

**KAPSAİSİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN
BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) İLE ASETİLKOLİN
ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Betül ARABACI

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı
Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
2015**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAPSAİSİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ
VE İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve
hCA II) İLE ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE
İNİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Betül ARABACI

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

KAPSAİSİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) İLE ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Betül ARABACI tarafından hazırlanan bu çalışma 27/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan SÖYÜT

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .26./03./2015. tarih ve .12./532. ... 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

Yüksek Lisans Tezi

KAPSAİSİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve II) ile ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Betül ARABACI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Kapsaisin, acı kırmızı biberden elde edilen bir alkoloiddir. Bu çalışma ile kapsaisinin antioksidan ve radikal giderme aktivitesi değerlendirildi. Ayrıca kapsaisinin insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelendi.

Kapsaisinin antioksidan ve radikal giderme aktivitesini değerlendirmek için, Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazol-6-sülfonik asit) radikal ($ABTS^+$) giderme, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal ($DPPH^+$) giderme, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal ($DMPD^+$) giderme aktiviteleri, bipyridil reaktifi ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi ve ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivitesi çalışıldı. Standart antioksidan olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı. Sonuçlar bu dört standart madde ile karşılaştırılarak kıyaslamalar yapıldı. Çalışmanın devamında kapsaisinin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II (hCA I ve II) üzerine *in vitro* inhibitör etkisi araştırıldı. Öncelikle hCA I ve II izoenzimleri sırasıyla Sepharose-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim saflığını belirlemek için, SDS-PAGE yöntemi uygulandı ve tek bant gözlemlendi. Hidrataz aktivitesi ve 4-nitrofenil asetat substratı ile esteraz aktivite metodu kullanılarak kapsaisinin hCA I ve II) üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı. hCA I ve II için IC_{50} değerleri sırasıyla 428.04, 316.01 μ M iken, K_i değerleri 696.15, 208.37 μ M olarak hesaplandı. Kapsaisin, hCA I ve II için p-nitrofenil asetat substratı ile yarışmasız inhibisyon gösterdi. Çalışmanın son kısmında ise Ellman metoduna göre kapsaisinin AChE üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı. AChE için IC_{50} değeri 0,356 μ M ve K_i değeri 0,083 μ M olarak hesaplandı. İnhibisyon türü ise yarışmalı inhibisyon olarak belirlendi.

2015, 122 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, enzim inhibitörü, kapsaisin, karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF CAPSAICIN and INVESTIGATION OF ITS INHIBITION EFFECTS ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA I AND II) AND ACETYLCHOLIN ESTERASE ENZYME

Betül ARABACI

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In the present study, capsaicin was evaluated for its possible antioxidant and radical scavenging activity. Also the inhibitory effects of capsaicin were used on human erythrocyte isoenzymes (hCA I and hCA II) and acetylcholin esterase enzyme.

In order to evaluate antioxidant and radical scavenging activity of capsaicin, different *in vitro* methods such as Fe^{3+} - Fe^{2+} reducing capacity, cupric ion (Cu^{2+}) reduction capacity Cuprac method, reducing capacity by FRAP method, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical ($ABTS^{+}$) scavenging, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical ($DPPH^{\cdot}$) scavenging and N,N -dimethyl-p-phenylenediamine radical ($DMPD^{+}$) scavenging activities, ferrous ions (Fe^{2+}) chelating activities using by bipyridyl reagents and total antioxidant activity by ferric thiocyanate method were performed separately. BHA, BHT, α -tocopherol and Trolox were used as the reference antioxidant compounds. The results were compared with performance of the four standard substance. In further study, the *in vitro* inhibitory effects of capsaicin on hCA I and II were investigated. Firstly, hCA I and II were purified from human erythrocyte by Sepharose-4B-L-Thyrosine affinity column chromatography. For determination of the enzyme purity, SDS-PAGE method was performed and single band was observed for each isoenzymes. The inhibition effects capsaicin on human carbonic anhydrase iso enzymes were investigated using by hydratase and esterase assay. Then IC_{50} and K_i values for were calculated. IC_{50} values were found 0.226, 0.302 μ M while K_i values was found as 0.169, 0.088 μ M for hCA I ve II, respectively. The inhibition type was found to be non-competitive. In the last part of this study, the effects of capsaicin on AChE was investigated by Ellman's method. IC_{50} and K_i values were calculated. IC_{50} values was 0,356 μ M and K_i values was found as 0,083 μ M respectively. The inhibition type was determined as competitive.

