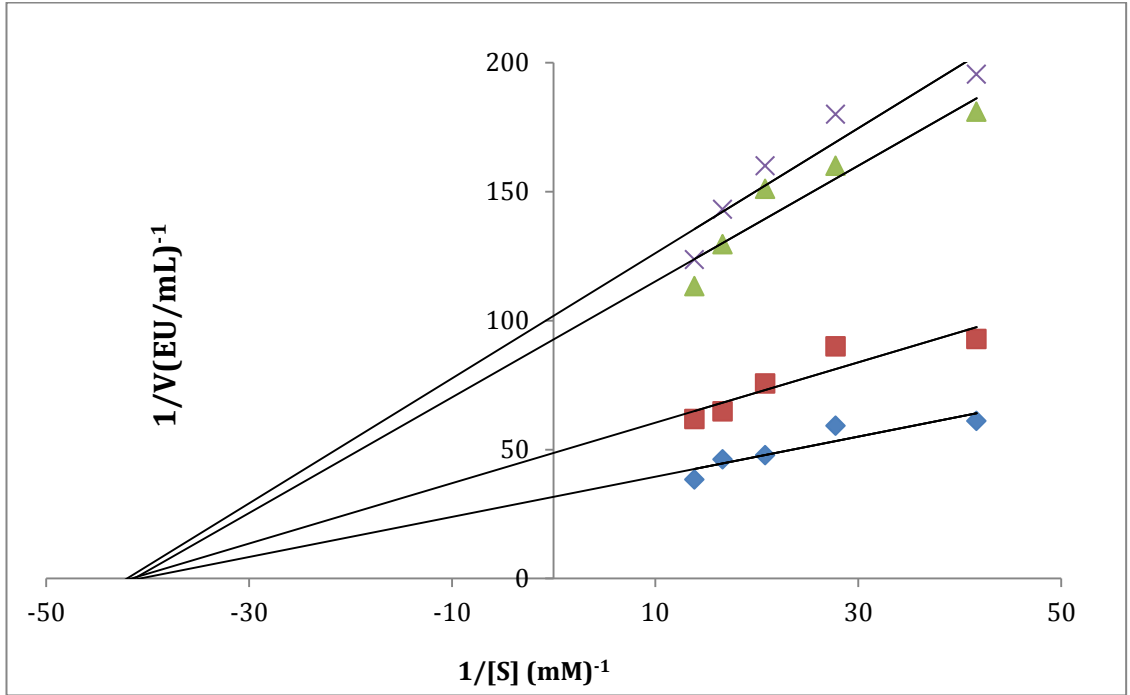
Şekil 4.32. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Formononetin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-Formononetin grafiği



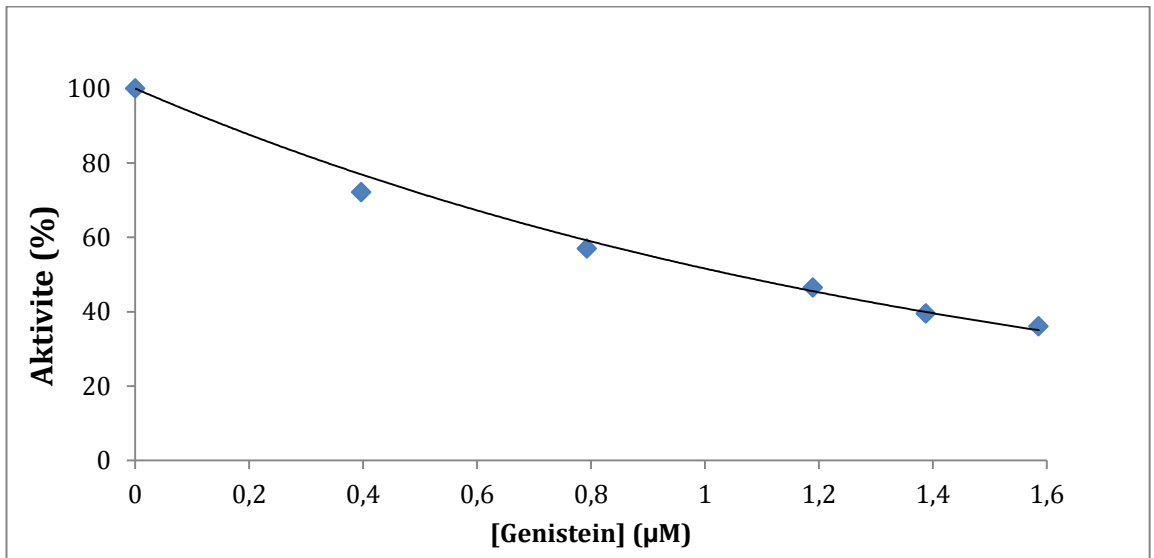
Şekil 4.33. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Formononetin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



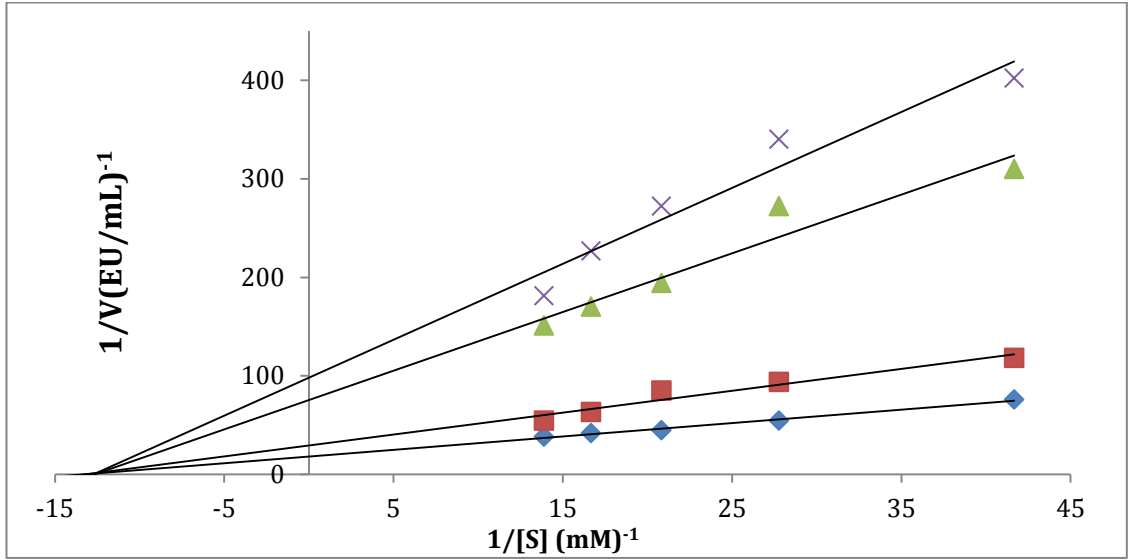
Şekil 4.34. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Delphinidin chloride grafiği



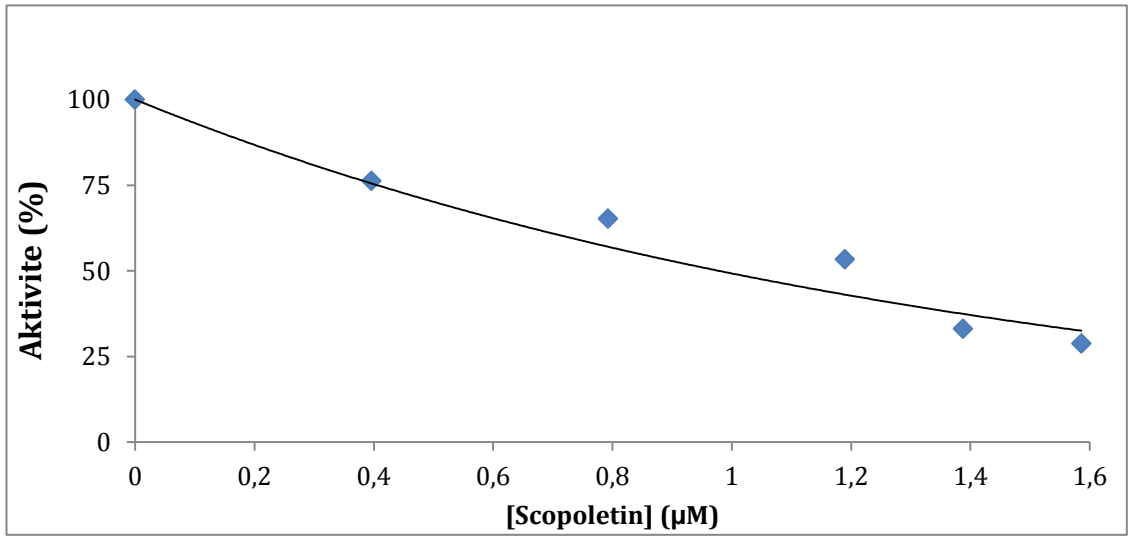
Şekil 4.35. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Delphinidin chloride konsantrasyonunda çizilen Lineweaver- Burk grafiği



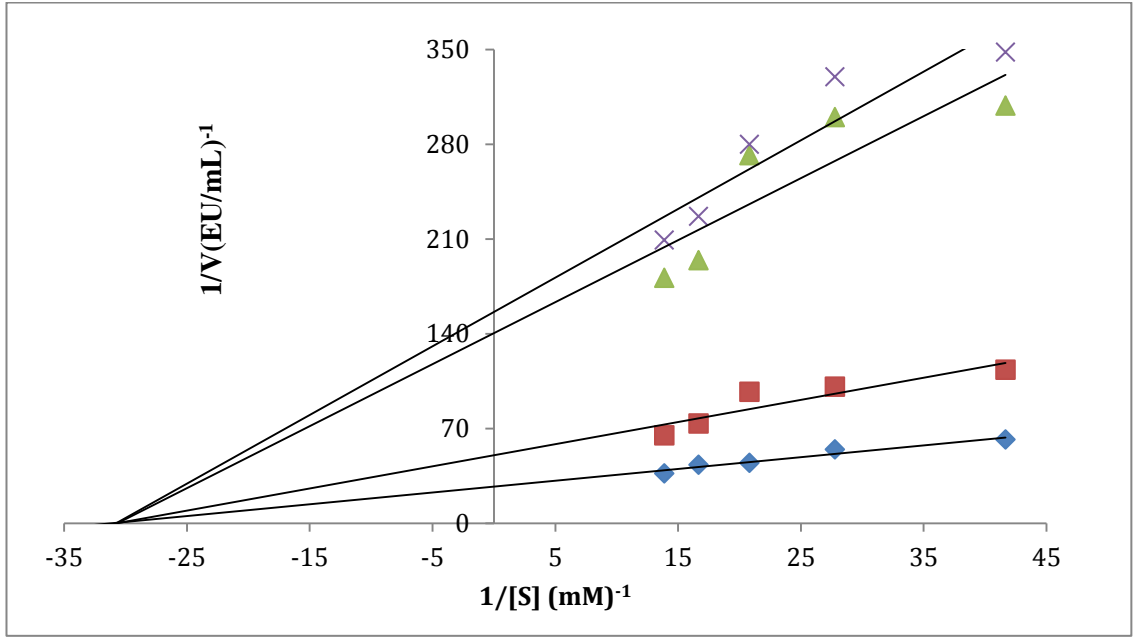
Şekil 4.36. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Genistein konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Genistein grafiği



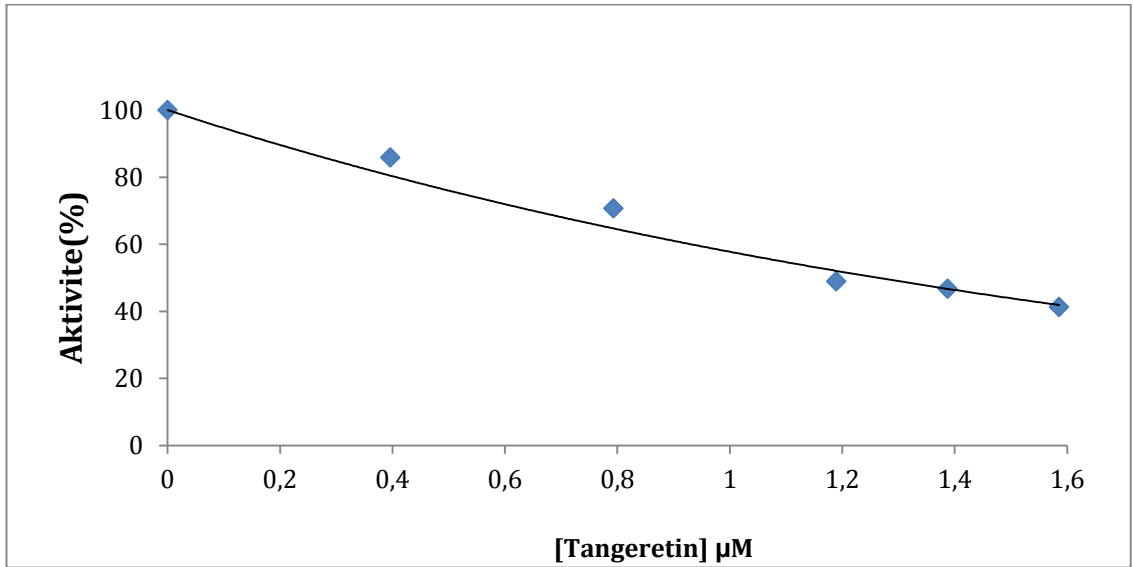
Şekil 4.37. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Genistein konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



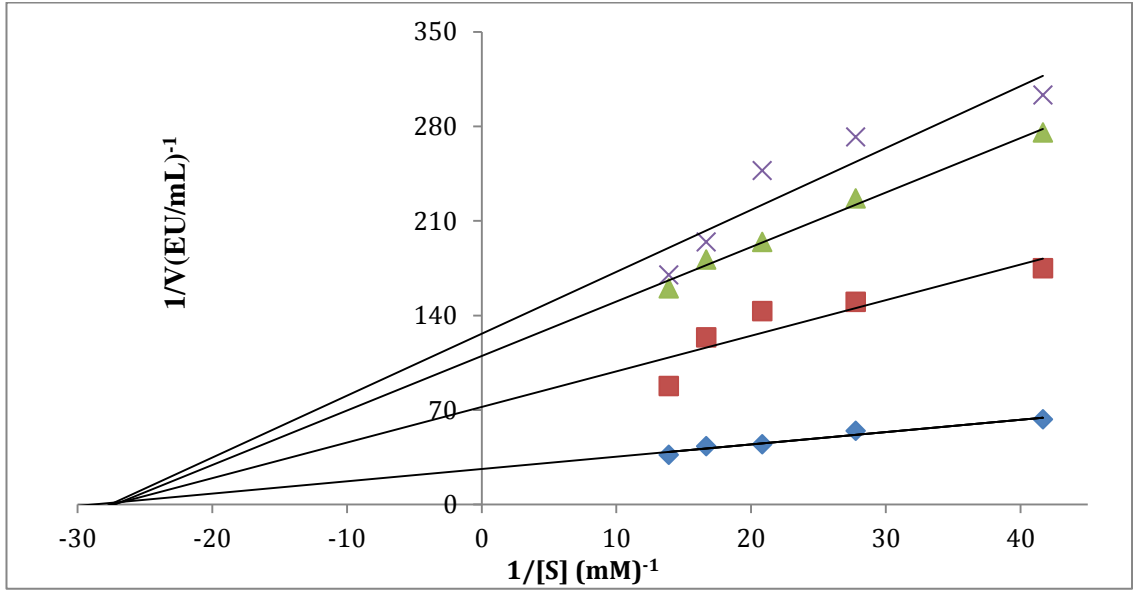
Şekil 4.38. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Scopoletin grafiği



Şekil 4.39. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Scopoletin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.40. Asetilkolinesteraz enziminin asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı inhibitör Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Aktivite(%)-Tangeretin grafiği



Şekil 4.41. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Tangeretin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

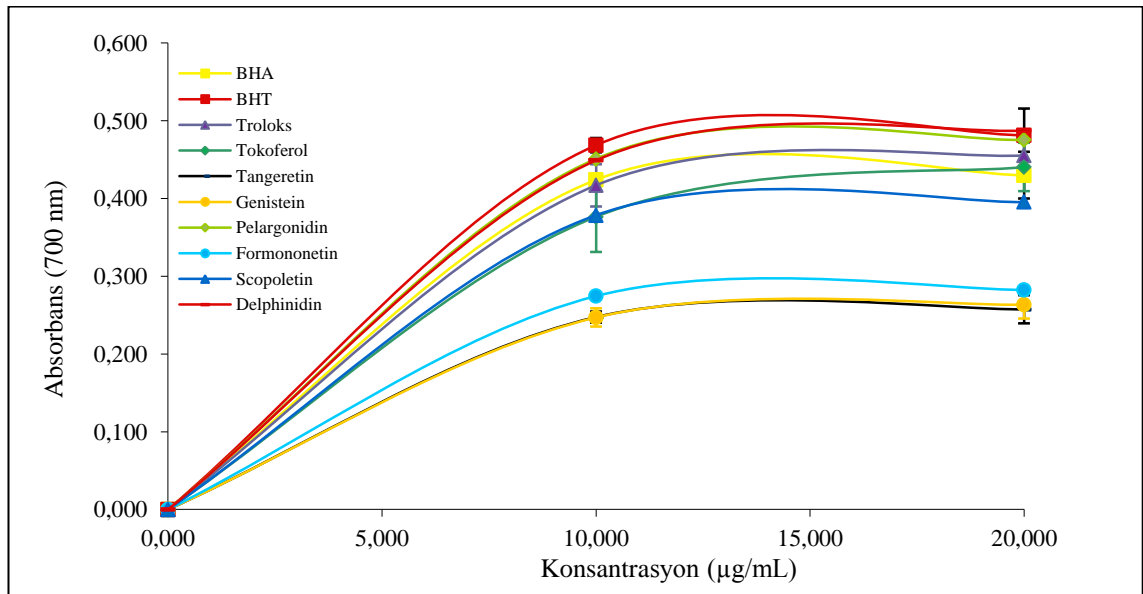
Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50} (mM)	K_i Ortalama (μ M)	R^2	İnhibisyon türü
Delphinidin	1211,54	21,90	0,9432	Yarışmasız
Formononetin	890,74	47,23	0,9179	Yarışmasız
Genistein	1048,41	14,70	0,9906	Yarışmasız
Pelargonidin	1121,36	14,60	0,9706	Yarışmasız
Scopoletin	978,81	14,80	0,9192	Yarışmasız
Tangeretin	1262,29	15,30	0,9754	Yarışmasız

4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.2.1. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlarda yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006a). Çalışmada kullanılan kumarin türevlerinin indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Kumarin türevlerinin indirgeme potansiyel farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.42).



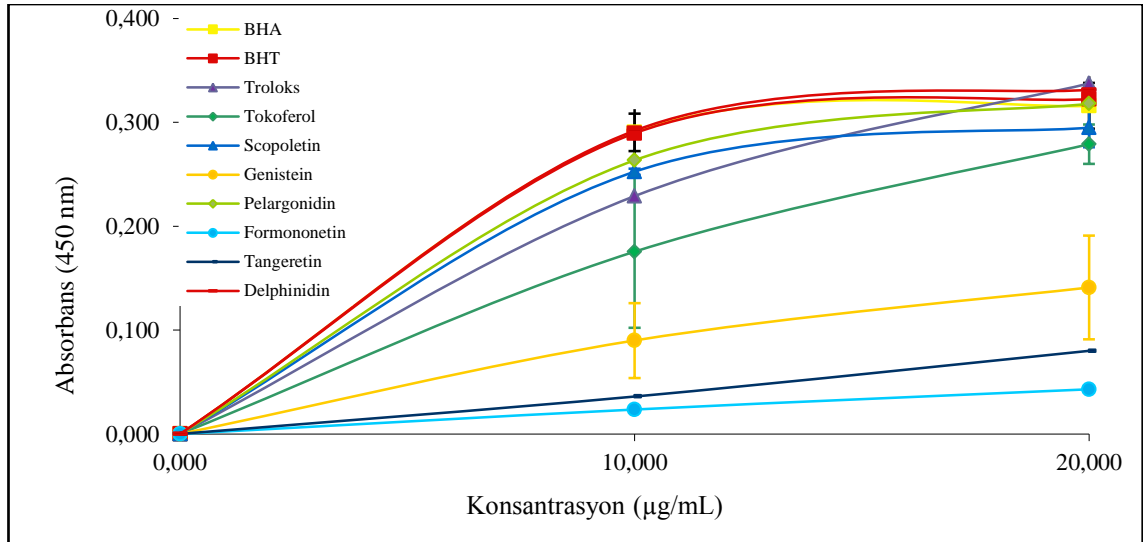
Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) Kumarin türevlerin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Kumarin türevlerin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.42.) Her bir standart antioksidan ve kumarin türevler için 20 µg/mL'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.6'da verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda ve standart antioksidanların

ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları BHT > Delphinidin > Pelargonidin > Troloks > α -Tokoferol > BHA > Scopoletin > Formononetin > Genistein > Tangeretin şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.6'da gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

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

Kumarin türevlerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Kumarin türevlerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-20 $\mu\text{g/mL}$) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.41). Kumarin türevlerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.43) her bir standart antioksidan, kumarin türevlerinin için 20 $\mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.6'da verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

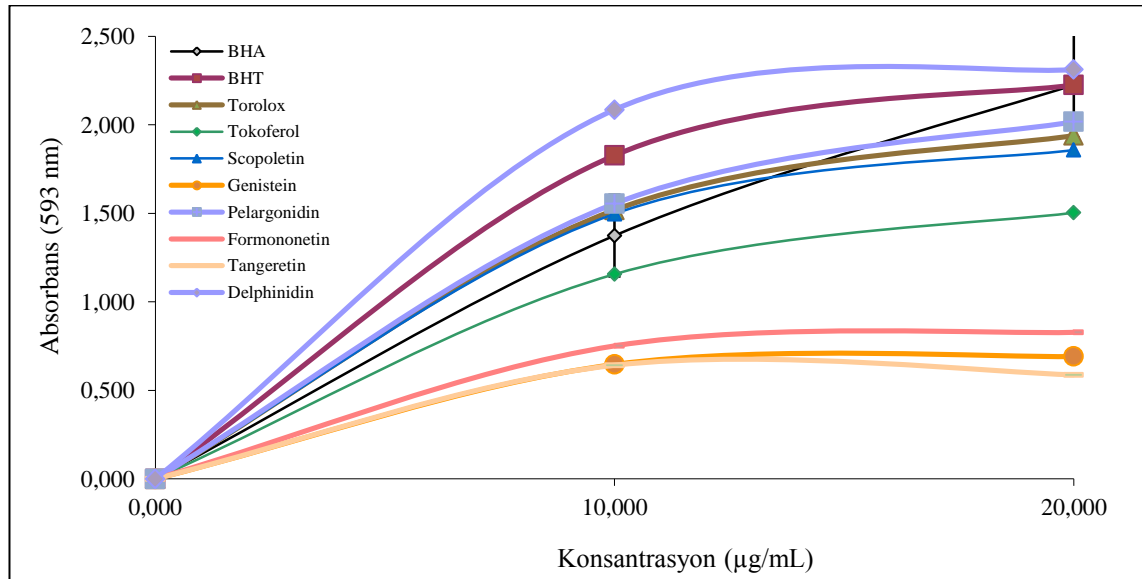


Şekil 4.43. Kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 $\mu\text{g/mL}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

20 µg/mL konsantrasyonda kumarin türevlerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında Troloks > Delphinidin > BHT > BHA > Pelargonidin > Scopoletin > α -Tokoferol > Genistein > Tangeretin > Formononetin şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi.

4.2.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottür. Çalışılan bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{2+}) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluştur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm’de maksimum absorbands gösterir.



Şekil 4.44. Farklı konsantrasyonlardaki Kumarin türevlerin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

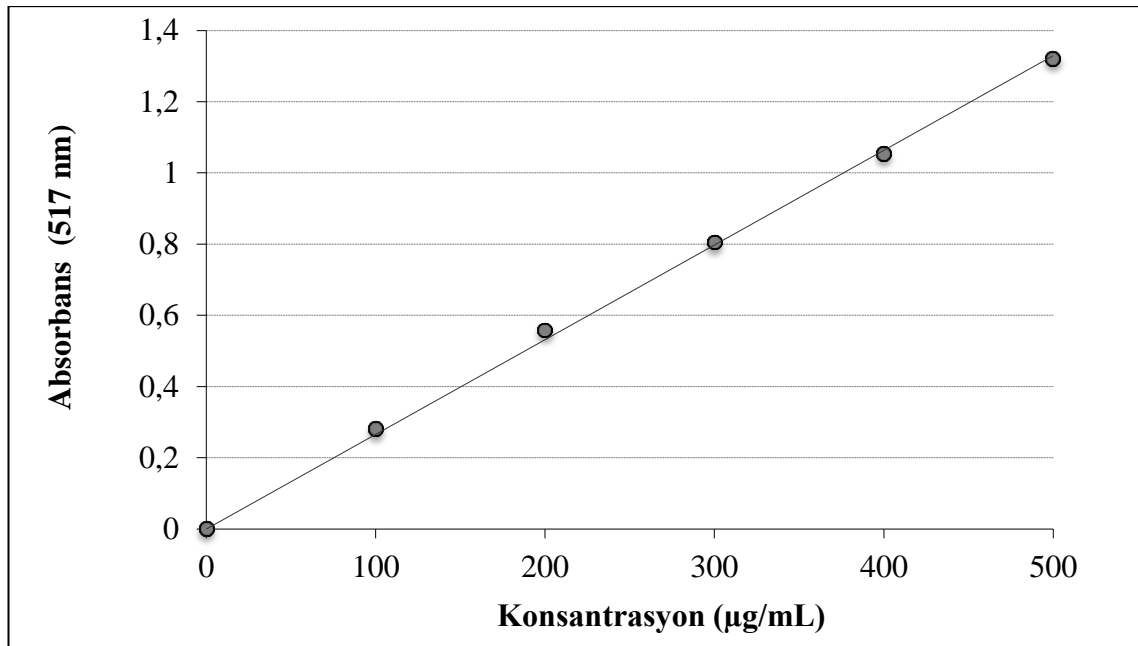
20 µg/mL konsantrasyonda kumarin türevlerinin ve standart antioksidanların ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) (FRAP metoduna) göre indirgeme kapasiteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında BHA > Delphinidin > BHT > Pelargonidin >

Troloks > Scopoletin > α -Tokoferol > Formononetin > Genistein > Tangeretin şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi.

Çizelge 4.5. Kumarin türevlerin 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında Fe^{3+} , Cu^{2+} , ve FRAP metotlarına göre indirgeme kuvvetleri ve r^2 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

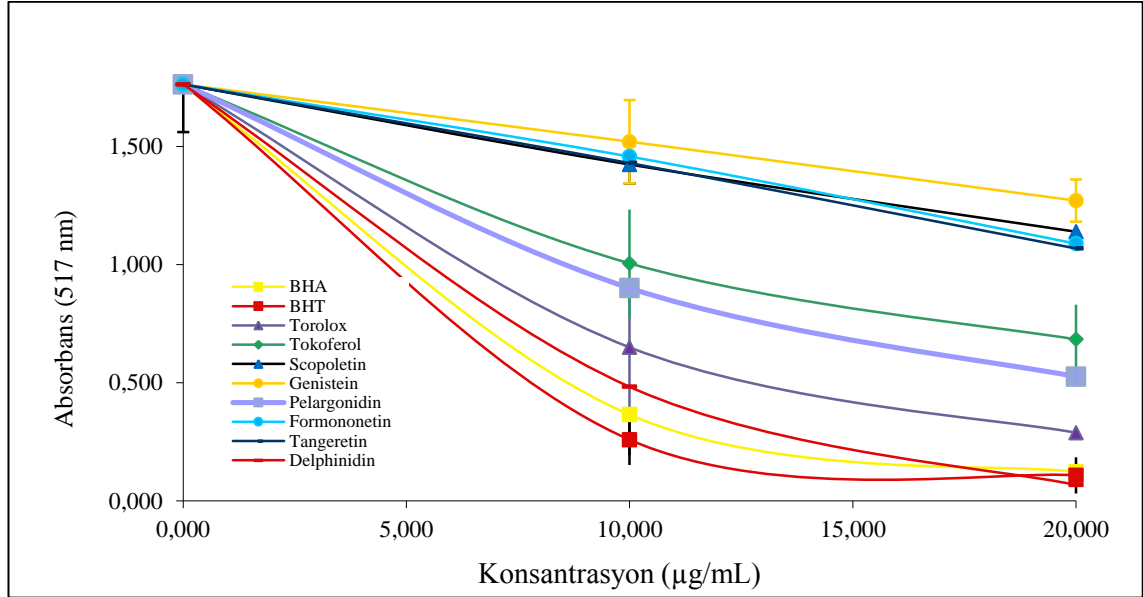
	Fe^{3+}		Cu^{2+}		FRAP	
	İndirgeme		İndirgeme		İndirgeme	
BHA	0,430	0,7602	0,316	0,8102	2,225	0,9432
BHT	0,481	0,7704	0,322	0,8253	2,225	0,8790
Troloks	0,455	0,8120	0,337	0,9595	1,939	0,9031
α-Tokoferol	0,440	0,8560	0,279	0,9782	1,503	0,9122
Scopoletin	0,395	0,7820	0,295	0,8553	1,858	0,8890
Tangeretin	0,257	0,7761	0,080	0,9970	0,587	0,9750
Formononetin	0,282	0,8093	0,043	0,8380	0,828	0,8230
Genistein	0,263	0,7710	0,141	0,9970	0,691	0,8190
Delphinidin	0,487	0,7972	0,331	0,9750	2,313	0,7984
Pelargonidin	0,475	0,7880	0,318	0,8740	2,017	0,9112

4.2.4. DPPH' serbest radikal giderme aktivitesi bulguları



Şekil 4.45. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

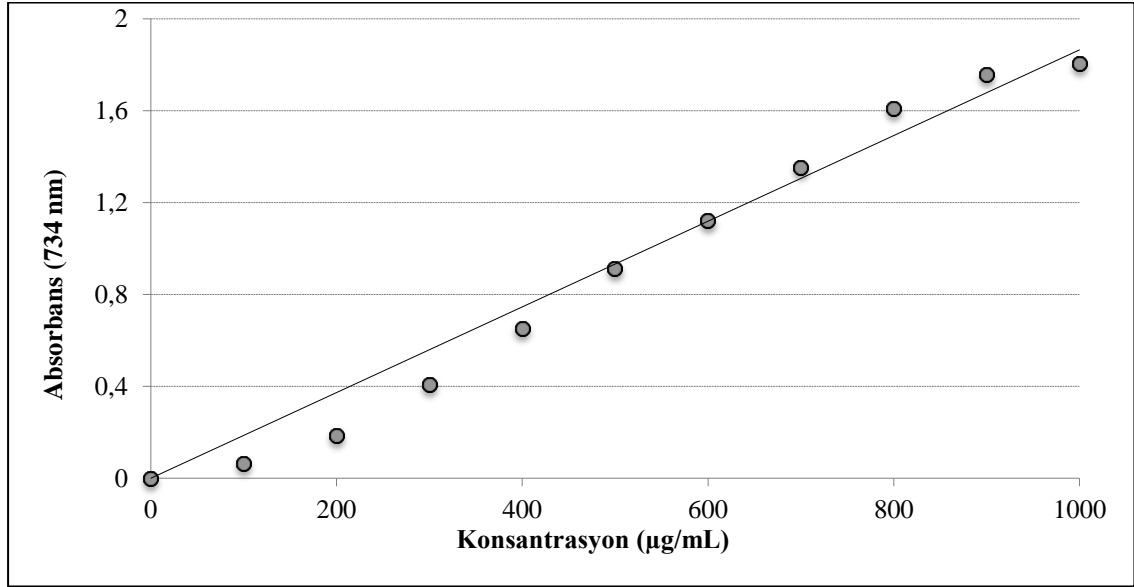
Kumarin türevlerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.45’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



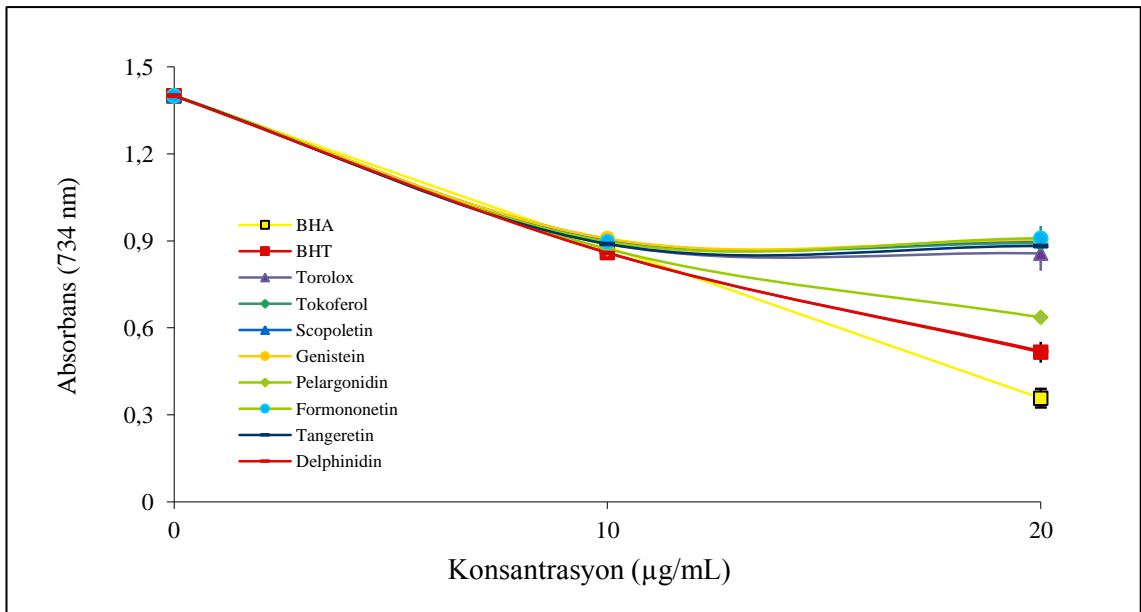
Şekil 4.46. Kumarin türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/mL) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

4.2.5. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS^{•+} giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller 1996; Gülçin *et al.* 2007). Bunun için öncelikle ABTS’den ABTS^{•+}’nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS’nin kimyasal yapısı Şekil 4.25’de görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM’lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiliye 2,45 mM’lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm’deki absorbans değeri 0.750±0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α-Tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayinini için hazırlanan standart grafik

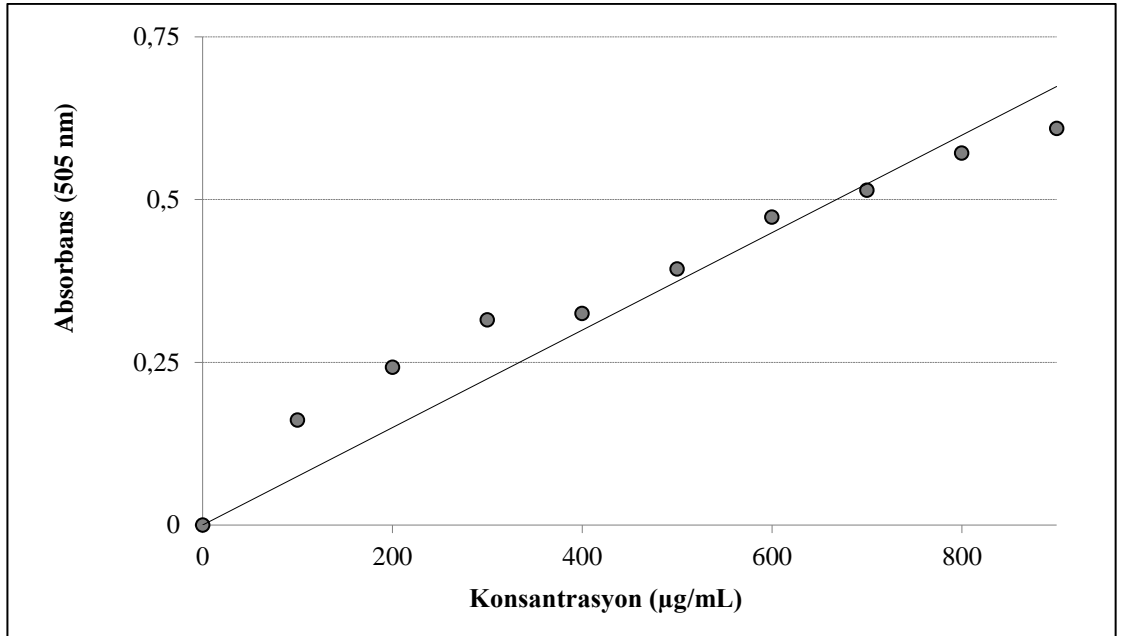


Şekil 4.48. Farklı konsantrasyonlardaki kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

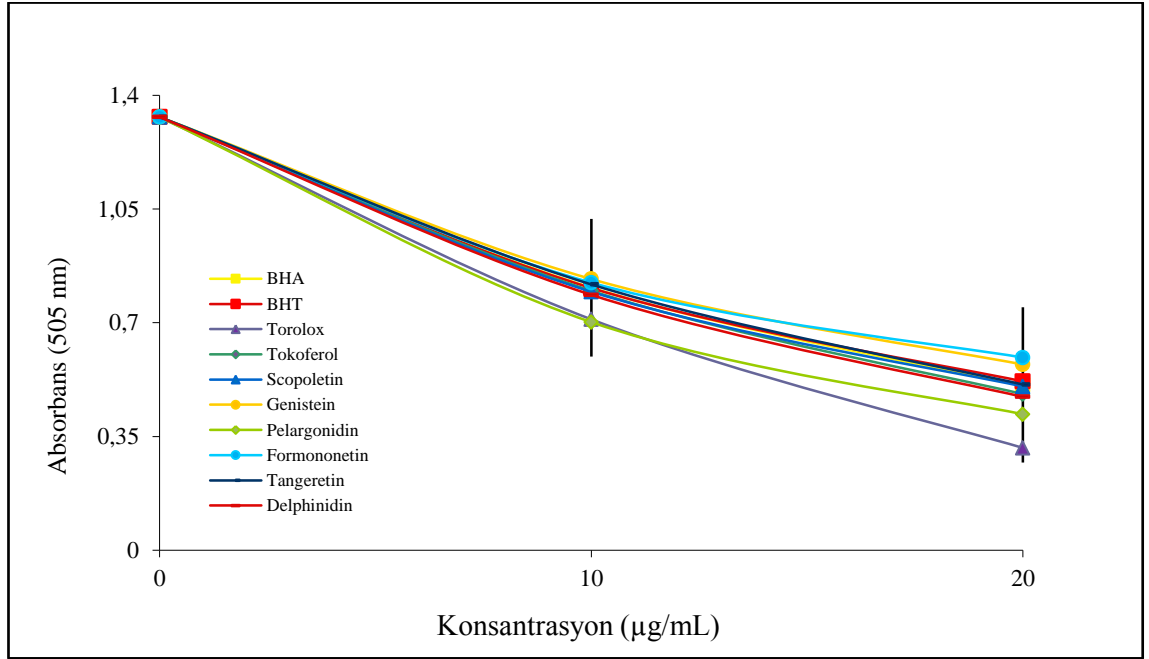
Kumarin türevlerinin ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.48) her standart ve kumarin türevleri için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı.