2015, 122 pages

Keywords: Antioxidant activity, enzyme inhibitor, capsaicin, carbonic anhydrase, acetylcholine esterase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum çalışmamın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim süresince zamanımı, sabrını ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına yön veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Çalışmalarımın her safhasında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkanlarını sunan 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. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarım doktora öğrencileri Pınar KALIN ve Leyla POLAT KÖSE başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma, Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fevzi TOPAL, Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Hilal ŞEHİTOĞLU, Sayın Uzm. Dr. Hülya GÖÇER'e ve bütün Kimya Bölümü personeline,

Ayrıca çalışmalarım esnasında hep yanımda olan, ömrüm boyunca kendisini sevgi ve rahmetle anacağım kıymetli arkadaşım Hatice HAN'a, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Özkan ARABACI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Betül ARABACI

Mart, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....	1
1.1.1. Serbest radikaller ve etkileri.....	1
1.1.2. Antioksidanlar.....	5
1.1.2.a. Endojen antioksidanlar.....	8
1.1.2.b. Eksojen antioksidanlar.....	11
1.1.2.c. Fenolik bileşikler.....	15
1.2. Kapsaisin.....	19
1.3. Enzimler.....	22
1.3.1. Asetilkolinesteraz.....	24
1.3.2. Karbonik anhidraz:.....	28
1.4. Çalışmanın Amacı.....	33
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	42
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	42
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	43
3.1.3.a. Fe ³⁺ - Fe ²⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	43
3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	43
3.1.3.c. DPPH· serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler.....	44
3.1.3.d. ABTS·+ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	44
3.1.3.e. DMPD ⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	44

3.1.3.f. Total antioksidan aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	45
3.1.3.g. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler	45
3.1.3.h. Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler	46
3.1.3.i. Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler	46
3.1.3.j. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler	46
3.1.3.k. SDS - Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler	48
3.2. Kapsaisin Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerine Etkisi ile İlgili Çalışmalar	48
3.2.1. Deneyde kullanılacak kanın temini	48
3.2.2. Enzim saflaştırma çalışmaları	49
3.2.2.a. hCA enzim hemolizatının hazırlanması	49
3.2.2.b. hCA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar	49
3.3. hCA Enzim Aktivitesi Tayini	52
3.3.1. Hidrataz aktivitesi.....	52
3.3.2. Esteraz aktivitesi.....	53
3.4. Protein Tayini	55
3.4.1. Kalitatif protein tayini	55
3.4.2. Kantitatif protein tayini	55
3.5. hCA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar.....	56
3.5.1. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	56
3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü	56
3.7. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Kapsaisin Etkisinin Belirlenmesi	56
3.8. Kapsaisin Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Kapsaisin İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	56
3.9. Antioksidan Çalışmalar	57
3.9.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi	57
3.9.2. Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu).....	58
3.9.3. FRAP indirgeme kapasitesi	58
3.9.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi....	58

3.9.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi.....	59
3.9.6. N,N'-dimetil- <i>p</i> -fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi.....	59
3.9.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi.....	60
3.9.8. Total antioksidan aktivitesi	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	61
4.1. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	61
4.1.1. Fe ³⁺ - Fe ²⁺ indirgeme kuvveti bulguları	61
4.1.2. Cu ²⁺ - Cu ⁺ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları:.....	62
4.1.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları	63
4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	64
4.1.5. ABTS ⁺ radikal giderme aktivitesi bulguları	67
4.1.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları	70
4.1.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulguları	72
4.1.8. Total antioksidan aktivitesi bulguları	73
4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	75
4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	75
4.2.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	75
4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları.....	76
4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları.....	77
4.2.4.a. Enzim için K _m ve V _{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışma sonuçları.....	77
4.2.5. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları	79
4.2.6. hCAI ve hCAII izoenzimleri aktiviteleri üzerine kapsaisinin etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları.....	79
4.2.6.a. hCAI izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren kapsaisin ile ilgili sonuçları.....	79

4.2.6.b. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren kapsaisin ile ilgili sonuçları.....	80
4.3. Asetilkolin esteraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	84
KAYNAKLAR	110
ÖZGEÇMİŞ	123

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
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ⁺	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH•	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
E.Ü.	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 derişimi
LOO•	Lipit peroksit radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
OP	Organofosfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum per sülfat
ROS	Serbest oksijen radikali
SDS	Sodyum dodesil sülfat
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. L-argininden nitrik oksitin sentezi.....	4
Şekil 1.2. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları.....	6
Şekil 1.3. Hücrenin antioksidan savunma mekanizması	8
Şekil 1.4. Katalaz ve SOD tepkimeleri	9
Şekil 1.5. Redükte glutatyonun yapısı	10
Şekil 1.6. Glutatyon redoks döngüsü (GP:Glutatyon peroksidaz, GR:Glutatyon redüktaz, PFY:Pentoz fosfat yolu).....	11
Şekil 1.7. Askorbik asitin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.8. Hücre duvarı ve sitoplazmadaki askorbat sistemi	13
Şekil 1.9. Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması	14
Şekil 1.10. Flavonoidlerin temel yapısı	17
Şekil 1.11. β -Karatoten'in kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.12. Biber meyvesinin anatomisi	20
Şekil 1.13. Kapsaisinin kimyasal yapısı (aromatik halka+amid bağı+hidrofobik yan zincir).....	21
Şekil 1.14. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz enziminin aktif merkez oyuğu	25
Şekil 1.15. OP zehirlenmelerinde AChE enziminin etkisi.....	27
Şekil 1.16. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin hücredeki yerleşim bölgeleri	29
Şekil 1.17. Karbonik anhidraz II izoenzimi ve katalitik bölgesi.....	31
Şekil 1.18. CA enziminin katalitik önleme mekanizması.....	32
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	50
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	53
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μ g/mL) kapsaisinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	61

Şekil 4.2. Kapsaisinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını (Cu ²⁺) indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki kapsaisinin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması	64
Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	65
Şekil 4.5. Kapsaisinin farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/mL) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.6. ABTS'nin açık kimyasal yapısı	67
Şekil 4.7. ABTS ⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS ⁺ için hazırlanan standart grafik	68
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki kapsaisinin (10-30 µg/mL) ABTS ⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.9. Kapsaisin, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloksun 10 µg/mL konsantrasyonunda ABTS ⁺ giderme aktivite yüzdeleri.....	69
Şekil 4.10. DMPD ⁺ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....	70
Şekil 4.11. Kapsaisinin DMPD ⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.12. Kapsaisin, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloksun 30 µg/mL konsantrasyonunda DMPD giderme aktivite yüzdeleri	71
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kapsaisinin bipiridil metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması.....	72
Şekil 4.14. Kapsaisin, BHT, α-tokoferol ve troloksun IC ₅₀ konsantrasyonunda bipiridil metal şelatlama aktivite yüzdeleri	73
Şekil 4.15. Kapsaisinin (30 µg/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	74

Şekil 4.16. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	75
Şekil 4.17. 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 absorbanz grafiği	76
Şekil 4.18. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	77
Şekil 4.19. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	78
Şekil 4.20. hCA I VE hCA II izoenzimleri kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafikleri	78
Şekil 4.21. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı	79
Şekil 4.22. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği.....	80
Şekil 4.23. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği.....	81
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ²⁺ iyonuna fenolik bir antioksidan olan kapsaisinin inhibitör olarak bağlanma modeli	82
Şekil 4.25. Asetilkolin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği.....	82
Şekil 4.26. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 5.1. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu.....	86
Şekil 5.2. Ferrik iyonlarının (Fe ³⁺) ferröz iyonlarına (Fe ²⁺) indirgenme reaksiyonu	87
Şekil 5.3. Kurkumin molekülünün metal şelatlama mekanizması.....	90
Şekil 5.4. Cynarin molekülünün Fe ²⁺ iyonlarını şelatlama mekanizması	90
Şekil 5.5. L-Karnitin Fe ²⁺ iyonlarını şelatlama mekanizması	91
Şekil 5.6. Cynarin molekülünün radikal giderme mekanizması ve ara ürün oluşumu	93

Şekil 5.7. Bir antioksidan [(AH) _n] tarafından DPPH serbest radikalinin giderilmesi	94
Şekil 5.8. Rezveratrol molekülünün radikal giderme mekanizması	95
Şekil 5.9. Kurkuminin radikal giderme mekanizması	96
Şekil 5.10. Cynarinin DPPH serbest radikalini söndürme mekanizması.....	97
Şekil 5.11. Eugenol molekülünün DPPH serbest radikalini söndürme mekanizması ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu.....	98
Şekil 5.12. Mono fenoller için muhtemel DPPH serbest radikali giderme mekanizması.....	98
Şekil 5.13. Bir metil gallat molekülünün DPPH serbest radikalini giderme mekanizması ve radikalik metil galoil ara ürününün oluşumu	99
Şekil 5.14. Bir gallik asit molekülünün DPPH serbest radikalini söndürme mekanizması ve radikalik galoil ara ürününün oluşumu.....	99
Şekil 5.15. Askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH serbest radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon	100
Şekil 5.16. ABTS ^{•+} 'nin kimyasal yapısı ve persülfatla oksidasyonu.....	101
Şekil 5.17. Kararlı DMPD ^{•+} radikalinin oluşum ve giderilme mekanizması.....	102
Şekil 5.18. Linoleik asitin otoksidasyon mekanizması.....	103
Şekil 5.19. Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşum mekanizması	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerine örnekler	2
Çizelge 1.2. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine başlıca zararlı etkileri	2
Çizelge 1.3. Fenolik bileşikler ve örnekleri	16
Çizelge 1.4. Fenolik asitlerin genel kimyasal yapıları	17
Çizelge 3.1. Esteraz aktivitesi için 3 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler	53
Çizelge 3.2. Esteraz aktivitesi için 1 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler	54
Çizelge 3.3. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın küvet içeriği	57
Çizelge 4.1. 10 µg/mL konsantrasyonunda kapsaisinin ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) ve kuprik (Cu ²⁺) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılmaları	63
Çizelge 4.2. Kapsaisin çözeltilerinin DPPH [·] , ABTS ^{·+} ve DMPD ^{·+} aktivitelerinin IC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması	66
Çizelge 4.3. Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları	77
Çizelge 4.4. hCA I ve hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kapsaisinin K _i değerleri ve inhibisyon türü	81
Çizelge 4.5. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Kapsaisinin K _i değeri ve inhibisyon türü	83
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan Kapsaisinin 20 µg/mL konsantrasyonunda ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) ve kuprik iyonlarını (Cu ²⁺) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi	88
Çizelge 5.2. Çalışmada kullanılan kapsaisinin IC ₅₀ konsantrasyonunda bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulgularının birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırmaları	92