4.2.6. DMPD⁺ radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan kumarin türevlerinin BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DMPD⁺ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (Şekil 4.49). DMPD⁺ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD⁺ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı. Pozitif kontrol olarak BHA ve Troloks kullanıldı (Şekil 4.49).

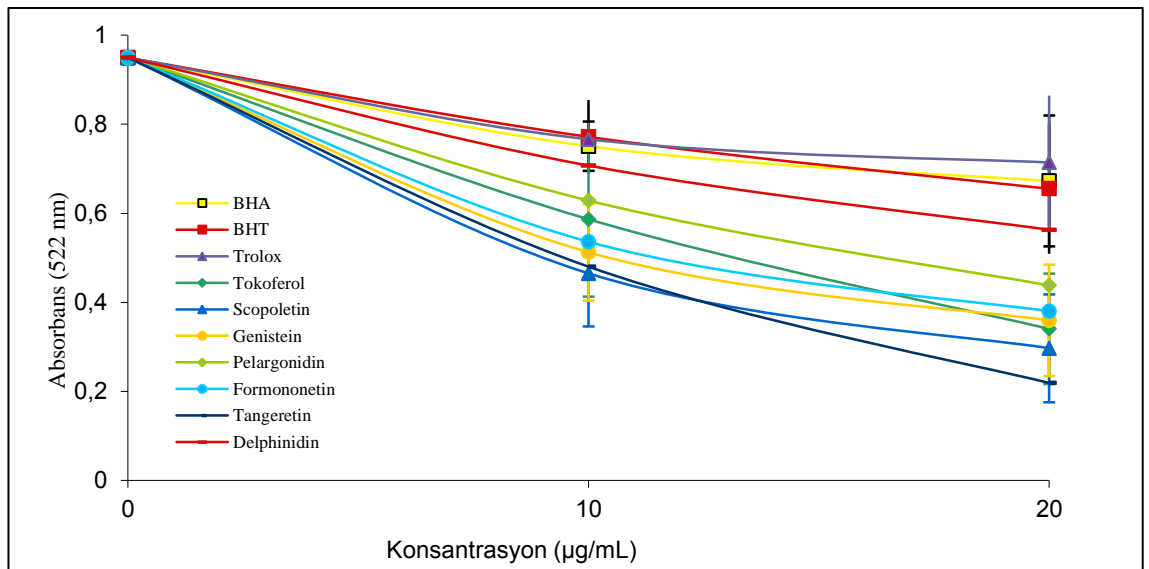


Şekil 4.49. DMPD⁺ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik



Şekil 4.50. Kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) konsantrasyonundaki DMPD⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması

4.2.7. Bipiridil Metal Şelatlama aktivitesi bulguları



Şekil 4.51. Kumarin türevlerinin (10-20 µg/mL) konsantrasyonundaki Bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması

Kumarin türevi maddelerin DPPH·, ABTS⁺, DMPD⁺ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC₅₀ değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerler, Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Kumarin türevlerin DPPH·, ABTS⁺, DMPD⁺ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC₅₀ ve r² değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.

	DPPH·		ABTS ⁺		DMPD ⁺		Bipiridil Metal şelatlama	
	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²
BHA	5,02	0,987	10,82	0,961	14,44	0,999	38,50	0,950
BHT	4,62	0,947	13,86	0,999	14,44	0,998	36,47	0,995
Troloks	7,53	0,996	23,90	0,768	9,90	0,994	43,31	0,906
α-Tokoferol	14,14	0,986	25,66	0,733	13,58	0,999	13,59	0,998
Scopoletin	31,50	0,999	26,65	0,708	14,14	0,998	11,36	0,980
Tangeretin	28,87	0,989	24,75	0,716	14,43	0,999	9,63	0,998
Formononetin	30,13	0,983	26,65	0,999	16,5	0,999	14,44	0,994
Genistein	43,31	0,983	26,65	0,672	16,11	0,986	13,59	0,976
Delphinidin	4,44	0,996	14,14	0,709	13,33	0,996	25,67	0,972
Pelargonidin	11,17	0,995	16,90	0,984	11,74	0,996	17,77	0,998

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, metabolizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve yüzde yüzlük bir ürün oluşumunu sağlayan, hiç bir yan ürün oluşumuna meydan vermeyen biyokatalizörlerdir (Smith 1997; Garrett and Grisham 1999; Topal and Gülçin 2014). Enzimatik reaksiyonlarda substratlar farklı moleküllere yani ürünlere dönüşürler. Canlı metabolizmadaki tepkimelerin neredeyse tamamının gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyar. Enzimler substratları için son derece seçici oldukları için, ve pek çok olası tepkimeden sadece birkaçını hızlandırdıklarından dolayı, bir hücredeki enzimlerin kümesi o hücrede hangi metabolik yolların bulunduğunu belirler. Enzimler ileri ve geri tepkimeyi eşit derecede katalizler. Dengeyi değil, ona ulaşma hızını değiştirirler. Örneğin, karbonik anhidraz, substratların konsantrasyonuna bağlı olarak tepkimesini her iki yönde de katalizleyebilir (Smith 1997; Garrett and Grisham 1999; Topal and Gülçin 2014).

Karbonik anhidraz (CA, E.C. 4.2.1.1) enzimi birçok dokuda başarılı bir şekilde saflaştırılarak ve karakterize edilmiştir. CA enzimi pH düzenleyici bir enzim olarak bilinmektedir. Oldukça hızlı bir reaksiyon olan, karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) dönüşüm reaksiyonunu katalizler (Gülçin *et al.* 2004f; Güney *et al.* 2014; Arabaci *et al.* 2015). Karbonik anhidraz bu reaksiyonu katalizlediğinde reaksiyon hızını arttırarak saniyede 10^4 - 10^6 reaksiyon hızına kadar ulaşmasını sağlar (Çoban *et al.* 2007). Bu durum enzimlerin olağanüstü katalizleme gücünü bir anlamda ortaya koymuş olur (Göksu *et al.* 2014; Boztaş *et al.* 2015; Göçer *et al.* 2015).

CA enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanında ayrıca birçok dokuda da H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynar. Bu şekilde vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında rolü olduğu ortaya çıkartılmıştır. Bu dokulara örnek olarak böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi verilebilir (Akbaba *et al.* 2014; Akıncioğlu *et al.* 2015). CA ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Özellikle son yıllarda CA izoenzimi, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, histokimyasal metotlarla kaslarda, tükürük

bezleri, prostat, sinir miyelin kılıfı, pankreas, beyin ve endometrium dokularından, çeşitli bakteriler ve bitkisel kaynaklardan saflaştırılmış, karakterize edilmiştir (Beydemir and Gülçin 2004; Yıldırım *et al.* 2015).

Karbonik anhidraz ilk defa eritrositlerden 1933 yılında saflaştırılmış (Tripp *et al.* 2001) daha sonra yapılan yoğun çalışmalarda üç farklı tipte karakterize edilmiştir. 1940'larda ise CA'nın CO₂'in dehidrasyonunu katalizlediği ve bunun sonucu olarak da bikarbonat (HCO₃⁻) ve protonunun (H⁺) ana kaynağı olduğu belirlendi (Davenport *et al.* 1940). 1948'de ise Puscas CA'nın periteral hücrelerde merkezi bir role sahip olduğunu düşündü. Yapmış olduğu bir seri çalışmada gastrik asit sekresyonunu (histamin, pentagastrin, asetilkolin and kalsiyum iyonlarını) doza bağlı olarak gastrik mukoza CA'nı aktive ettiğini Wilbur–Anderson'ın elektrometrik ve kolorimetrik metotları (1948) ile Maren basitleştirilmiş mikrometdunu (1960) kullanarak kanıtladı (Puscas, 1979; Puscas *et al.* 1980). Bu fenomenin geçerliliği 1984 yılında, kobayların oksintik hücreleri üzerinde doğrulandı. Bütün salgılatıcıların aktivitesi, CA ile proton pompa arasında fonksiyonel bir bağ oluşturan H149/94 ürünü tarafından inhibe edildi (Vinik AI, Heldsinger, 1984). Bununla beraber CA'da histaminin etkisini ratlarda ilk olarak 1966'da belirlendi (Dobrescu, 1966) ve 1970'lerde de doğrulandı (Salganik *et al.* 1972). Ayrıca 1999 yılında Omeprazol'un gastric mukoza H⁺/K⁺-ATP-az ve CA'sını inhibe ettiğini gösterildi (Puscas 1999). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise CA izoenzimlerinin farklı inhibitörler tarafından nanomolar ve hatta pikomolar düzeyde inhibe edildiğini gösterdi.

Şimdiye kadar α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA olmak üzere toplam altı farklı CA sınıfı belirlenmiştir (Boztaş *et al.* 2015; Yıldırım *et al.* 2015). Bunlardan α -, β -, δ - ve η -CA aktif bölgelerinde bir çinko (Zn²⁺) iyonu bulundururken, γ -CA'nın muhtemelen Fe²⁺ iyonunu ve γ -CA'da Cd²⁺ iyonunu içerdiği bilinmektedir (Gül *et al.* 2015). İlk tespit edilmiş ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış izoenzimleri bünyesinde bulunduran α -sınıfındaki enzimler monomerik yapıdadır. α -Sınıfı karbonik anhidrazların katalitik mekanizmasında aktif bölgeden protonun dış çözücü ortamına aktarılmasında His-64 birimi aracı rol oynamaktadır. Proton His-64'e onunla çinko atomu arasındaki su

molekülleri aracılığıyla aktarılır. Yapılan çalışmalar Lys-91 ve Tyr-131 birimlerinin de proton transfer mekanizmasında rol aldığını göstermektedir. β -Sınıfındakiler çiftler şeklinde dimerler, tetramerler, hegzamerler ve oktamerler halindedirler. Bu sınıfa ait ilk kristal yapı 2000 yılında bildirilmiştir. Önceleri sadece bitkilerde bulunduğu sanılan bu sınıftaki izoenzimler sonraları alg, bakteri ve arkeon türlerinde de tespit edilmiştir. Bu sınıftaki izoenzimlerde aktif bölgedeki Zn atomu iki sistein ve bir histidin ligandlarıyla bağlanmaktadır. Dizi analizleri bu sınıftaki izoenzimlerde yalnızca beş aminoasit biriminin ve aktif bölgede üç çinko ligandının, bir aspartat ve bir de arginin birimlerinin korunmuş olduğunu göstermektedir. Üçüncü sınıf olan γ -CA izoenzimleri trimer yapıda olup bu sınıfın yapısı aydınlatılmış tek üyesi 1994'te *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilmiştir. İzole edilen bu izoenzimin Zn^{2+} yerine Co^{2+} kullanıldığında daha yüksek hidrataz aktivitesi gösterdiği ve p-nitrofenil asetatla esteraz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Son zamanlarda *Thalassiosira weissflogii*'den izole edilen CA'nın diğer CA sınıflarından ayrı bir sınıfa (δ -sınıfı) ait olduğu bildirilmiştir. Bu CA izoenzimlerine yapısal ve amino asit dizilişi bakımından benzememektedir. Metal bağlanma bölgesinde α -sınıfındaki gibi üç histidin birimi ligand oluşturmaktadır, ancak bunların ikisi bir monomere, bir tanesi ise bitişikteki monomere aittir. İnsanlarda ise 12 farklı α -CA izoenziminin kodlandığı bilinmektedir. Bu izoenzimleri moleküler özellikler, oligomerik düzenlenmeler, celluler lokalizasyon, organ ve dokulardaki dağılım, ekspresyon düzeyleri ve kinetik özellikleri açısından birbirlerinden farklıdır. (Şentürk *et al.* 2009; Güney *et al.* 2014). Bunlardan beş tanesi sitozolik (CA I, II, III, VII ve XIII), beş tanesi de membrana bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), iki tanesi mitokondriyal (CA VA ve VB), bir tanesi de salgısaldır (CA VI). Ayrıca üç tane de non-katalitik CA izoformu (CA VIII, X and XI) da bulunmaktadır ki bunların fonksiyonları henüz çözülememiştir (Öztürk Sarıkaya *et al.* 2010; Sethi *et al.* 2013; Topal and Gülçin 2014). Bütün canlılarda şimdiye kadar toplam 16 tane CA izoenzimi bulunmuş ve karakterize edilmiştir (Pastarekova *et al.* 2004; Akıncioğlu *et al.* 2013; Çetinkaya *et al.* 2014). Bitki CA enzimleri ile hayvan CA enzimleri arasında çeşitli farklılıkların olduğuna dair çalışmalar da saptanmıştır (Atkins *et al.* 1972). Enzimin bitkilerdeki molekül kütlesi 160 kDa ile 260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu tespit edilirken memelilerdeki molekül kütlesi ise 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002).

CA izoenzimleri ile ilgi çalışmaların yoğun bir şekilde yapılmasının sebepleri ise şöylece sıralanabilir:

1. CA'nın monomerik bir enzim olması
2. Moleküler kütlesi 30 kDa olarak ne çok büyük ne de çok küçük bir protein olması,
3. CA proteinin tek bir polipeptit zincirine sahip olması,
4. CA I ve II izoenzimlerinin en yaygın formlarının olması,
5. Polipeptit zincirinde disülfid bağının olmaması
6. Polipeptit zincirinde şeker ve fosfat guruplarının olmaması,
7. Özellikle CA II izoenziminin çok ucuz olması ve hemen hemen her yerde hazır olarak satılabilmesi,
8. Diğer enzimlere nisbeten daha kolay bir saflaştırma prosedürüne sahip olması,
9. Çoğu CA izoenzimlerinin amino asit sekanslarının biliniyor olması

Enzim inhibitörleri enzime bağlanarak onun aktivitesini azaltan ve hatta yok eden moleküllerdir. Bir enzimin aktivitesini engellemekle bir patojeni öldürebildiği veya bir metabolik dengesizliği düzeltebildiği için, çoğu ilaç aslında birer enzim inhibitörüdür. Ayrıca herbisit ve pestisit olarak da kullanılırlar. Enzimlere bağlanan her molekül inhibitör değildir; enzim aktivatörleri enzimlere bağlanıp onların enzim aktivitesini artırır. CA inhibitörleri, CA izoenzimlerinin fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Sayısız CA inhibitörleri genel olarak dört temel grupta sınıflandırılabilir. Bunlar:

1. Aromatik halkalar veya fenolik bileşikler
2. Sülfonik asit türevleri
3. Sülfamid ve sülfonamidler
4. Halojenürler, asitler ve tiyosiyanat gibi küçük monoanyonlar

Karbonik anhidrazın memeli türlerinden izolasyonunda kaynak ve izoenzime göre farklı yöntem uygulanmaktadır. Üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan izoenzimler sitoplazmik CA I ve II'dir. Bu iki izoenzimin en kolay elde edilebilir kaynağı ise eritrositlerdir. Yapılan çalışmalarda eritrositlerde fazla miktarda bulunan hemoglobin,

kloroform – etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ya da ısı ile denatürasyon yöntemleriyle uzaklaştırılabilmektedir. Bunların yanında üç-faz ayrışma yöntemide bir alternatif olmuştur. Bu yöntemde amonyum sülfat gibi bir tuz tert-butanol-su-protein karışımına ilave edilmiş ve böylece hemoglobin ve miyogloblin denatüre edilerek ayrılabilmiştir. CA I ve II'nin izolasyonunda en çok kullanılan yöntem afinite kromatografisidir. İlk defa 1970 llerde uygulanmaya başlamış olan bu yöntemle sonraları CA I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir. Bu yöntemlerde destek maddesi olan jelle enzimin güçlü bir şekilde bağlandığı inhibitörleri takılmakta ve enzimin bu moleküller aracılığıyla kolonda tutulması sağlanmaktadır. Bu anlamda en çok kullanılan inhibitör de sülfanilamidir (Arslan *et al.* 1996).