1. GİRİŞ

1.1. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.1.1. Serbest radikaller ve etkileri

Anaerob organizmalar hariç bütün canlıların enerji üretimi için oksijene gereksinimleri vardır. ATP oluşum sürecinde metabolik faaliyetlerin tamamlanabilmesi için moleküler oksijen şarttır. Hücrelerdeki oksijenin %85-90'ı mitokondride elektron taşıma zincirinde kullanılırken yaklaşık %10-15'lik kısmı ise oksidan enzimlerin katalizlediği olaylarda kullanılır.

Serbest radikaller, fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında oluşan ve eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerdir. Gıda moleküllerinin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümleri sırasında meydana gelirler. Oksijen veya nitrojen kaynaklı olabilirler (Percival 1998; Podda and Grundmann-Kollmann 2001). Serbest oksijen türleri ya radikaldirler ve en az bir tane ortaklanmamış elektron çifti içerirler veya radikal olmayan reaktif bileşiklerdir. Biyomolekülleri oksitleme yeteneklerinden dolayı bu moleküller oksidan veya pro-oksidan olarak isimlendirilirler (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1991; Gülçin 2012).

Biyolojik önemi olan bu reaktif oksijen türlerinin (ROS) en bilinen örnekleri arasında hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroksil ($\text{ROO}\cdot$), alkoksil ($\text{RO}\cdot$) ve nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) sayılabilir. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi radikal olmayan reaktif oksijen türleride bulunmaktadır (Pietta 2000; Gülçin 2012) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerine örnekler (Evans and Halliwell 2001)

Tip	Serbest radikal	Non radikal
ROS	Süperoksit, O ₂ ⁻	Hidrojen peroksit, H ₂ O ₂
	Hidroksil, OH [·]	Hipokloröz asit, HOCl
	Peroksil, RO ₂ [·]	Ozon, O ₃
	Alkoksil, RO [·]	Singlet oksijen
	Hidroperoksil, HO ₂ [·]	
RNS		Peroksinitrit, OONO
	Nitrik oksit, NO	Nitrosoksit, HNO ₂
	Nitrojen dioksit, NO ₂	Dinitrojen trioksit, N ₂ O ₃
		Nitroksil anyon, NO ₂ ⁻

Reaktif oksijen türlerinin fizyolojik miktarları hücre fonksiyonları için gereklidir. Serbest radikallerin fazlası ise nükleik asitler, lipitler, proteinler, doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir, mutasyonlar oluşturarak DNA'da hasarlara sebep olabilirler (Gülçin 2010; Gülçin 2012).

Çizelge 1.2. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine başlıca zararlı etkileri

Doymamış yağlar	<ul style="list-style-type: none"> • Lipitlerde çapraz bağlanmalar • Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon • Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbohidratlar	<ul style="list-style-type: none"> • Polisakkaritlerin monomerlerine ayrıştırılması
Nükleik asitler	<ul style="list-style-type: none"> • İplikçik kırılmaları • Baz içermeyen bölgeler • Sentezlenen proteinlerde çapraz bağlar
Nükleik asit bazları	<ul style="list-style-type: none"> • Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar • Hidroksilasyonlar

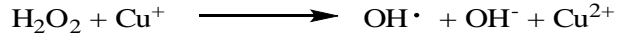
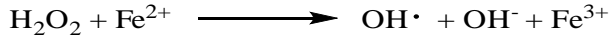
Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunması ve normal fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge korunmalıdır (Serafini and Del Rio 2004). Serbest radikallerin artması veya antioksidanların azalması sonucu serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olmaktadır. Oksidatif stresin ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenez, mutagenез, immünolojik ve nörolojik hastalıklar, sindirim sistemi, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıklarının patojenezinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır (Halliwell 1987).

Serbest radikalleri oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılır. Endojen kaynaklar; Mitokondriyal elektron transport zinciri, oto-oksidasyon reaksiyonlar, ksantin oksidaz, galaktoz oksidaz, lipooksigenaz gibi oksidan enzimler ve fagosit hücreleridir. Ekzojen kaynaklar arasında ise ilaç oksidasyonları, radyasyon, ozon, X ve UV-ışınları, sigara dumanı, egzoz gazları ve SO₂ gibi bazı kimyasallar yer alır (Fırat 1997).

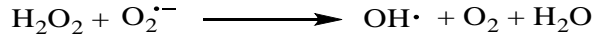
Ekzojen yada endojen kaynaklar aracılığıyla oluşan oksijen kaynaklı reaktif ara ürünler vücudun antioksidan savunma sistemleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) tarafından zararsızlaştırılır (Güner 2014).

Hidroksil radikali (OH[•]), hidroksit iyonunun (OH⁻) radikalik formudur. 10⁻⁹ saniyelik yarılanma süresi ile bilinen en reaktif oksijen türüdür. (Gülçin 2012). Hidroksil radikali biyomoleküllerle güçlü etkileşiminden dolayı biyolojik sistemlere diğer reaktif oksijen türlerinden daha fazla hasar verir (Betteridge 2000). Hidroksil radikali hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi (Fenton reaksiyonu), hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss reaksiyonu) ve metabolizmadaki suyun yüksek enerjili radyasyon ışınları tarafından hemolitik parçalanması sonucu oluşur (Cheesman and Slater 1993; Halliwell 1999; Gülçin 2012). Bu reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.

Fenton Reaksiyonları:

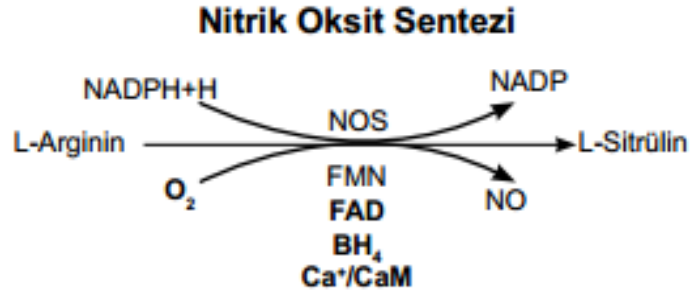


Haber-Weiss Reaksiyonu:



$\text{OH}\cdot$ radikali lipid peroksidasyonunu başlatan en etkili radikallerden biridir. (Erden 1992). Ayrıca membran akışkanlığında azalma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (Kavas 1989).

Nitrik oksit (NO), insan dahil olmak üzere bütün memelilerde önemli bir sinyal molekülüdür (Hou *et al.* 1999). L-argininin ve oksijenden nitrik oksit sentetaz enzimi katalizörlüğünde sentezlenir.



Şekil 1.1. L-argininden nitrik oksitin sentezi

Bir nörotransmitter olan nitrik oksit, nörotransmisyon adı verilen sinirsel ileti, kan basıncı regülasyonu, savunma sistemleri, düz kas gevşemesi, immun regülasyon gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rolü olan bir serbest radikaldir.

Nitrik oksit, süperoksit radikalının reaksiyonu sonucu, dokular için son derece zararlı olan peroksinitrit'e dönüşür. Peroksinitritin proteinlere doğrudan hasar verebilir (Gutteridge1995; Tunçtan ve Abacıoğlu 1998). Peroksinitrit ayrıca fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro-türevleri (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Nitrik oksit,

endotel hücrelerde işlevsel bozukluk, ateroskleroz, hipertansiyon ve kalpdamar hastalıklarında rol oynamaktadır (Rayner *et al.* 2009).

Hidrojen Peroksit (H₂O₂); bir serbest radikal değildir ancak biyolojik membranlardan geçebildiği için önemli bir moleküldür. Başta hipokloröz asit ve hidroksil olmak üzere birçok oksidan molekülün veya radikalın oluşmasına yol açar (Deaton and Marlin 2003). Fe²⁺ ve Cu⁺ gibi geçiş metal iyonları ve oksijen varlığında Fenton reaksiyonu ile H₂O₂·ten hidroksil radikali üretilir (Halliwell and Gutteridge 1989).