Mutasyon teknikleriyle hazırlanan inaktif CA II'nin izolasyonunda inhibitörlerle bağlanmanın olmadığı durumlarda alternatif yöntemler uygulanmıştır. Öncelikle doygunlukta amonyum sülfat ile bazı safsızlıklar uzaklaştırılabilir. Daha sonra %90 amonyum sülfat doygunluğunda insan karbonik anhidraz çöktürülebilir. Yapılan çalışmalarda bu işlemlerden sonra diyalizi takiben DEAE-Sepharose kolonundan geçirme ve sonra S-Sepharose ile kromatografi uygulanarak enzim %98 saflıkta elde edilmiştir. Bir grup araştırmacı da mutant enzim izolasyonunda S-Sepharose ile anyon değişimini, sonra fenil-Sepharose ile hidrofobik etkileşim kromatografisini ve son olarak da Sephacryl S-100 ile jel filtrasyonunu kullanmışlardır. Karbonik anhidraz III'ün afinite kromatografisinde kullanılan inhibitörlere bağlanmasının çok zayıf olmasından dolayı bu izoenzim önceleri farklı yöntemlerle izole edilmiştir. Sonraları bu izoenzimin p-aminobenzen sülfonamide yeteri derecede bağlandığı gösterilmiş ve bu inhibitör kullanılarak enzim afinite kromatografisi ile izole edilebilmiştir. Benzer şekilde membrana bağlı bir izoform olan karbonik anhidraz IV'te p-aminobenzen sülfonamid afinite kromatografisiyle izole edilmiştir (Backman 1981; Whitney and Briggles 1982). Daha sonraları yapılan bir çalışmada mitokondriyal CA V'in izolasyonunda, mitokondriyelerin bütün sitozolik bileşenlerden ayrılmasını takiben dondurucuda bekletilip santrifüjlenmesi ve elde edilen çözünür durumdaki mitokondriyel matriks, p-aminobenzen sülfonamidin CM Biogel A'ya takılmasıyla hazırlanmış jelin bulunduğu

kolondan geçirilmiştir. Enzim sodyum azidür (NaN) ile elue edilerek başarılı bir şekilde izole edilmesi sağlanmıştır (Storey *et al.* 1984).

Salgısal bir izoenzim olan CA VI'nin inhibisyon profili oldukça CA II'ye benzemekte ve inhibitörler ile aynı şekilde etkileşmektedir. Bu nedenle CA II'nin saflaştırılmasında kullanılan afinite kromatografisi teknikleri aynı amaçla CA VI'nin saflaştırılmasında kullanılabilir (Murakami and Sly 1987).

Memeli izoenzimlerinin haricinde diğer CA izoenzimleri de özellikle p-aminobenzen sülfonamid afinite kromatografisiyle kullanılarak izole edilebilmektedir. Bu izoenzimlerin izolasyonunda birçok farklı yöntem de uygulanmıştır. Bunlar arasında Sephadex G-75 CM-selüloz katyon değişimi kromatografisi, jel-permeasyon kromatografisi, DEAE-hidroksilapatit kromatografisi DEAE Sephadex A-50 anyon değişimi kromatografisi, DEAE-selüloz kromatografisi sayılabilir. Bu yöntemler tek başlarına değil genellikle birkaç tanesi kombine edilerek uygulanmıştır. Bu yöntemlerin uygulandığı çalışmalarda istenmeyen proteinlerden kurtulmak için birinci basamakta etanol-kloroform çöktürmesi de sıklıkla uygulanmıştır (Vince and Reithmeier, 2000).

Son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılan uygulamalı Photophysics stopped-flow metoduyla hemen hemen bütün CA izoenzimleri rekombinant DNA teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır (Scozzafava *et al.* 2015a, 2015b). hCa I ve II izoenzimleri için uygulanan en güzel saflaştırma işlemi ise Sefaroz 4B-L-tirosine-sülfanilamid afinite kromatografisidir. Bu yüzden bizde mevcut çalışmada Sefaroz 4B-L-tirosine-sülfanilamid afinite kolonundan taze insan kandan elde edilen hemolizattan hCA I ve II izoenzimlerini saflaştırdık ve saflaştırma sonuçları Çizelge 5.1'de verildi.

Çizelge 5.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları

Numune Türü		Aktive (EÜ/mL)	Toplam hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		350	27	26,21	707,67	9450	13,35	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	CA I	2600	3,50	0,490	3,430	9100	2653	96,29	198,73
	CA II	2176	3,00	0,075	0,225	6528	29013	69,00	2173,20

Protein saflaştırma teknikleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan teknik, afinite kromatografisi tekniğidir. Bu teknik beraberinde biyoteknoloji, biyokimya ve tıp alanında saf enzim elde etmeyi getirdiği için tercih edilen önemli bir teknik olmuştur. Çalışmalarımız süresince, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları, eşit hacimde alınıp bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Afinite kromatografisi ile CA enzimlerinin saflaştırılması sırasında elüatların protein muhtevaları 280 nm de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan aromatik halka içeren amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır (Nar *et al.* 2013).

Dolayısıyla her bir proteinin fenilalanin, tirozin ve triptofan içeriklerinin farklı olması, onların spesifik bir absorpsiyon katsayısına sahip olmalarını gerektirir dolayısıyla bir protein zincirindeki fenilalanin tirozin ve triptofan amino asitlerinin sayısı biliniyorsa, o proteinin 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonundan, protein miktarı da bulunabilir (Gülçin 2002).

Çalışmamızda kalitatif protein tayinleri yanında kantitatif protein tayinleri de yapıldı. Bu tayinler Coomassie-Blue yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı ve tercih edilmesinin sebebi çok kısa sürede uygulanabilir olması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun

süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976). Enzim aktivitesi tayini için ise çalışmamızda iki yöntem kullanıldı.

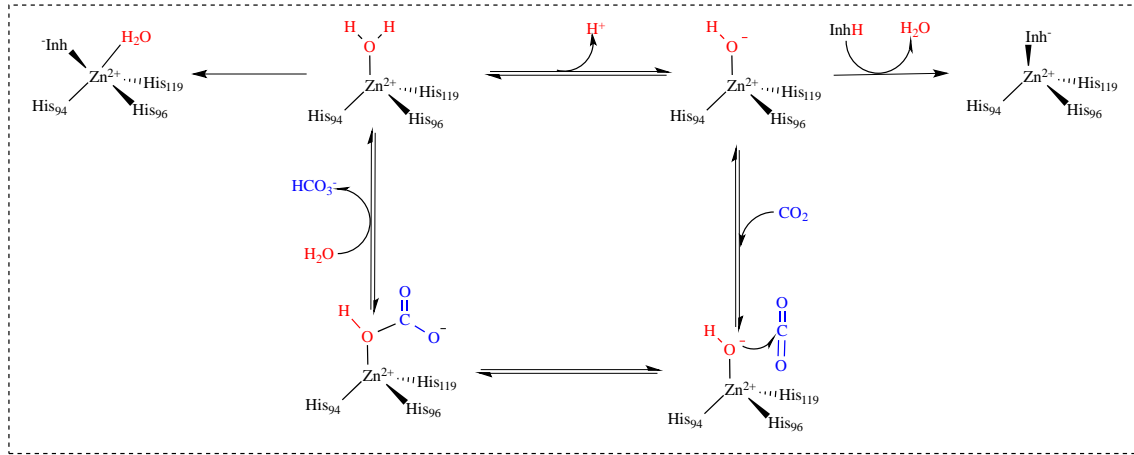
1. Kullanılan birinci aktivite yöntemi esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından modifiye edilen bu yöntemin esası, CA'nın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (Armstrong *et al.*1966). CA enzimi, *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Bu yöntemin seçilmesinin sebebi Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassas olmasıdır. *p*-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce az miktarda asetonda çözüldü, daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak asetonu seçilmesinin sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967).

2. Kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂ hidrataz aktivitesidir (Maren *et al.* 1967). Bu yöntemle CO₂'nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃'ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu aktivite, hCA izoenzimlerinin fizyolojik fonksiyonu olduğundan, kumarin türevlerin hCA izoenzimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla çalışmalarımızda kullanılmıştır.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlenmesinde en sık kullanılan parametrelerden bir IC₅₀ ve K_i değerleridir. Bunun için taze insan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. İnhibisyon etkisi gösteren kumarin türevleri için Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi grafikten IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.2 ve 4.3'de gösterildi.

Enzim ile ilgili yapılan kinetik çalışma olan K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması için yapılan çalışmada Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri ise hCA I izoenzimi için sırasıyla 0,637 mM, 0,409 EU/mL.dak ve hCA II izoenzimi için ise sırasıyla 0,872 mM, 1,234 EU/mL.dak olarak hesaplandı (Şekil 4.3 ve 4.4).

Çalışmamızda enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna kumarin türevleri gibi fenollerin fonksiyonel aromatik -OH gurubunun bağlandığını söyleyebiliriz. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla -OH'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenolik bileşiklerin hCA ya bağlandığı görülmektedir (Şentürk *et al.* 2009).

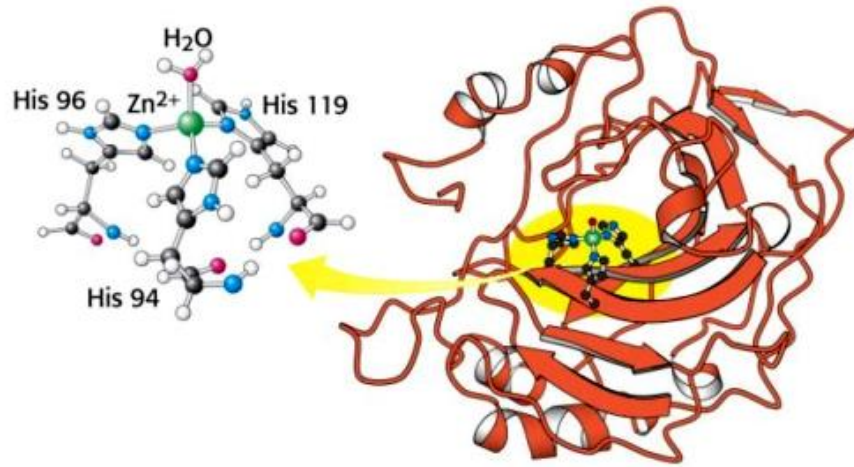


Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik mekanizması ve aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna inhibitörlerin bağlanma şekli

Etkileşme ilk olarak bir CO_2 molekülünün enzimin aktif bölgesine bağlanmasıyla başlar. İkinci basamakta ise enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna bağlı hidroksil iyonunun CO_2 'e nükleofilik olarak saldırmasıyla devam eder. Bunun sonucunda HCO_3^- iyonu oluşur. Son basamakta ise yapıya bir molekül su girişi ile HCO_3^- hidroliz olarak açığa çıkar (Topal and Gülçin 2014).

CA I , CA II ve kas izoenzimi olarak da bilinen CA III izoenzimleri üç boyutlu yapıları ve amino asit dizilişleri yönünden benzerlik göstermelerine rağmen aktiviteleri birbirinden farklıdır. CA II izoenzimi, CA I izoenziminden 60 ile 100 kat daha aktif olup katalitik aktivitesi en yüksek izoenzimdir. Aktivitesi en az olan CA III izoenziminin CO₂ hidrataz aktivitesi CA I izoenziminin %5'i kadardır (Wistrand 1980; Ryon *et al.* 1982).

CA enziminin aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu ve bu iyonla bağlı bir hidroksil grubu bulunmaktadır. Reaksiyonların katalizlenmesinde Zn²⁺ iyonunun önemi büyüktür. Aktif bölgede bulunan 15 Å derinliğindeki yarık H₂O veya OH⁻ iyonu ve His-94, His-96 ve His-119'dan oluşan üç histidin rezidüsü ile koordine edilmiştir. Metal iyonu bu yarığın tabanında yer alır. Aktif bölge yakınındaki aminoasitler proton verici ve proton gradienti oluşturacak biçimde düzenlenmiştir (Şekil 5.2).

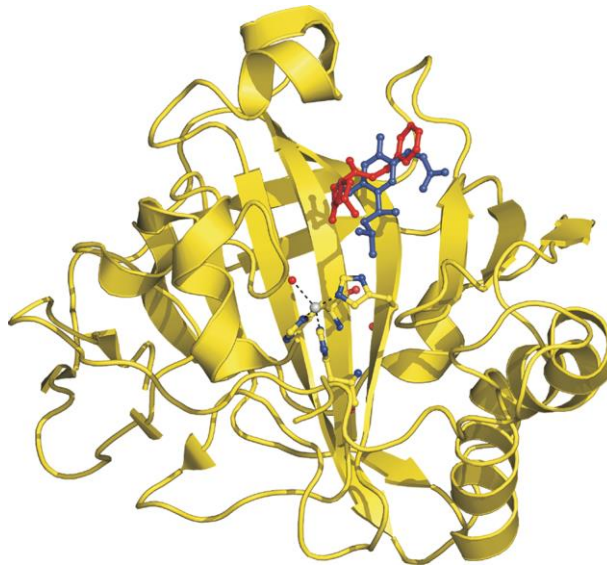
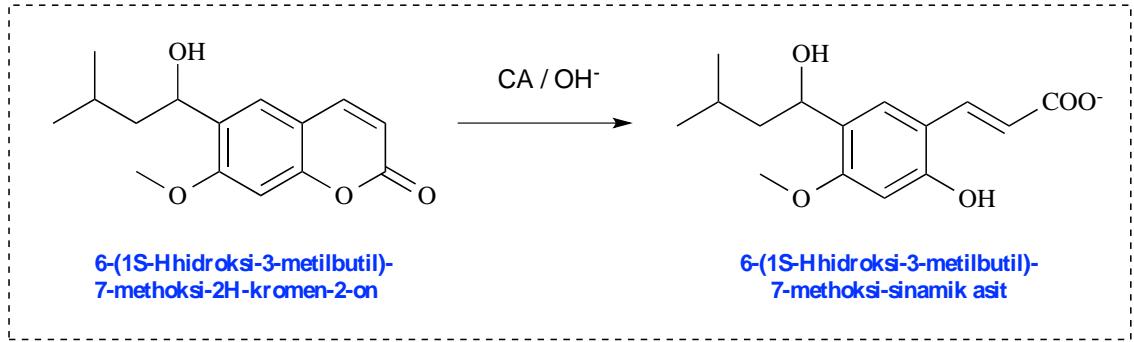


Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri

Son zamanlarda doğal ürünler farmakolojik açıdan aktif ajanların en önemli doğal kaynağını oluşturmuşlardır. Kumarinler (2H-kromen-2-on, 2H-1-benzoiran-2-on), δ-lakton halkasını içeren ve bitkilerde bulunan en geniş, en önemli ve oksijen içeren heterosikliklerin bileşik sınıflarından biridir (Murray *et al.* 1982). Kumarinler ve türevleri geniş bir biyokimyasal ve farmakolojik aktivite spektrumuna sahiptirler (Khan *et al.* 2004; Rehman *et al.* 2005). Warfarin gibi bazı kumarin türevlerinin tromboflebit,

pulmoner emboli gibi bazı kalp hastalıklarında aşırı veya istenmeyen pıhtılaşma durumlarında antikoagulan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca ölümcül kanamalara sebep olmalarından dolayı rodentisit olarak da kullanılırlar (Budzisz, 2004). Ayrıca son zamanlarda artan aşırı nüfus yoğunluğu kozmetik, gıda ve ilaç endüstrilerinin bir çok varyasyonlarına öncülük etmiştir. Bundan dolayı farklı kumarin çeşitlerinin özellikle metabolizmada önemli ve fizyolojik fonksiyonlara sahip olan enzimlerin aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir (Hopa *et al.* 2014). Bu bağlamda farklı kumarin türevlerinin karbonik anhidraz (Maresca *et al.* 2009; 2010), paraoksonaz (Erzengin *et al.* 2012) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (Erzengin *et al.* 2012) enzimleri üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir.

Kumarin ve sülfokumarinlerin seçici CA izoform inhibisyon profiline sahip olduğu bilinmektedir. 6-Triazolyl-substitie edilmiş sülfokumarinlerin tömür bağlantılı karbonik anhidraz IX and XII izoenzimlerinin güçlü ve selektif inhibitörleri olduğu ve her iki izoenzimleri sırasıyla 7.2-875.0 ve 5.5-44.0 nM düzeylerinde inhibe ettiği bildirilmiştir. (Grandane *et al.* 2014). Yine benzer şekilde glikozillenmiş kumarin türevlerinin tömür bağlantılı karbonik anhidraz IX and XII izoenzimlerinin nanomolar seviyede inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Touisni, *et al.* 2011). Ayrıca bir Avustralya bitkisi olan *Leionema ellipticum*'den izole edilmiş 6-(1S-hidroksi-3-metilbutil)-7-metoksi-2H-kromen-2-on doğal kumarin ürünün CA inhibitörü olduğu bilinmektedir (Maresca *et al.* 2009). Bunun gibi bazı tiyokumarin türevlerinin de CA izo enzimlerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Maresca *et al.* 2010). Kumarinler ve sülfokumarinlerin CA'nın aktif bölgesine bağlandıktan sonra hidrolizleri sonucu meydana gelen hidroksi-sinamik asit ve 2-hidroksifenil- ω -etenilsulfonik asitlerden oluştuğu bilinmektedir. Oluşan bu ürünler de CA izoenzimlerinin tamamını nanomolar seviyede inhibe etmektedir (Alterio *et al.* 2012). Bu şekilde hCA II'nin katalizlemesi sonucu 6-(1S-hidroksi-3-metilbutil)-7-metoksi-2H-kromen-2-on kumarininden oluşan 4-(1S-3-metilbutil)-3-metoksi-sinamik asit bu konuya açıklık getirmesi açısından oldukça büyük önem arz etmektedir (Alterio *et al.* 2012).