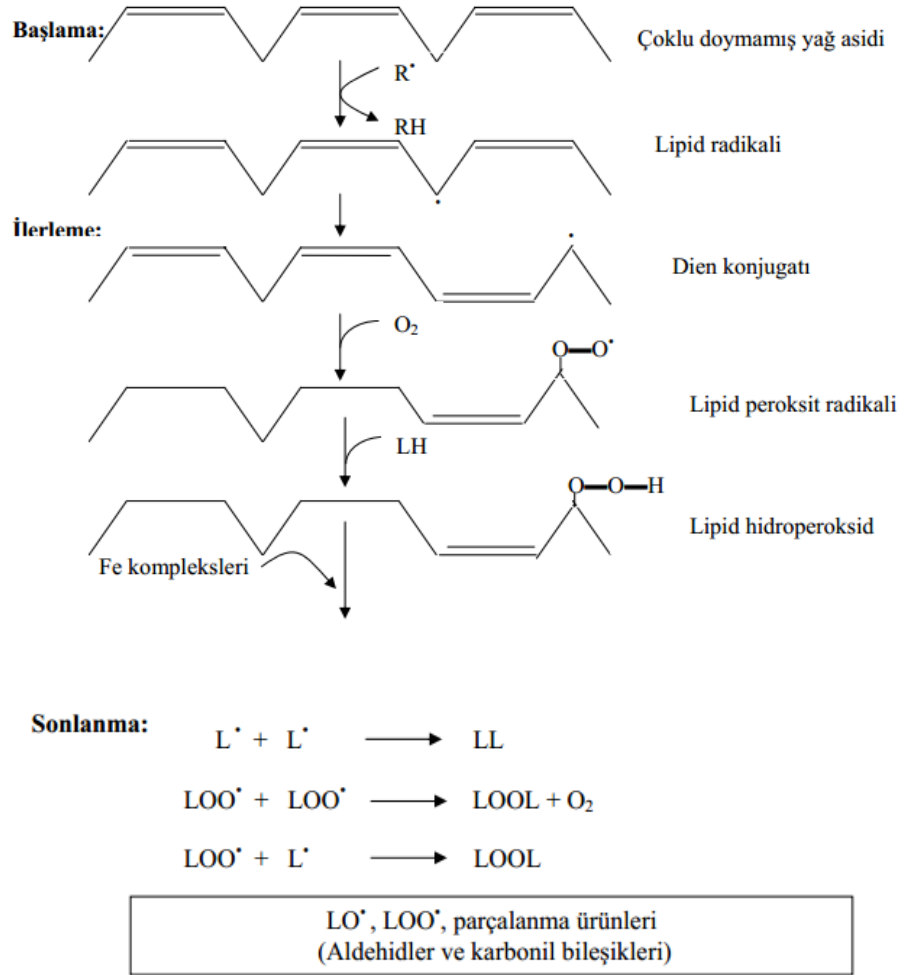
1.1.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip moleküllere antioksidan denir (Elliot 1999). Bütün aerobik organizmaların hasarlı molekülleri ortadan kaldırmak veya onarabilmek için antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidan savunma sistemleri, tıpkı kimyasal antioksidanlar gibi hücreleri oksidatif strese karşı korurlar (Gülçin 2012).

Antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirir (Gülçin *et al.* 2010a). Antioksidanlar genellikle besinleri oksidatif bozulmalara karşı korumak amacıyla katkı maddesi olarak kullanılırlar (Gülçin *et al.* 2004e, 2005b). Gıdalardaki kalite ve besin değerinin azalmasının başlıca nedeni olan lipid peroksidasyonu, gıdaların tadlarının bozulmasına ve toksik bileşiklerin oluşmasına yol açar. Ayrıca lipid peroksidasyonunun membran hasarları, yaşlanma, kalp hastalıkları ve kanser ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Ramarathnam *et al.* 1995).

Lipid peroksidasyonu, membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olur. Hücre membranının lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozar (Thomas 1999). Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlar ve daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Bu zincir reaksiyonlarının hücre membranına verdiği hasarlar geri

dönüşümsüzdür. Zincir reaksiyonlarının aşamaları Şekil 1.2'de özetlenmiştir (Murray *et al.* 1996).



Şekil 1.2. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonları

Antioksidanlar, radikalik zincir reaksiyonlarını inhibe ederek oksidatif süreçte bu reaksiyonların başlamasını ve yayılmasını önler ve bu amaçla sıklıkla gıdalara ilave edilirler (Shaidi *et al.* 1992; Gülçin 2006a).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sebze ve meyve tüketimi ile yaşa bağlı hastalıklar, koroner kalp hastalıkları ve kanserden ölüm oranları arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu durum sebze ve meyvelerin antioksidan içerikleri ile açıklanabilir (Eberhardt *et al.* 2000; Ganesan *et al.* 2011; Gülçin 2012).

Antioksidanlar oksidanları başlıca dört yolla etkisiz hale getirirler (Gökpınar *et al.* 2006; Keleştemur ve Özdemir 2011).

1. Giderme etkisi: Oksidanları daha az etkili bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirirler. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alıp, lokal oksijen konsantrasyonunu azaltırlar. Antioksidan enzimler ve mikromoleküler antioksidanlar bu yolla etki eder.