Şekil 5.3. hCA II-inhibitör etkileşiminin süperpozisyonu: 4-(1S-3-metilbutil)-3-methoksi-sinamik asit mavi olarak gösterilmiştir. hCA II şerit diyagram olarak temsil edilmiştir. Ayrıca Zn²⁺ koordinasyonu da gösterilmiştir

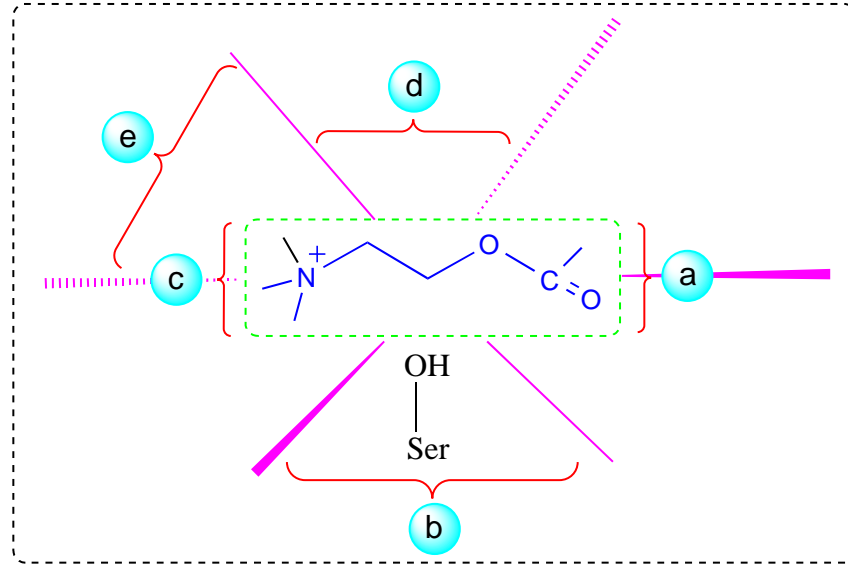
Ayrıca birçok CA IX/XII-selektif kumarin ve sulfokumarin inhibitörleri de bildirilmiştir (Maresca *et al.* 2009; 2010; Touisni *et al.* 2011; Carta *et al.* 2012; Bonneau *et al.* 2013; Tars *et al.* 2013; Davis *et al.* 2013). Yapılan kristalografik çalışmalarda kumarinlerin genellikle van de Waals etkileşimleri ile Ile91, Gln92, Val121, Phe131, and Leu198 amino asit rezidülerine bağlandığını göstermiştir. Yine yapılan gözlemlerde kumarinlerin Zn²⁺ katalitik iyonu ile herhangi bir etkileşim göstermediğini ortaya koymaktadır (Temperini *et al.* 2010; Alterio 2012). Yani kumarinlerin enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ na direk olarak bağlanmadığını göstermektedir (Touisni *et al.* 2011). Kumarinlerin bu şekilde bağlanmaları sulfonamidlerin bilinen inhibisyon mekanizmasından farklı olarak biyomedikal uygulamalarda yeni CA inhibitörlerinin

tasarımı için yeni bakış açıları göstermektedir. Çalışmalarımızda kullandığımız kumarin türevlerinin de yukarıda anlatıldığı gibi benzer şekilde CA I ve II izoenzimleri etkileyeceğini tahmin edilmektedir. Çalışmada kullanan kumarin türevleri hCA I izoenzimi için K_i 102.10-969.00 μM aralığında ve hCA II için ise K_i 36.20-905.05 μM aralığındaki değerlere sahip olduğu gözlemlendi. Düşük K_i ve IC_{50} değerlerine sahip kumarin türevleri, kuvvetli inhibisyon etkisi gösterir.

Enzim ile ilgili yapılan çalışmaların ikinci kısmında kumarin türevlerinin AChE üzerine inhibisyon etkileri belirlendi. Kolinesterazlar genellikle AChE ve BChE olarak iki büyük sınıfa ayrılır. Balıkların beyin ve kaslarında genellikle AChE, karaciğer ve plazmada ise BChE daha fazla bulunur (Fulton and Key 2001). Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE'nin, geriye kalan %20'sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Greig *et al.* 2001). AChE eritrosit membranlarında, sinir dokusu ve iskelet kaslarında bulunan bir enzimdir ve asetilkolinin hidrolizinden sorumludur. Bir adet AChE enzimi dakikada 4×10^5 adet ACh molekülünü hidrolize eder ve 150 ms'lik turnover süresi, onu en etkin hidrolitik enzim yapar (Chang and Strichartz 2005). Sinir sinyallerinin sinir liflerinden düz kaslara ve iskelet kaslarına, salgı bezlerine ve otonom sinir düğümlerine, aynı zamanda merkezi sinir sistemi içerisinde düzgün bir şekilde iletilmesinde asetilkolinesteraz enziminin kritik bir rolü vardır (Demirdöğen 2010; Arabacı 2015).

Enzim α heliks ve β tabakalarından oluşur. Sarı renk ile gösterilmiş 14 aromatik rezidü aktif bölgenin çevresinde sıralanmışlardır. Aktif bölgede bulunan Serin, Glutamat ve Histidin amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda AChE inhibisyonu, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin normal nörotransmisyonu ile etki edebilen kimyasalların nörotoksik etkilerini belirlemede kullanılır. Organofosfatların, karbamat pestisitlerin (Hamers *et al.* 2000; Fulton and Key 2001), enantiyomerik inhibitörlerin (Lin *et al.* 1998), metallerin ve non-pestisit kontaminantların AChE aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Bocquene *et al.* 1995; Akcha *et al.* 2000; Roche *et al.* 2002; Bebianno *et al.* 2004; Holth and Tollefsen 2012). Ayrıca AChE'nin alifatik bileşikler ile özellikle de aromatik bileşikler tarafından inhibe

edildiği bildirilmiştir (Lin *et al.* 1998). Yapılan diğer bir çalışmada ise Pasifik *Torpedo californica* elektrik organının AChE enziminin X-ışınları ile yapılan analizi sonucu enzimin beş önemli bağlama sitesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Asetilkolinesterazın aktif bölgesi ile asetilkolin arasındaki etkileşme

AChE enziminde esterik ve anyonik olmak üzere iki etkin kısım bulunur. Negatif yüklü anyonik kısım, iki karboksilli bir aminoasitin iyonize karboksil grubundan ibarettir. Asetilkolinin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esterik kısım ise pozitif yüklü olup, serinin hidroksil grubu ile histidinin bazik imidazol halkasından oluşur. Bazik imidazol halkası, serinin hidroksil grubuna hidrojen bağları ile bağlanarak onun etkinliğini artırır (Vale 1998). Şekil 5.4’de görüldüğü gibi AChE enziminin etki mekanizması şöyle özetlenebilir.

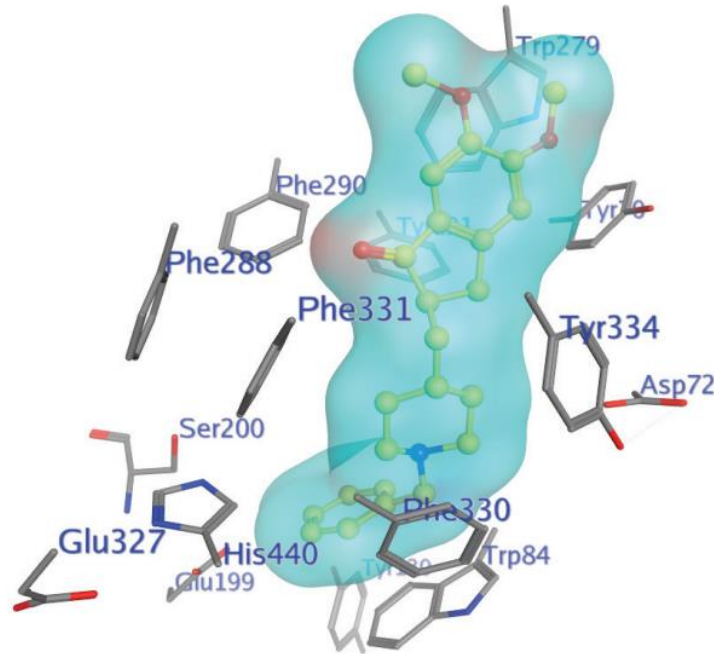
- a. Öncelikle bir oksianyon bölgesi tetrahedral ara ürünü stabilize eder.
- b. Daha sonra aktif bölgeyi oluşturan bir esteraktik site esteratik karbonil grubuna (C-O) saldırır.
- c. Az sayıda negatif yük ve çok sayıda aromatik rezidü içeren bir anyonik substrat bağlama bölgesinde ACh’nin kuarterner amonyum kutbunu içermektedir. Bu grup

aromatik gurupların elektronları tarafından farklı aktif bölge ligantları ile tercihli etkileşim içerisinde olur.

d. Esteratik ve anyonik bir bölgeye bitişik olan ve aynı zamanda aktif bölge-selektif aromatik bağlanma bölgesi olan bu kısım aril substratları ve aktif bölge ligantlarını bağlamada oldukça önemlidir.

e. Son olarak periferel bir anyonik bağlama bölgesi hidrofobik bölgeye bağlanır ve aktif bölgeden gurupların ayrılmasını sağlar.

Bütün yapılan bu çalışmalar açık bir şekilde mekanizma temelli inhibitörlerin dizayn ve araştırılmasına ve ayrıca AChE enziminin de etki mekanizmaları ile ilgili araştırmaları göstermektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için farklı yapılara sahip AChE inhibitörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış AChE enzimi Şekil 5.5’de görülmektedir. Bu inhibitörler de metabolizmaya, etki mekanizmasına ve beyin selektivitesine göre değişmektedir.



Şekil 5.5. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış AChE enziminin aktif merkez oyuğu (Küçükkılınç 2014)

Genellikle; serum, barsak, cilt ve sinir uçlarında bol bulunan BChE ise ACh ve bütirilkolin için aktivite gösterebilmekle birlikte bütirilkolin için daha spesifiktir (Lang *et al.* 1997). BChE'nin rolü henüz tam olarak belirlenememiştir. BChE'nin görevinin dokularda AChE tarafından temizlenemeyen ACh'i uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir ve *Cyprinus carpio*'da beyin dokusunda BChE aktivitesi bulunmamaktadır (Chuiko *et al.* 2000).

Asetilkolin (ACh), balıkların sinir ve nöromuskular sistemlerindeki başlıca nörotransmitterdir (Kirby *et al.* 2000). Bütün kolinerjik nöronlarda asetilkolin sentezi, yıkımı ve depolanması benzerdir. Asetil kolin, Asetil koenzim A ve kolinden asetiltransferaz (ChAT) enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunu tek bir adımda sentezlenir. Bu reaksiyonda kullanılan asetil koenzim A'nın büyük çoğunluğu, mitokondri iç membranında, glikolizis sırasında, pürivat dehidrojenaz enzimi tarafından oluşturularak ChAT'nin bulunduğu sitoplazmaya taşınır. Kolinin yaklaşık %35-50'si, sinaps aralığında AChE tarafından yeniden oluşturulup, ACh sentezinde kullanılan kolinin yarısını içeren akson ucuna taşınır. Merkezi sinir sisteminde, ACh sentezinde kullanılan kolinin üçte biri ise diğer kaynaklardan sağlanır (Chang and Strichartz 2005).

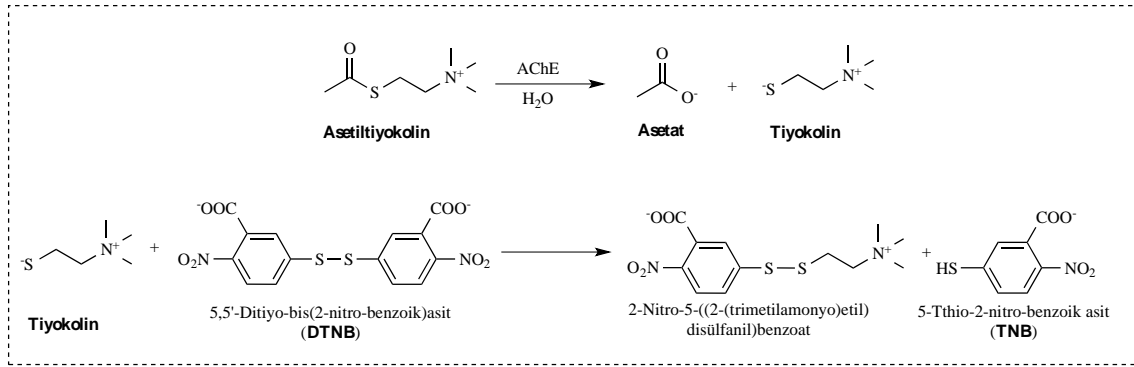
Asetilkolinesteraz enzimi baskılandığında, sinir sisteminde asetilkolin birikmeye başlar ve merkezi sinir sisteminde yüksek miktardaki asetilkolin, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açar (Demirdöğen 2010).

Genellikle altmış yaşın üzerindeki hastalarda ilerleyici zihinsel işlev bozukluğunun en sık nedeni olarak görülen Alzheimer hastalığı (AH), nörodejeneratif bir hastalıktır (Geula and Mesulam 1999). Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte kolinerjik eksikliğin giderilmesi amacıyla asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak, günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en sık uygulanan yöntemdir. Bu amaca yönelik olarak en fazla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (Mesulam 1996; Beach *et al.* 2000). AH'nin ileri dönemlerinde beyindeki AChE aktivitesi %55-67 oranında azalırken, BChE aktivitesi artmaktadır (Perry *et al.* 1978).

Yapılan mikroskopik incelemeler, Alzheimer hastalarında AChE'nin yanı sıra BChE aktivitesinin de aşırı derecede arttığını göstermiştir. Bu durum, AH'nin tedavisinde, AChE'nin yanısıra BChE'nin de inhibe edilmesinin avantajlı olacağını düşündürmektedir (Demirdöğen 2010).

Organofosforlu pestisidler de asetilkolinesteraz inhibitörleri arasında yer alırlar. Enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Bunun sonucu olarak kolinerjik sinir kavşaklarında asetilkolin miktarının artması, düz kasların kasılmasına ve salgı bezlerinin salgı yapmasına sebep olur. AChE aktivitesindeki inhibitör etki, pestisitlerin aynı zamanda, sinir hücrelerindeki enerji metabolizması gibi önemli yaşamsal süreçleri de etkilediğini göstermektedir (Nath and Kumar 1999). Karbamatlı pestisidlerle gerçekleşen AChE inhibisyonu dönüşümlü olmasına rağmen; OP'lu pestisidlerle gerçekleşen inhibisyon dönüşümsüzdür. Asetilkolinesteraz aktivitesindeki değişimler OP pestisidlerin organizmalar üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi sırasında bioindikatör olarak kullanılmaktadır (Lang *et al.* 1997). Ayrıca akuatik kirlenmede AChE aktivitesi biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Dembele *et al.* 2000).

Bu çalışmamızda kumarin türevlerinin AChE inhibisyon etkisi değerlendirildi. Ellman metoduna göre inhibisyon türü, K_i ve IC_{50} değerleri belirlendi (Ellman 1961). Çalışmada kullanılan kumarin türevlerinin AChE enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlendi. Bu amaçla kumarin türevlerinin AChE enzimini için IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla 890.74-1262.29 mM and 14.60-47.23 μ M aralığında olduğu belirlendi. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun ikinci basamağında ilave edilen 5,5'-ditiyo-bis(2-nitro-benzoik) asit (DTNB) ile hidrolisi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanil)benzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir (Ellman *et al.* 1961; Göçer *et al.* 2013).



Şekil 5.6. Asetilkolinesteraz enziminin katalitik mekanizması

AChE inhibitörleri geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir (Colovic *et al.* 2013). Zehirler doğal olarak oluşur ve AChE'ı kuvvetli şekilde inhibe ederler. AChE inhibitörleri sinir gazları şeklinde silah olarak kullanılabilirler, insektisit olarak, ilaç olarak ağır kas zaafı anlamına gelen, çabuk yorulma şeklinde ortaya çıkan ve nöromusküler bir hastalık *Myasthenia gravis* tedavisinde, glukoma tedavisinde, postural taşikardi sendromu tedavisinde, antikolinergik zehirlenmelere karşı panzehir olarak, non-depolarizan kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmede, apati gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarını tedavisinde kullanılırlar (Yuschak and Thomas 2006). Ayrıca Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde, demensi (bunaklıkta), hafıza ve öğrenme defektleri gibi nörodejeneratif bozuklukların semptomal tedavilerinde, görsel halüsinasyon gibi psikotik belirtilerde (Singh *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2012), şizofreni hastalarında bilişsel bozuklukların tedavisinde (Ribeiz *et al.* 2010; Choi *et al.* 2013), otizm tedavisinde (Buckley *et al.* 2011), hızlı uykuyu teşvik ve uyku yüzdesini arttırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Handen *et al.* 2011).

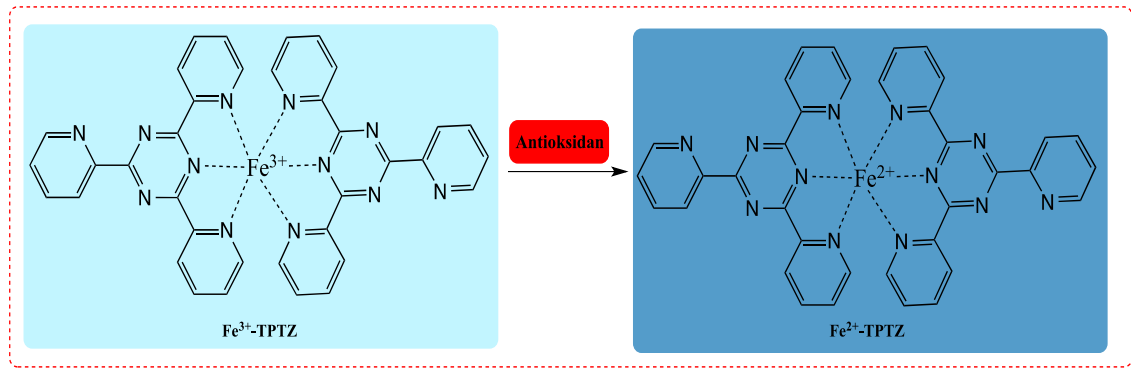
AChE inhibitörlerinin tıbbi alanlardaki bu uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda bu çalışma kapsamında kullanılan kumarin türevlerinin AChE gibi bir metabolik enzimi mikromolar düzeyde inhibe etmesi oldukça büyük önem arz etmektedir. Çalışılan kumarin türevleri AChE enzimini 14.60-47.23 μ M aralığına sahip düşük mikromolar düzeydeki Ki değerlerine sahip olduğu gözlemlendi. Bu değerler Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde kullanılan Rivastigmin ve Galanthamin ile mukayese edildiklerinde oldukça etkili oldukları görülmektedir. Her iki pozitif AChE inhibitörü

AChE enzimini sırasıyla 501.0 ve 4.0 μM gibi IC_{50} değerleri ile inhibe etmektedir (Göçer *et al.* 2015).

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada kumarin türevlerinin hCA izoenzimleri ve AChE ile ilgili inhibisyon araştırmalarının yanısıra yapılarında bulunan fenolik karakterlerden dolayı antioksidan aktiviteye sahip oldukları düşünülerek tez kapsamında değerlendirilmesi çalışmanın kapsamını genişleterek çalışmayı daha etkili ve orijinal hale getirdi. Bu kapsamda Tangeretin, Genistein, Formononentin, Scopoletin, Delphinidin ve Pelargonidin gibi kumarin türevlerinin Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metodu ile Fe^{3+} indirgeme kapasitesi, DPPH \cdot giderme, ABTS $^{+}$) giderme, DMPD $^{+}$ giderme, bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi gibi antioksidan metotlarla ayrı ayrı çalışıldı. Sonuçlar referans antioksidan bileşikler olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile mukayese edildi.

İndirgeme kapasitesini belirlemek amacıyla tasarlanmış birçok farklı metot mevcuttur (Wood *et al.* 2006). Tez kapsamında ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi ile birlikte kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduyla Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesi de çalışıldı (Şekil 5.7). Bu bağlamda ilk çalışılan metot, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metodunun çalışıldığı ortamın pH'sı 6.6 civarındadır. Ortamın pH'sı değiştirildiğinde düşük pH'da Fe^{3+} 'ün Fe^{2+} 'ye indirgenmesi ile renkli Fe^{2+} -TPTZ kompleksinin oluşur. Oluşan bu demir kompleksi oksidan olarak kullanılır ve yeni bir yöntem olan FRAP metodu olarak asidik koşulda indirgeme kuvveti ayrıca belirlenebilir. FRAP metodunun, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre farkı sadece çok daha asidik ortamda ve reaktif kullanarak yapılıyor olmasıdır. Bunun yanısıra Fe^{3+} tuzunun redoks potansiyeli ve ABTS $^{+}$ 'nin redoks potansiyeli ile birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve ABTS $^{+}$ yöntemleri arasında fazla bir fark olmamakla beraber tek fark FRAP'ın daha asidik ortamda (pH 3.6) gerçekleşmesidir. Asidik ortamda ve antioksidanların varlığında Fe^{3+} -TPTZ kompleksi Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redoks çiftinin redoks potansiyelinden daha

düşük potansiyelli birçok bileşik teorik olarak Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeyebilir. Bu nedenle FRAP değerleri daha yüksek çıkabilir. FRAP sonuçları analiz zamanına ve ortamına bağlı olarak değişebilir. Bazı polifenoller daha yavaş hareket eder ve belirlemek için daha uzun reaksiyon zamanı gerekmektedir. Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Ancak diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı, ucuz ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmamaktadır (Huang *et al.* 2005; MacDonald-Wicks *et al.* 2006).



Şekil 5.7. Fe^{3+} -TPTZ- Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesi gerçekleştirilen reaksiyonu

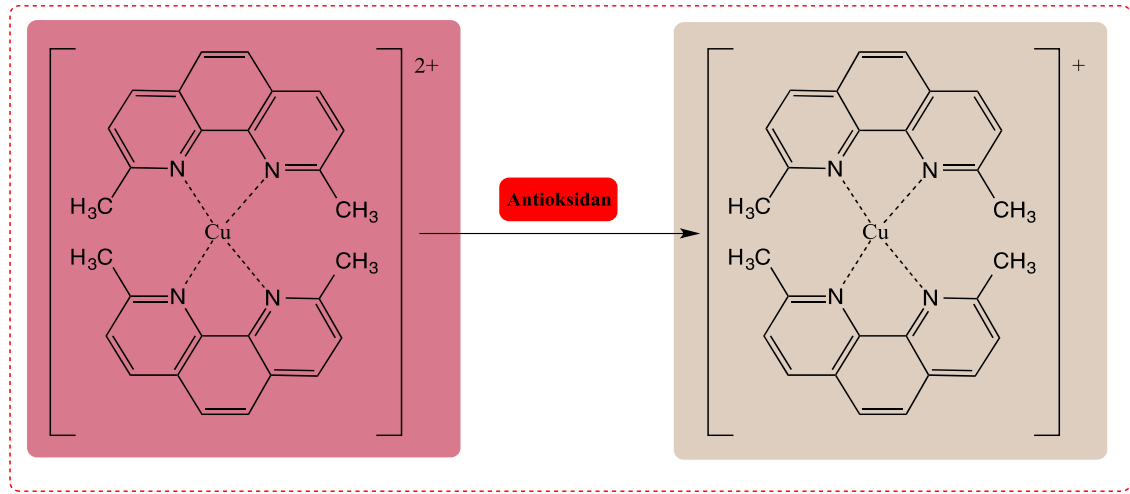
Çalışmamızda en yüksek FRAP metoduyla yapılan Fe^{3+} -TPTZ- Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesinde en yüksek Fe^{3+} indirgeme Tangeretinde gözlemlendi.

Metabolizmada var olan serbest demir ve bakır kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve ardından transferrin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) şeklinde demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır. Ferröz iyonları (Fe^{2+}) halinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Ferritin proteini metabolizmada birçok dokuda bulunabilir. Ferritin nisbeten kan dolaşımında daha az bulunur. Ferritin testi ile vücutta bulunan demir depoları hakkında bilgi sahibi olunur. Demir eksikliğine bağlı anemilerde ferritin değerleri erkenden ve belirli miktarda düşer. Ferritinin yüksek çıkması ise hemokromataz denilen bronz şeker hastalığı, çeşitli enfeksiyonlar ve bazı tümörlerin varlığında ortaya çıkar. Transferrine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazken fazla demir iyonları ise “demir havuzu” denilebilecek olan ferritin ve hemosiferinde depolanır. İnsan plazmasında bulunan bakırın önemli bir

kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formdadır. Seruloplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Normalde durum böyle iken, metabolizmadaki normal dengesinin değiştiği durumlarda hidroksil radikali oluşur (Chevion *et al.* 1993). Oluşan bu radikaller doku hasarlarına sebep olduğundan vücut içerisindeki yabancı organizma ve maddeleri sindirip, yok eden biyolojik hücrelerin diğer bir ifade ile fagositlerin aktivasyonu veya liziz olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu ROS oluşabilmektedir. Serbest radikal oluşumu doku ve hücrelere zarar vererek dolaylı bir yolla geçiş metallerinin yayılmasıyla daha fazla serbest radikal oluşumuna ve onlarında hücredeki zararlarının artmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak bu durum hücre ve doku hasarını daha da hızlandırır. Enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Geçiş metalleri ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek büyük ölçüde hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Gülçin 2012).

İndirgeme kapasitesi bir biyoaktif bileşiğin doğrudan $Fe[(CN)_6]^{3+}$ 'yı $Fe[(CN)_6]^{2+}$ 'ye indirgemesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} 'ün ilavesi, güçlü Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $Fe_4[Fe(CN)_6]$ oluşumuna yol açar ve oluşan kompleks 700 nm'de maksimum absorbands gösterir. Absorbansdaki artış, indirgeme kapasitesi ve kompleks oluşumunda artış olduğunu göstermektedir. Bu yöntemde test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan numunelerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür (Gülçin 2012). 700 nm'deki absorbands ölçüm sonuçlarına dayanarak çalışmada kullanılan kumarin türevlerinin tamamının ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. Bununla beraber en yüksek $Fe[(CN)_6]^{3+}$ - $Fe[(CN)_6]^{2+}$ yükseltgenme kapasitesi delphinidinde gözlemlendi. Bu durum delphinidinde bulunan 2,3-dihidrofurana bağlı hidroksil gurubunun yanısıra biri difenolik ve diğeri de trifenolik olmak üzere toplam beş adet yüksek indirgeme potansiyeline sahip senolik hidroksil gruplarından (-OH) kaynaklanmaktadır.

Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen kuprak metodu, indirgeme kapasitesini belirlemek için geliştirilen bir yöntemdir (2007). Bu metodda, CuCl_2 ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Kullanılan neokuprin, heterosiklik bir organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır. Kuprak metodu, antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi esasına dayanır (Şekil 5.8). Neokuprinin varlığında Cu^{2+} , Cu^+ e indirgenir. Oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorbans verir.

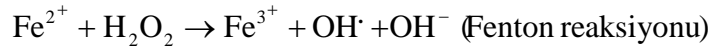


Şekil 5.8. Bir antioksidan tarafından kuprak metoduyla gerçekleştirilen indirgenme reaksiyonu

Bu yöntem, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve seçicidir. İndirgeyici maddenin türü ve hidrofiliği gözetilmeksizin farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir yöntemdir. Bir kromojenik redoks reaksiyonu olan kuprak metodu, fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7,0) gerçekleştirilir (Gülçin 2012). Yapılan çalışmalarda en yüksek kuprik iyonlarının (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi Formononetinde gözlemlendi.

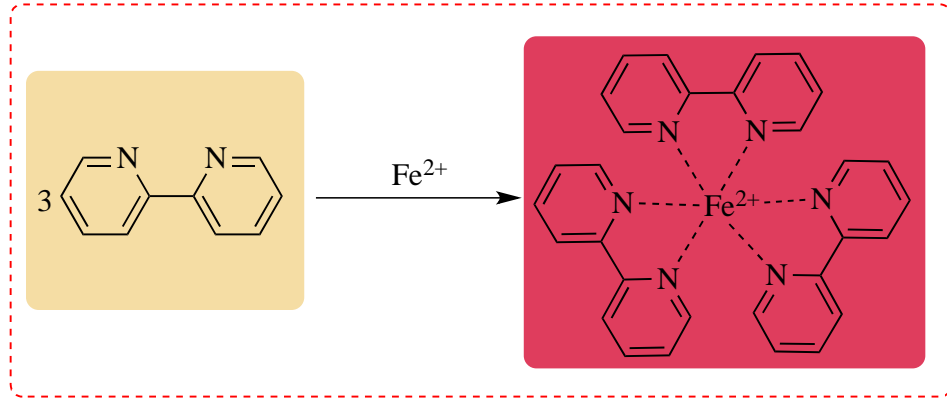
Organizmada ROS oluşumunu arttıran diğer bir neden ferröz iyonları (Fe^{2+}) gibi iyonik türlerdir. Bu nedenle demir şelatlayabilme kapasitesi özelliği maddeler için oldukça önemlidir. Grubumuz tarafından da oldukça yoğun kullanılan metal iyonları şelatlama aktivitesi metotları, metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engelleyecek veya geciktirecek bileşik saptamak için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan

yöntemdir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları (Fe^{2+}), bilinen en tehlikeli, oksidasyona sebep olan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar (Fe^{3+}) da meydana gelebilir. Ferröz iyonları (Fe^{2+}), ferrik iyonlarından (Fe^{3+}) on kat daha fazla reaktiftirler (Miller 1996). Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH^\cdot radikalleri de oluşabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1984; Gülçin 2007).



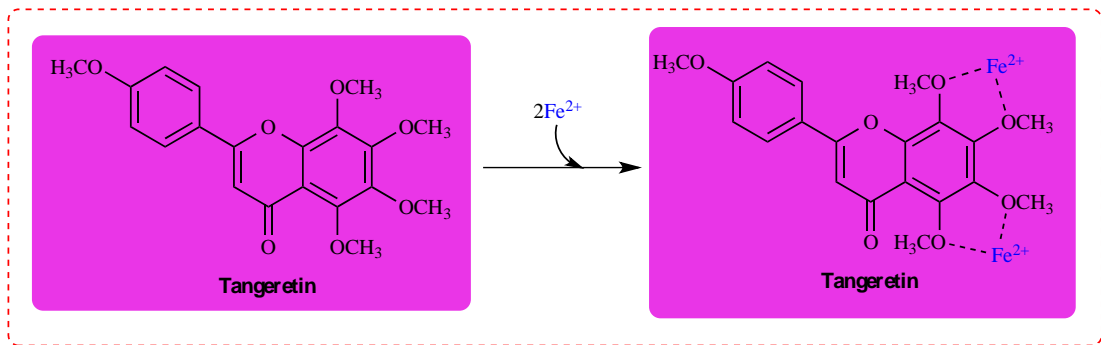
Metal iyonları arasında bilinen en önemli prooksidan iyon, ferröz iyonları (Fe^{2+})'dır. Ferröz iyonları, ferrik iyonlarından on kat daha fazla reaktiftirler. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar (Fe^{3+}) da oluşabilir (Miller 1996; Gülçin 2007). Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radikalleri de oluşabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Gülçin 2007). Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları (Fe^{2+}) konsantrasyonunu en aza indirmekte ve oksidatif hasara neden olan serbest radikal oluşumunu inhibe etmektedir (Gülçin 2007). Biyolojik olarak OH radikali büyük ölçüde Fenton reaksiyonu ile oluştuğu için *in vitro* koşullarda da $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ sistemiyle üretilir ve antioksidanın OH radikali giderebilme gücü ölçülür. Ancak pek çok antioksidan aynı zamanda metal şelatörü olduğu için Fe^{2+} 'nin aktivitesini değiştirebilir. Bu yüzden değerlendirilen antioksidanın iyi bir metal şelatlayıcı mı veya OH radikali giderici mi olduğunun kesin belirlenmemektedir (Becker *et al.* 2004).

Bipiridil metal şelatlama aktivitesinde 522 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesidir (Şekil 5.9). Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi bu iyonların konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara neden olan serbest radikal oluşum inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Gülçin *et al.* 2007b).



Şekil 5.9. Bipiridil molekülleri tarafından ferröz iyonları şelatlama mekanizması

Bununla beraber, $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{SH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{O}-$ ve $-\text{S}-$ fonksiyonel guruplardan iki veya daha fazlasına sahip olan moleküllerin metalleri kolaylıkla şelatlayabilecekleri bildirilmiştir (Gülçin 2012). Bu gurupların bulunması antioksidan molekülün metal şelatlamada yapı-fonksiyon konfügrasyonunun lehinedir. Bu bilgilere dayanarak bir bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile oksidasyonu durdurabilir veya hızını yavaşlatabilir (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2009a). Bu nedenle tez kapsamında belirtilen kumarin türevlerinin de yapısında yer alan guruplar nedeniyle etkili şelatlama aktivitesine sahip olduğu söylenilebilir. Kumarin türevlerinin şelatlama değerleri Çizelge 4.6'da ya da 5.2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kumarin türevlerinin metal şelatlama aktivitelerinin standart antioksidanlardan daha yüksek bulunmuştur. Kumarin türevleri içerisinde en yüksek metal şelatlama aktivitesi Tangeretin tarafından sergilenmiştir. Tangeretin için muhtemel metal şelatlama mekanizması Şekil 5.10'da veilmiştir.

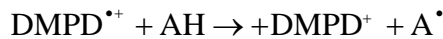
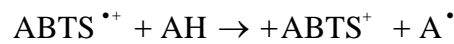
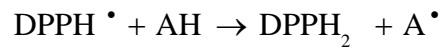


Şekil 5.10. Tangeretin'in muhtemel ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama mekanizması

Çizelge 5.2. Kumarin türevlerin DPPH·, ABTS^{•+}, DMPD^{•+} ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC50 ve r² değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

	DPPH·		ABTS ^{•+}		DMPD ^{•+}		Bipiridil Metal şelatlama	
	Giderme		Giderme		Giderme			
BHA	5,02	0,987	10,82	0,961	14,44	0,999	38,50	0,950
BHT	4,62	0,947	13,86	0,999	14,44	0,998	36,47	0,995
Troloks	7,53	0,996	23,90	0,768	9,90	0,994	43,31	0,906
α-Tokoferol	14,14	0,986	25,66	0,733	13,58	0,999	13,59	0,998
Scopoletin	31,50	0,999	26,65	0,708	14,14	0,998	11,36	0,980
Tangeretin	28,87	0,989	24,75	0,716	14,43	0,999	9,63	0,998
Formononetin	30,13	0,983	26,65	0,999	16,5	0,999	14,44	0,994
Genistein	43,31	0,983	26,65	0,672	16,11	0,986	13,59	0,976
Delphinidin	4,44	0,996	14,14	0,709	13,33	0,996	25,67	0,972
Pelargonidin	11,17	0,995	16,90	0,984	11,74	0,996	17,77	0,998

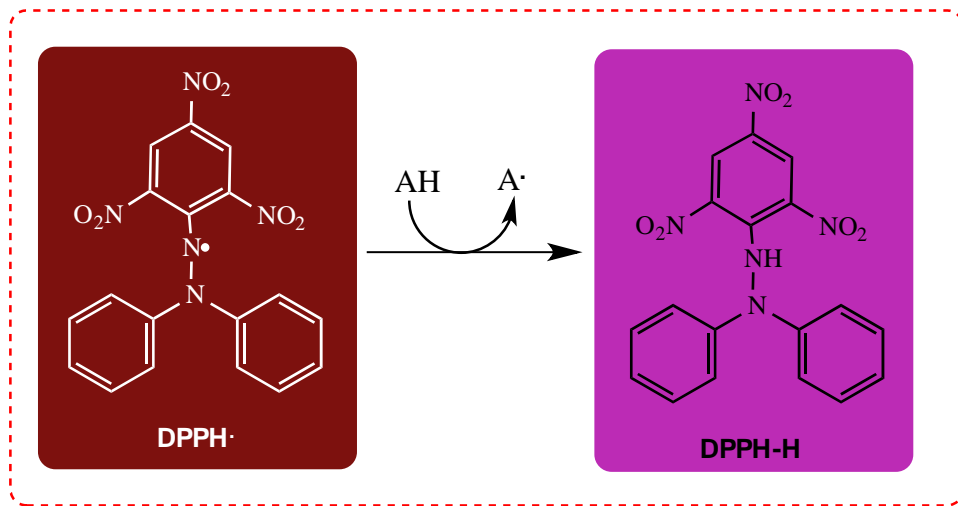
Gıda ve farmakoloji sanayinde kullanılan saf maddelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan metotlar genel olarak DPPH·, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} radikallerinin kullanıldığı birer spektrofotometrik metot olan DPPH·, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} giderme yöntemleridir. Bu özellikleri nedeniyle dolayı doğal ve biyolojik açıdan aktif maddelerin radikal giderme aktivitelerini ve antioksidan kapasitelerini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik *et al.* 2003). Antioksidan maddeler bu yöntemler için hazırlanan DPPH·, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} gibi radikal çözeltilerinden birine eklendiğinde; herhangi bir antioksidan madde çözelti içinde meydana gelen radikal oluşumunu durdurarak reaktif türlerini indirger ve bir renksizleşme meydana getirir.



Menekşe renkli DPPH·, pembe renkli DMPD^{•+} ve yeşil-mavi renkli ABTS^{•+} kromojenik yöntemleri kullanmak ve uygulamak oldukça kolaydır. Ayrıca DPPH·, ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} giderme yöntemleri hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürlerdir. Bu

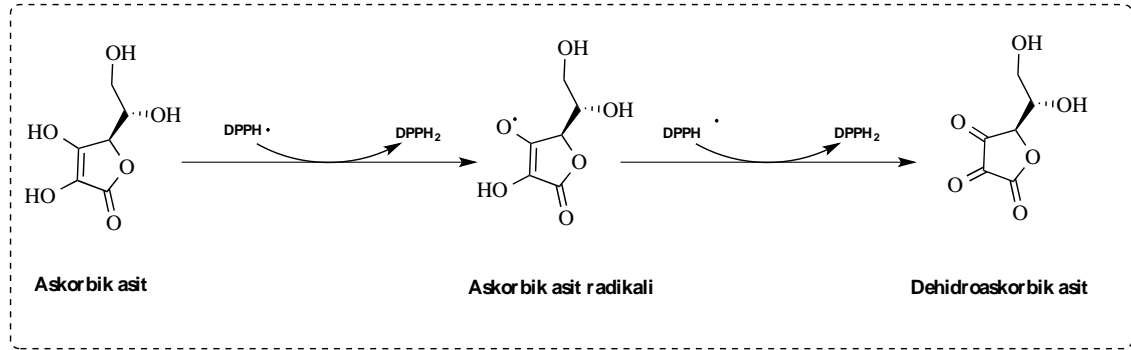
metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir. Kolay ve hızlı olmalarından dolayı bu yöntemler için aynı anda birden fazla maddenin çalışılması mümkündür (Awika *et al.* 2003).