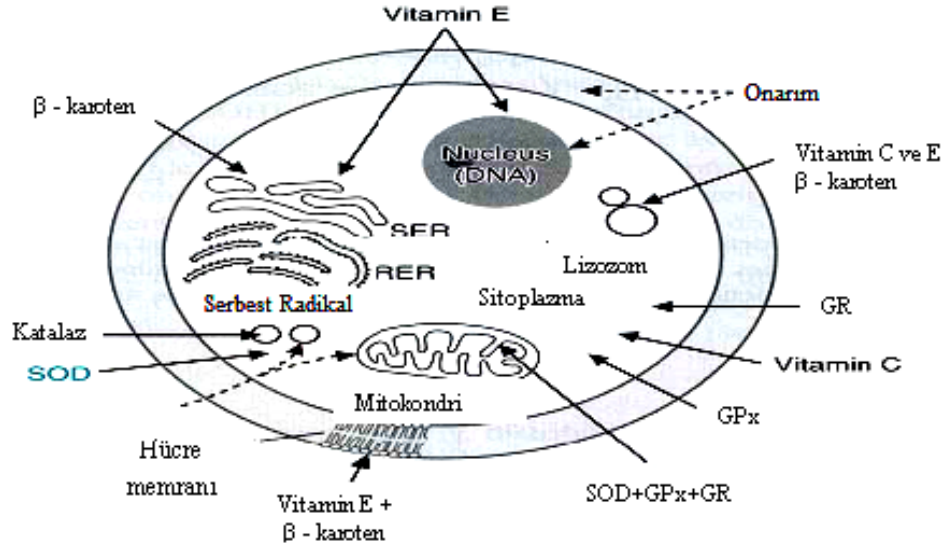
2. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen molekülü verilerek hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları ile bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyip peroksidasyonun başlamasını önlerler. Vitaminler, flavanoitler ve mannitol bu şekilde etki eder.

3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak inaktif hale getirirler.

4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onararak olumsuz etkilerini giderirler.

Aerobik organizmalarda dışarıdan diyetle alınan eksojen antioksidan savunma sistemleri ve metabolizmada üretilen endojen antioksidan savunma sistemleri vardır (Gülçin 2007).

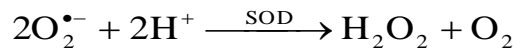
Antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen kaynaklılar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Gülçin *et al.* 2004). Antioksidan moleküller oksidanların neden olduğu hasarları hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi molekülleri içerir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlar (Halliwell 1995). Enzimatik antioksidan (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz) ve non-enzimatik antioksidan (β -karoten, retinol, C vitamini ve GSH) savunma sistemleri aerob organizmaları serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı korur. Askorbik asit, β -karoten, retinol gibi antioksidan vitaminler oksidanların hasarlarının azaltılması veya ortadan kaldırılmasında önemli rol oynar (Gülçin *et al.* 2007).



Şekil 1.3. Hücrenin antioksidan savunma mekanizması (Keleştemur ve Özdemir 2011)

1.1.2.a. Endojen antioksidanlar

Süperoksit dismutaz; süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Oluşan hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri ile etkisiz hale getirilir. Süperoksit dismutaz, hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerinin kontrolünde önemli rol oynar (Fridovich 1983).



Süperoksit dismutaz enzimi insanlarda iki farklı şekilde bulunur. Sitozolda bulunan, Cu ve Zn ihtiva eden izomer Cu-Zn SOD ile mitokondride bulunan Mn ihtiva eden Mn SOD izomeridir. Hücrelerde en bol bulunanı sitozolik Cu-Zn SOD izomeridir (Helle *et al.* 1997).

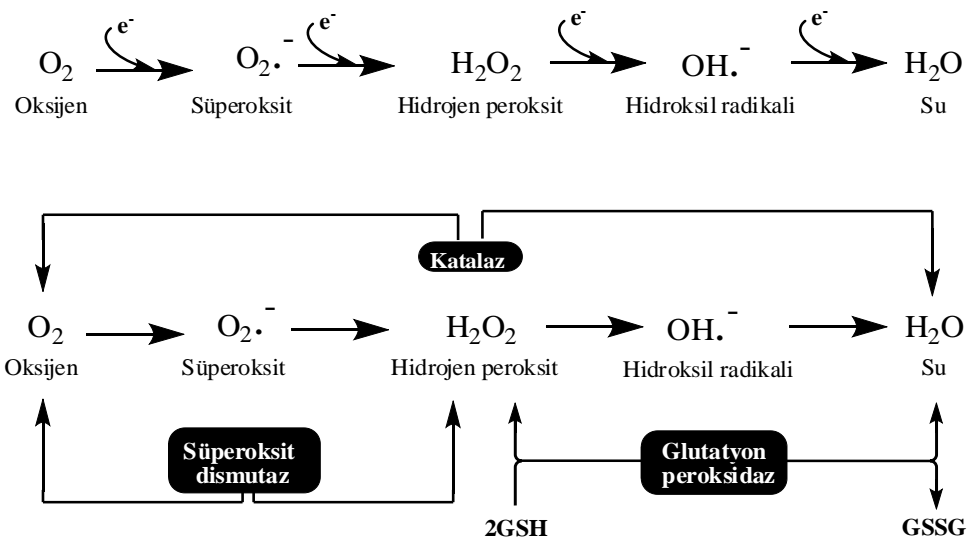
SOD enziminin fagositozla hücre içine alınan bakterilerin etkisiz hale getirilmesinde önemli rolü vardır. Bu sebeple granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerdeki SOD miktarı granülositlerden daha fazladır. Bu enzim yüksek katalitik aktivitesiyle

hücrelerde süper oksit birikmesine izin vermez. Böylece lipid peroksidasyonunu da inhibe eder.