Bu yöntemlerden biri olan ve kullanılan DPPH radikali uzun ömürlü bir serbest radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik *et al.* 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası, hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır (Şekil 5.2). Bu redüksiyonun ardından radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşur ve bu molekül 517 nm'de herhangi bir absorbans vermemektedir. Sonuç olarak DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin $[(AH)_n]$ varlığında DPPH radikali Şekil 5.11'de belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002). L-karnitin antioksidan aktivitesi, DPPH'la beraber α -tokoferol, trolox gibi standart antioksidanlar kullanılır. DPPH çeşitli antioksidan maddelerin serbest radikalleri etkili şekilde giderme etkinliklerinde geniş bir şekilde değerlendirmede kullanılır (Cotelle *et al.* 1996; Özçelik *et al.* 2003).



Şekil 5.11. Bir antioksidan tarafından (AH) DPPH radikalinin giderilme mekanizması

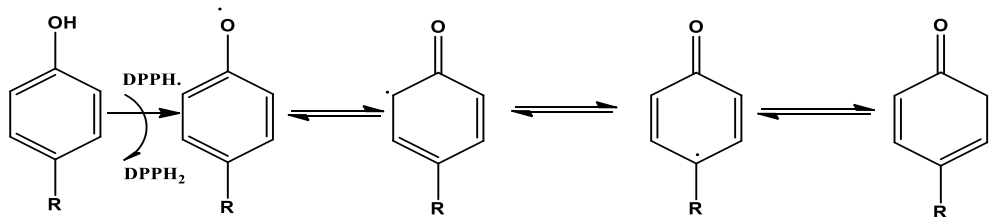
Radikal giderme aktivitesi ile ilgili çok sayıda çalışmanın yanında son zamanlarda mekanizmaların aydınlatılması ile ilgili birçok çalışma da mevcuttur. Gülçin tarafından DPPH radikal giderme aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada L-Karnitin ile DPPH radikal giderme aktivitesi çalışılarak mekanizması aydınlatılmıştır (Gülçin 2006b).



Şekil 5.12. Konjuge gruplara sahip askorbik asit'in DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon

Askorbik asit DPPH radikalleri ile etkileştiğinde askorbik asidin üç nolu karbon atomuna bağlı olan hidroksil grubundan bir adet hidrojen homolitik olarak ayrılarak DPPH·'ı indirgeyerek DPPH-H oluşmasını sağlar. Bu arada askorbik asit askorbil radikaline dönüşür. Askorbik asit ikinci bir DPPH· radikali ile etkileştiğinde ise bu radikali söndürür ve kendisi de Dehidroksi askorbik aside dönüşür (Şekil 5.12).

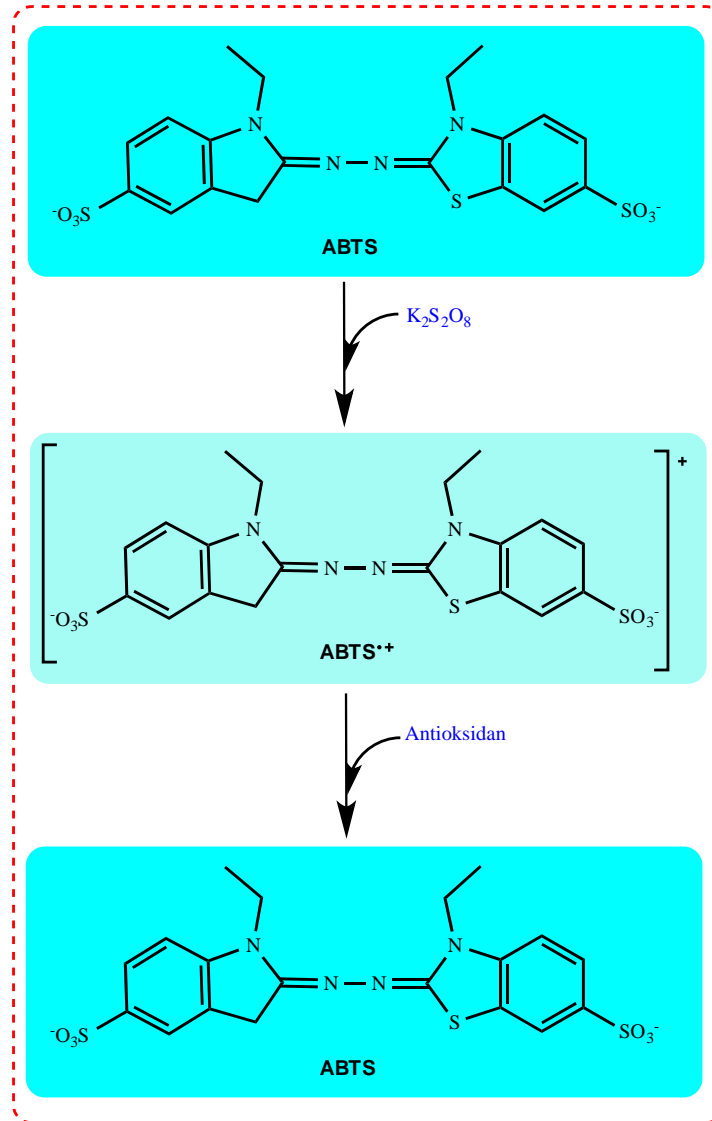
Son zamanda yapılan fenolik halkaya sahip olan moleküllerin DPPH· radikali giderme ile ilgili çalışmalar göz önünde alındığında fenolik yapıdaki bileşiklerin DPPH· radikalini giderme mekanizmaları tahmin edilebilir (Şekil 5.13).



Şekil 5.13. Mono fenoller için muhtemel DPPH· radikali giderme mekanizması

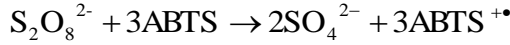
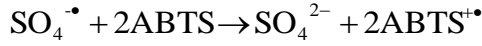
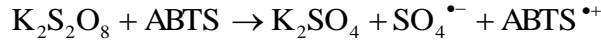
DPPH· serbest radikal giderme aktivitesi gibi $ABTS^{+}$ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstralarının ve saf maddelerin radikal giderme aktiviteleri tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller 1996; Gülçin 2006b).

Bu metotta öncelikle ABTS radikali oluşturmak gerekmektedir. Burada tanımlanan ABTS oluşumu için geliştirilen teknik, ABTS ve bir oksidan olan $K_2S_2O_8$ arasındaki reaksiyon sonucu mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 5.14).

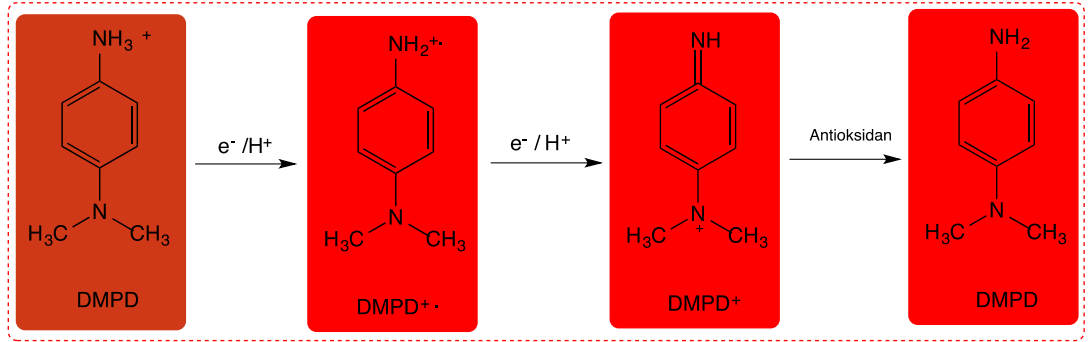


Şekil 5.14. ABTS'nin $K_2S_2O_8$ ile oksidasyonu sonucu ABTS radikalinin ($ABTS^{+}$) oluşumu ve antioksidan molekül tarafından tekrar giderilmesi mekanizması

Bu metot oluşturulan $ABTS^{\cdot+}$ kationunun 734 nm de maksimum absorbans gösterir. ABTS radikal kasyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak potasyum persülfat kullanılabildiği gibi Mn_2O_3 'de kullanılabilir. $K_2S_2O_8$ veya Mn_2O_3 varlığında ABTS'den $ABTS^{\cdot+}$ meydana gelebilir. ABTS radikalleri ABTS / $K_2S_2O_8$ ortamında aşağıda verildiği üzere oluşmaktadır. Burada $K_2S_2O_8$ 'ın yıkımı elektron transferrinden sonra meydana gelebilir. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali şu reaksiyona göre tepkime verir.



ABTS radikalleri, DPPH radikallerinden daha reaktiftirler. Bir H atom transferrini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferrini gerçekleştirir (Kaviarasan *et al.* 2007). ABTS radikalleri giderme mekanizması, yukarıda DPPH radikalleri giderme mekanizmasına benzer özellikler gösterir. Deneysel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir radikal giderme metodu ise $DMPD^{\cdot+}$ giderme aktivitesidir. $DMPD^{\cdot+}$ giderme analizinin temeli, asidik pH'da ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında $DMPD^{\cdot+}$ 'nin kararlı ve renkli bir radikal kasyonu ($DMPD^{\cdot+}$) oluşturması esasına dayanır. $DMPD^{\cdot+}$, 505 nm'de maksimum absorbans gösterir. Şekil 5.15'de görüldüğü gibi $DMPD^{\cdot+}$ 'ye bir H atomu transfer edebilen antioksidanlar koyu pembe rengi söndürür ve sonuçta bir renksizleşme meydana gelir. Bu reaksiyon on dakikadan daha kısadır. Radikal kationunun oluşumu ise yavaştır. Bunun için yapılan çalışmalarda en iyi bulgular, son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk solüsyonu veren $FeCl_3$ ile elde edilir. Üstelik bu metot diğer radikal giderme metotlarında olduğu gibi düşük maliyet ve yüksek tekrar edilebilirlik imkânı da sağlamaktadır.



Şekil 5.15. Kararlı bir radikal olan $\text{DMPD}^{\bullet+}$ 'nin oluşumu ve giderilme mekanizması

Kumarin türevlerin DPPH^{\bullet} , $\text{ABTS}^{\bullet+}$, $\text{DMPD}^{\bullet+}$ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması Çizelge 4.6'da ya da Çizelge 5.2'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında en iyi $\text{DMPD}^{\bullet+}$ radikali giderme Pelargonidin tarafından sergilenmiştir.

DPPH^{\bullet} radikal süpürme yönteminde ve $\text{ABTS}^{\bullet+}$ yönteminde BHA, BHT ve Delphinidin Chloride çok kuvvetli antioksidan özellik gösterir. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ aktivite yönteminde Troloks, Pelargonidin ve delphinidin kuvvetli antioksidan özellik gösterir. Son olarak Bipiridil metal şelatlama aktivitesinde ise tangeretin ve scopoletin çok kuvvetli antioksidan özellik gösterir. Kumarin türevlerinden DPPH^{\bullet} , $\text{ABTS}^{\bullet+}$, $\text{DMPD}^{\bullet+}$ ve bipiridil metal şelatlama aktivitelerinde; en kuvvetli antioksidan özellik gösteren maddeler Delphinidin, pelargonidin, tangeretin ve scopoletin maddeleridir.

Antioksidanlar ile ilgili çalışma bulguları bize göstermiştir ki farklı yöntemlerde farklı kumarin türevleri için çalışılan maddeler farklı özellikler göstermiştir. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kuvvetinde sırasıyla troloks, delphinidin en kuvvetli antioksidan özelliği gösterirken, formononetin en düşük antioksidan özelliği göstermiştir. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvvetinde sırasıyla BHT ve delphinidin en kuvvetli antioksidan özelliği göstermekte iken, formononetin en düşük antioksidan özelliği gösterir. Ferrik indirgeme (FRAP) metodunda sırasıyla delphinidin ve BHT en kuvvetli antioksidan özelliği göstermekte iken, tangeretin en düşük antioksidan özelliği gösterir. DMPD metodunda sırasıyla en kuvvetli antioksidan özelliği gösteren maddeler sırasıyla troloks ve

pelargonidin maddeleri iken, en düşük antioksidan özelliği gösteren madde formononetin kumarin türevidir. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvvetinde, Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvvetinde, Ferrik indirgeme (FRAP) metodunda, DMPD metodunda 4 yöntemde de sırasıyla en kuvvetli antioksidan özelliği gösteren maddeler BHT, troloks, delphinidin ve pelargonidin maddeleridir. Aynı zamanda 4 yöntemde de sırasıyla en düşük antioksidan özelliği gösteren maddeler formononetin ve tangeretin kumarin türevleridir. DPPH radikal giderme metodunda sırasıyla delphinidin, BHT ve BHA en kuvvetli antioksidan özelliği göstermekte iken, genistein en düşük antioksidan özelliği gösterir. ABTS metodunda sırasıyla BHA, BHT ve pelargonidin en kuvvetli antioksidan özelliği göstermekte iken, sırasıyla formononetin ve tangeretin en düşük antioksidan özelliği gösterir. Bipiridil metal şelatlama metodunda sırasıyla tangeretin en kuvvetli antioksidan özelliği göstermekte iken, sırasıyla troloks ve BHT en düşük antioksidan özelliği gösterir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında kullanılan Tangeretin, Genistein, Formononetin, Scopoletin, Delphinidin, Pelargonidin gibi kumarin türevlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi kapsamında yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. İnsan eritrositleri hemolizatından hCA I ve II izoenzimleri Sepharose-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi ile yüksek saflaştırma katsayılarında ve yüksek verimle saflaştırıldı. Saflaştırma SDS-PAGE ile vizualize edildi.
2. Tangeretin, Genistein, Formononetin, Scopoletin, Delphinidin, Pelargonidin kumarinlerinin hCA I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri belirlendi ve mikromolar düzeyde olan bu inhibisyonlar için her bir izoenzim için IC_{50} değeri ile K_i sabitleri hesaplandı. Bu bulgular kullanılan kumarin türevlerinin özellikle glukom gibi hastalıklarda ilaç potansiyelini kazandırmaktadır.
3. Ayrıca çalışma kapsamında kullanılan kumarinlerin elektrik balığından elde edilen ve ticari olarak satın alınan asetilkolinesteraz enzimi (AChE) üzerine mikromolar düzeydeki inhibisyonları ise Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında ilaç olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

4. Ayrıca çalışma kapsamında kullanılan kumarin türevlerinin kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metodu ile Fe^{3+} indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikal (DPPH \cdot) giderme, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS $^{+}$) giderme, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD $^{+}$) giderme, bipyridil reaktifi ile şelatlama aktivitesi gibi metotlarda mutavassıt bir antioksidan aktivite sergilemeleri özellikle gıda ve farmasötik kimyada koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Ak, T., Gulcin, 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. I. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 27-37.
- Akbaba, Y., Bastem, E., Topal, F., Gülçin İ., Maraş, A., Göksu, S. 2014. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of novel sulfamides derived from 1-aminoindanes and anilines. *Archiv der Pharmazie*, 347, 950–957.
- Akcha F., Izuel C., Venier P., Budzinski H., Burgeot T., Narbonne J. F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49, 269-287.
- Akincioğlu, 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.
- Akincioğlu, A., Akincioğlu, H., Gülçin I., Durdağı, S., Supuran, C.T., Göksu, S. 2015. Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoylcarbmates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 3592-3602.
- Akincioğlu, A., Topal, M., Gülçin İ., Göksu, S., 2014. Novel sulfamides and sulfonamides incorporating tetralin scaffold as carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 347, 68-76.
- Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms. *Chem. Review*, 112, 4421-4468.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Anonmyous, 1984. Soymilk in brief. a case that makes sense. STS soya technology systems Ltd. 11 Dhoby Ghaut 11-06 Cathay Building Singapore, 0922.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I. and Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 1496-1547.
- Aquino R, De Simone F., De tommasi N, Moore P, Piacente S, Pizza C. 1992. Isolation and devaluation of anti HIV activity of coumarins and benzofurans from *Werneriaciliolate* and *Werneriadactyolphylla*. *Planta Med*; 58: 631.
- Arabaci, B., Gülçin İ., Alwasel, S., 2015. Capsaicin: A potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Molecules*, 19, 10103-10114.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137-5149.
- Arrigoni, O., De Tullio, M.C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1569 (1-3), 1-9.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. 1996. A new Method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26:163-166,
- Aruoma, O.I., 1998. Free Radicals, Oxidative stress, and antioxidants in human health

- and disease. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 75 (2), 199-212.
- Atkins, CA., Patterson, BD., Graham, D., 1972. Plant carbonic anhydrases. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218-223.
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L, 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum(*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal Agric. Food Chemistry*, 51: 6657-6662.
- Backman, L. 1981. Binding of human carbonic anhydrase to human hemoglobin. *European Journal Biochemistry*, 120, 257-281.
- Beach, T.G., Kuo, Y.M., Spiegel, K. 2000. The cholinergic deficit coincides with Ab deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *Journal Neuropathol Exp Neurol*, 308-313.
- Bebiano M. J., Geret F., Hoarau P., Serafim M. A., Coelho M. R., Gnassia-Barelli M., Romeo M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers* 9, 305–330.
- Becker, E.M., Nissen, L.S., Skibsted, L.H., 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 4, 1012-1014.
- Beydemir, Ş., 1998. İnsan eritrositlerinde bulunan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde bazı ilaçların aktivasyon ve inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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.
- Bilaloğlu, G.V. Harmandar, M., 2000. Flavonoidler, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- 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.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bocquene G., Bellanger C., Cadiou Y., Galgani F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- Bonneau, A.; Maresca, A.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. 2013. Metronidazole-coumarin conjugates and 3-cyano-7-hydroxy-coumarin act as isoform-selective carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28, 397-401.
- Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin İ., Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., Supuran, C.T. 2015. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxy-bromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 640-650.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Buckley, A.W.; Sassower, K.; Rodriguez, A.J.; Jennison, K.; Wingert, K.; Buckley, J.; Thurm, A.; Sato, S.; Swedo, S. 2011. An open label trial of Donepezil for enhancement of rapid eye movement sleep in young children with Autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21, 353-357.
- Budzisz E. 2004. Synthesis, reactions and biological activity of phosphorus-containing derivatives of chromone and coumarin. *Phosphorus Sulfur Silicon*;179:2131-47.
- Carlson, P., 1992. *Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya* (Editör: Telefoncu, A.) Kırkkaleli. 420.
- Carta, F.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. 2012. 5- and 6-Membered (thio)lactones are prodrug type carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 267.
- Chang, M.S., Strichartz, G.R., 2005. Cholinergic pharmacology (GOLAN, D.E ve TASHJIAN, A.H. editörler). *Principles of Pharmacology*, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90, 1102-1106.
- Choi, KH; Wykes, T; Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. *The British Journal of Psychiatry* 203,172-178.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 233-242.
- Colovic, MB; Krstic, Danijela Z.; Lazarevic-Pasti, Tamara D.; Bondzic, Aleksandra M.; Vasic, Vesna M. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* 11, 315-335.
- Cotelle, N., Bemier J.L., Catteu, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C., Gaydou, E.M., 1996. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 35-43.
- Covacci, V., Torsello A., Pallozza, P., Sgambato, A., Romano, G., Boninsegna, A., Cittadini, A., Wolf, F.I., 2001. DNA oxidative damage during differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Chemical Research in Toxicology* 14, 1492-1497.
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Gülçin İ. Menzek, A. 2014. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes inhibitory effects of brominated diphenylmethanone and its derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 347, 354-359.
- 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., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase *in vitro* and *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 2257-2261.
- Davenport HW, Fisher RB. The mechanism of the secretion of acid and chloride by the gastric mucosa. *Am J Physiol* 1940;131:165–75.
- 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.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279-289.
- Davis, R. A.; Vullo, D.; Maresca, A.; Supuran, C.T.; Poulsen, S.A. 2013. Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1539.
- Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49-54.
- Demirdöğen, C.B., 2010. Organofosfatli-pestisit-zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* , 97-112.
- Diplock, A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p. Belgium.
- Dobrescu D. A 1966. propos de l'action de l'histamine sur l'anhydrase carbonique. *CR Seances Soc Biol Fil*;160:220–2.
- Durmaz L., 2011. Bazı bileşiklerin Lipozom, Emülsiyon ve Radikal Ortamındaki Antioksidan davranışlarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Egan D, O'Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes RD., 1990. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin-related compounds. *Drug Metabol. Rev.* ; 22: 503–29.
- Ellman G.L. Courtney K.D. Andres V. Featherston R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Elmastaş M, Gülçin İ, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Öİ, Aboul-Enein HY 2006. A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) seeds extracts. *Anal Lett* 39: 47-65.
- Erzengin M, Basaran I, Cakir U, 2012. *In vitro* inhibition effect of some dihydroxy coumarin compounds on purified human serum paraxonase 1 (PON1). *Appl Biochem Biotechnol*;168:1540–8.
- 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.
- 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.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.

- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishii, T., 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology*, 5 (3), 231-242.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37-45.
- Gadewar M., Patel DK., Patel K., Tahilyani V., 2012. Pharmacological and bioanalytical aspects of galangin - a concise report. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(1): S449-S455.
- Garrett RH, Grisham CM. (1999) *Biochemistry*, Second Edition Saunders College Publishing. 426-427.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.
- Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW 2004. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*, 149, 101-109
- Göçer, H., 2014. Sinefrin ve fenilefrin:antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Gülçin İ., Supuran, C.T., 2015. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoylcarbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 316-320.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine related compounds. *Archive Der Pharmazie*, 346, 783-792.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göksu, S., Naderi, A., Akbaba, Y., Kalın P., Akıncıoğlu, A., Gulcin, İ., Durdağı, S., Salmas, R.E., 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel benzylsulfamides using molecular modeling and experimental studies. *Bioorganic Chemistry*, 56, 75–82.
- Görlach A, Kietzmann T. 2007. Superoxide and derived reactive oxygen species in the regulation of hypoxia-inducible factors. *Methods Enzymol.*;435:421-46.
- Grandane, A., Tanc, M, , Zalubovskis, R., Supuran, C.T. 2014. 6-Triazolyl-substituted sulfocoumarins are potent, selective inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24 1256–1260.
- Greig, N., Utsuki, T., Yu, Zhu, Q.X, Holloway H.W., Perry, TA., Lee B., Ingram D.K., Lahiri DK. 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase, *Current Medical Research & Opinion*, 17, 159-165.

- Gülçin, İ. 2002. Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes and investigation of some *in vivo* properties of nettle (*Urtica dioica*). PhD Thesis, Atatürk University, Erzurum, Turkey, pp.45-48.
- Gül, H.İ., Kucukoglu, K., Yamali, C., Bilginer, S., Yuca, H., Ozturk, İ., Taslimi, P., Gülçin İ., Supuran, C.T. 2015. Synthesis of 4-(2-substitutedhydrazinyl)benzenesulfonamides and their carbonic anhydrase inhibitory effects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* doi.org/10.3109/14756366.2015.1047359.
- Gülçin, I., 2008. *In vitro* prooxidant effect of caffeine. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 23 149-152.
- Gülçin, I., Alici H.A., Cesur M., 2005. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of Propofol. *Chem. Pharm. Bull.* 53 281-285.
- Gülçin İ (2006a) Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sci* 78: 803-811.
- Gülçin İ, Bursal E, Şehitoğlu HM, Bilsel M, Gören AC (2010a). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol.*, 48: 2227-2238.
- Gülçin İ, Topal F, Ozturk Sarıkaya SB, Bursal E, Gören AC, Bilsel M (2011b). Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Rec. Nat. Prod* 5:158-175.
- Gülçin İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents-An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin İ., (2006b). Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, 78, 803–811.
- Gülçin İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s114.
- Gülçin İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- 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., 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., 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., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 22, 685-695.

- Gülçin İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009a. 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., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. joannis. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372-382.
- 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.
- Güney, M., Coşkun, A., Topal, F., Daştan, A., Gülçin İ., Supuran C.T. 2014. Oxidation of cyanobenzocycloheptatrienes: Synthesis, photooxygenation reaction and carbonic anhydrase isoenzymes inhibition properties of some new benzotropone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 22, 3537-3543.
- Habermeyer M., Fritz J., Barthelmes HU., Christensen MO., Larsen MK., Boege F., 2005. Anthocyanidins modulate the activity of human DNA topoisomerases I and II and affect cellular DNA integrity. *Chem Res Toxicol* 18: 1395-1404.
- Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42, 569-605.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1-4.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edition. Clarendon Press, Oxford.
- Hamers T., Molin K.R., Koeman J.H., Murk A.J., 2000. A Small-Volume Bioassay for Quantification of the Esterase Inhibiting Potency of Mixtures of Organophosphate and Carbamate Insecticides in Rainwater: Development and Optimization *Toxicol. Sci.*, 58, 60–67.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J.; Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism: neuropsychological measures. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 21, 43-50.
- Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P., 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*, 2nd edn. Taylor and Francis, London
- Holth T. F., Tollefsen K. E., 2012. Acetylcholine esterase inhibitors in effluents from oil production platforms in the North Sea. *Aquat. Toxicol.*, 112–113, 92–98.
- Hopa, E., Basaran, İ., Sinan, S., Turan, Y., Cakir, Ü., 2014. In vitro inhibition effects of some coumarin derivatives on human erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase activities. *Enzyme Inhib Med Chem.*; 29:728-732.
- Hoult JRS, Paya M., 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutical potential. *Gen. Pharmacol*; 27: 713–22.
- 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.
- Huh JE., Nam DW., Baek Y-H., Kang J.W., Park D-S., Choi DY., Lee JD., 2011. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *International Immunopharmacology*; volume 11: 46-54.
- 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 üzümü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. II. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312.
- Katzung BG., 2001. Introduction to autonomic pharmacology. In: Basic and clinical pharmacology, 8th edition. USA: The McGraw Hill Companies, Inc.:75–91.
- Kaviarasan, S., Naik, G.H., Gangabhagirathi, 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., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2007. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.*
- Khan KM, Saify ZS, Khan MZ, 2004. Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*;19:373–9.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 780-791.
- Kohara Y., Kawaguchi S., Kuwahara R., Uchida Y., Oku Y., 2015. Yamashita K., Genistein improves spatial learning and memory in male rats with elevated glucose level during memory consolidation. *Physiology & Behavior* Volume 140, 15-22.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Kumar R., Patel DK., Sairam K., Hemalatha S., 2012. Pharmacologically tested aldose reductase inhibitors isolated from plant sources - A concise report. *Chin J Nat Med*. 10: 388-400.
- Küçükkılınc, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. *Turk J Biochem*, 39, 126–131.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During In Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakshmi A., Subramanian S.P., 2014. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicology Letters* 229, 333-348.
- Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T., Nemcsok, J., 1997. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by mediation and paraquat in alimentary canal of common carp. *Genetic Pharmacology*, 55-59.
- Larson, R.A., 1997. *Naturally Occuring Antioxidants*, Boca Raton, Lewis Publishers.

- Lazo-de-la-Vega-Monroy, M.L., Fernández-Mejía, C., 2013. "Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions". Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants Ed Morales-González, J.A. InTech.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of Biochemistry, 3. Baskıdan çeviri, Çeviri editörü: Kılıç N., Palme Yayıncılık.
- Lichtenthaler, R., Marx, F. and 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.
- Lin G., Tsai Y. C., Liu H. C., Liao W. C., Chang C. H., Enantiomeric inhibitors of cholesterol esterase and acetylcholinesterase. Biochim. Biophys. Acta 1998, 1388, 161–174.
- 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.
- Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. Physiological Reviews, 47, 595-781.
- Maresca A, Temperini C, Pochet L, 2010. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins. J Med Chem;53:335–44.
- Maresca A, Temperini C, Vu H, 2009. Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors. J Am Chem Soc;131:3057–62.
- Matsuda S., Minami A., Ono Y., Kitagishi Y., 2015. Chapter 93-Neuroprotection of Genistein in Alzheimer's disease. Diet and nutrition in dementia and cognitive decline, 1003-1010.
- Mesulam, M.M., 1996. The systems-level organization of cholinergic innervation in the cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. Prog Brain Res, 285-297.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochemical Pharmacology, 43, 1167-1179.
- Miguel MG., 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or antiinflammatory activities. J. Appl Pharm Sci; 1: 7-15.
- Miller, D.D., 1996. Minerals. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 617-649. Marcel Dekker, New York.
- Miyamoto, Y., Koh, Y.H., Park, Y.S., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Ookawara, T., Suzuki, K., Honke, K., Taniguchi, N., 2003. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. Biological Chemistry, 384 (4), 567-574.
- 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.
- Murakami, H. and Sly, W.S. 1987. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. Journal Biology Chem., 262, 1382-1388,
- Murray, R.D., Mendez, J., Brown, S.A. The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry. London, UK: John Wiley & Sons; 1982.

- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin İ., Menzek, A. 2013. (3,4-Dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone and its derivatives as carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28, 402-406.
- Nath, B.S., Kumar, P.S., 1999. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157-162.
- 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.
- Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J., Iwashina, A. 1990. Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substance of tumor-promoter-enhanced phospholipids metabolism by umbelliferous materials. *Chem Pharm Bull*; 38, 1084-1086.
- Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y., 2006. İnsan Biyokimyası, 2. Baskıdan çeviri (Çeviri editörleri: Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y), Palme Yayıncılık.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., 2002a. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2772-2777.
- 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.
- Ozaki Y, Onashi T, Niwa Y. A., 1986. Comparative study on the effects of inhibitors of the lipoxigenase pathway on neutrophils function. *Biochem. Pharmacol.*;35: 3481-3488.
- Ozcelik, 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 Science* 68, 487-490.
- Öztürk Sarıkaya SB, Gülçin I, Supuran CT. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chem Biol Drug Des*;75:515-20. 601
- 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.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M., 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1), 18-35.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romeo A, Flerlage N, Burillo J, Codina C 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of

- six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal Agric. Food Chemistry* 50:6882-6890.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C., 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art. *Therapeutic Applications and Future Prospects*, 119, 199-229.
- Patel K., Jain A., Patel D.K., 2013. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins 'delphinidin'; A concise report. *Journal of Acute Disease*. 169-178.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. ve ark. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 273-277.
- Phillips, D.C., 1996. The tree-dimensional structure of an enzymes molecule. *Science*, 215, 78.
- Pietta PG., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63: 1035-1042.
- Pokorny, J., 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan H (ed) Academic Press, London, p 141.
- Puscas, I, Chiu A, Buzas G, 1980. Elucidation of the mechanism of gastric acid secretion. *Rev Med Interne*;32:233-47.
- Puscas, I, Coltau M, Baican M, Domuta G. 1999. Omeprazole has a dual mechanism of action: it inhibits both H⁺K⁺ATPase and gastric mucosa carbonic anhydrase enzyme in humans (in vitro and in vivo experiments). *J Pharmacol Exp Ther*;290:530-4.
- Puscas, I. 1979. Histamine and calcium interaction in the process of gastric acid secretion in humans. *Rev Med Interne*;312: 549-54.
- 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 Bioology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rehman SU, Chohan ZH, Gulnaz F, Supuran CT. 2005. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 20: 333-40.
- Ribeiz, SR; Bassitt, DP; Arrais, JA; Avila, R; Steffens, DC; Bottino, CM 2010. Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.
- Rice-Evans, C., Burdon, R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Research*, 32 (1), 71-110.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24,790-795.
- 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.
- 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.
- Roche H., Buet A., Ramade F., 2002. Accumulation of lipophilic microcontaminants and biochemical responses in eels from the camargue biosphere reserve. *Ecotoxicology*, 11, 155-164.

- Ryon, U.S., Whitney, P.L., Ryen, J.W., 1982. Localization of carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture, *J. Appl. Physiol.*, 1982,53, 914-919.
- Salganik RI, Arqutinskaya SV, Bersimbaev RI. 1972. The stimulating action of gastric pentapeptide, histamine and cyclic adenosine 3',5'- monophosphate on carbonic anhydrase in rat stomach. *Experientia*;28:1191-1
- Schmitt E., Stopper H., 2001. Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutr Cancer*, 41, 145-149.
- Scozzafava, A., Kalın, P., Supuran, C.T., Gülçin İ., Elwassel S., (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*, doi: 10.3109/14756366.2014.999236.
- 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*, doi:10.3109/14756366.2014.956310.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.brad
- Sethi KK, Verma SM, Tanc, M, 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II and VII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrachlorophthalimide moiety. *Bioorg Med Chem*;21:5168-74.
- Shahidi, F., 1997. *Natural Antioxidant: Chemistry, Health Effects and Applications*, Champaign, III, AOCS Press.
- Sherwin, E. R., 1990, *Food Additives*. Ed. by L. Branen, pp. 139-193. Marcel Dekker, New York.
- Shipp J., Abdel - Aal EM., 2010. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *Open Food Sci J*; 4: 7-22.
- 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.
- Smith AD (Ed) 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* Oxford University Press.
- Söyüt H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Storey, B.T., Dodgson, S.J., Forster, R.E. 1984. Mitochondrial carbonic anhydrase: the purified enzyme. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429, 210-211.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. *Curr Med. Chem-Imm. Endoc. Metab. Agents*; 1: 61-97.
- Şentürk M, Gülçin I, Daştan A, 2009. Carbonicanhydraseinhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorg Med Chem*;17:3207-11.
- Tars, K.; Vullo, D.; Kazaks, A.; 2013. Leitans, J.; Lends, A.; Grandane, A.; Zalubovskis, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Previous article next article table

- of contents sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): A class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.*, 56, 293.
- Taylor, D; Paton, C; Shitij, K 2012. *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry* (11th ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; 2010. Parkkila, S.; Supuran, C.T. The coumarin-binding site in carbonic anhydrase accommodates structurally diverse inhibitors: the antiepileptic lacosamide as an example and lead molecule for novel classes of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Med. Chem.* 53, 850-854.
- Topal, M., Gülçin İ., 2014. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turkish Journal of Chemistry*, 38, 894-902.
- Touisni, N.; Maresca, A.; McDonald, P. C.; Lou, Y.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. 2011. Glycosyl coumarin carbonic anhydrase ix and xii inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors. *J. Med. Chem.*, 54, 8271.
- Tripp, B.C., Smith, K., Ferry, J.G., 2001. Minireview: Carbonic anhydrase: New insights for an ancient enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 48615- 48618.
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 649-652.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Vince, J.W. and Reithmeier, R. A. F. 2000. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁻/HCO₃⁻-anion exchanger AE1. *Biochemistry*, 39: 5527-5533.
- Vinik AI, Heldsinger AA.1984. Cytochemical quantification of physio- logic regulation of oxyntic cell carbonic anhydrase. *Ann NY Acad Sci*;429:592–6.
- Voora D, McLeod HL, Eby C, Gage BF., 2005. The pharmacogenetics of coumarin therapy. *Pharmacogenomics*; 6: 503–13.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63, 335-342.
- Whitney, P.L. and Briggles, T.V. 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 257, 12056-12059.
- Wilbur, K.M., 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., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838–849.
- Wistrand, P.J., 1980. Solubilization and preliminary characterization of membrane bound carbonic anhydrase, *J. Med. Sci.*, 85, 75.
- Wu CR, Huang MY, Lin YT, Ju HY, Ching H. 2007. Antioxidant properties of cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chem.*; 104: 1464–71.
- Yamahara J, Kobayashi G, Matsuda H, Iwamoto M, Fujimura HV. 1989. Vasculardilatory action of Chinese crude drug. II Effects of scaparon on calcium on calcium mobilization. *Chem. Pharm. Bull*; 37: 485–9.
- Yıldırım, A., Atmaca, U., Keskin, A., Topal, M., Çelik, M., Gülçin İ., Supuran, C.T. 2015. N-Acylsulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrase isoenzymes I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 2598-2605.

- Yuschak, T., 2006. *Advanced Lucid Dreaming: The Power of Supplements*. Lulu.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 6929-6934.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum'da doğdu. İlköğrenimini Erzurum ilinin Oltu ilçesinde ve lise öğrenimini ise Erzurum Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. 2007-2010 yılları arasında Erzurum'da sözleşmeli öğretmen olarak çalıştı. Ekim 2008'de Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Yüksek Lisans öğrenimini Temmuz 2011'de tamamladı. Ağustos 2011 yılında Doktora öğrenimine başladı. 2012 yılının Kasım ayında Erzincan Üniversitesi Çayırılı Meslek Yüksekokulunda, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümünde Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı görevi sürdürmekte olup, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında doktora çalışmalarına devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.