Oksijen kullanımını fazla olan dokularda SOD aktivitesi de fazladır. Normal işleyen bir metabolizmada yüksek oranda süperoksit üretilmesine rağmen SOD ile hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. Hücre dışında SOD aktivitesi çok düşüktür (Akkuş 1995).

Katalaz; dört tane hem grubu içeren bir proteindir. Hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. Alt birimlerinde bulundurduğu NADPH ile kararlı bir yapıya sahiptir. Peroksizomlar başta olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğun olarak bulunur. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde aktivitesi yüksek bir enzimdir.

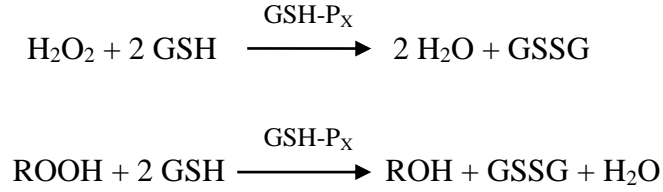
Katalaz normal koşullar altında hücre için gerekli olmasada hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksiti hücreden çıkmadan ve oksijene dönüşmeden yakalar. Bu yolla kimyasal indirgemeler ve toksinlerle direkt etkileşim için O_2 konsantrasyonunu korur (Akkuş 1995; Matez and Jimenez 1999).



Şekil 1.4. Katalaz ve SOD tepkimeleri

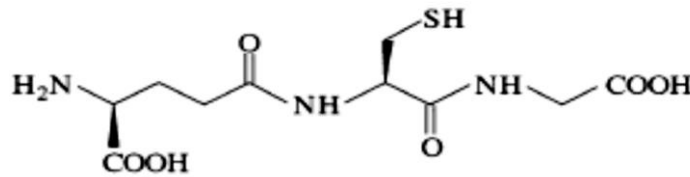
Glutasyon Peroksidaz (GSH P_x); hidrojen peroksiti indirgeyerek hücrel antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Ökaryot hücrelerin sitozol ve mitokondrilerinde bulunan, selenyum içeren bir proteindir. Bütün dokularda etkisi görülen glutasyon peroksidaz en fazla eritrositler, böbrek ve karaciğerde aktivite gösterir. Kolesterol ve fosfolipidlerdeki hidrojen peroksiti indirgeme yeteneğine sahiptir. Glutasyon peroksidaz, aynı zamanda Fenton reaksiyonları için yüksek reaktivitesi olan hidroksil radikalleri de üretebilmektedir (Ho *et al.*1997).

Glutasyon peroksidaz enzimi, selenyum bağlı ve selenyum bağlı olmayan iki gruba ayrılabilir. Selenyum bağlı grup hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirger. Selenyum bağımsız Glutasyon Peroksidaz ise hidrojen peroksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri (ROOH) indirger (Antmen 2005).



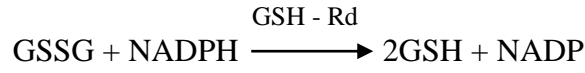
Memelilerde glut atyon peroksidazın beş tane izoenzimi vardır. Herbir izoenzimin seviyesi bulunduğu dokuya göre farklılık gösterir (Mates *et al.* 1999).

Glutasyon (GSH): Tripeptid yapıdaki GSH (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar. GSH, sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROS'a karşı direkt olarak savunma yapabilir (Antmen 2005).

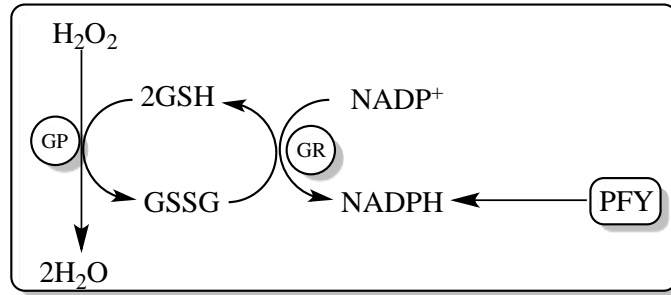


Şekil 1.5. Redükte glutasyonun yapısı

Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd); Glutasyon redüktaz, flavoenzim ailesinin bir üyesidir. Okside glutasyonun (GSSG) redükte formuna (GSH) indirgenmesini katalizler. Yapısında NADPH bulundurur (Özgençli vd 2013).



Glutasyon redüktaz flavinadenindinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (Özkan ve Fışkın 2004).



Şekil 1.6. Glutasyon redoks döngüsü (GP:Glutasyon peroksidaz, GR:Glutasyon redüktaz, PFY:Pentoz fosfat yolu)

1.1.2.b. Eksojen antioksidanlar

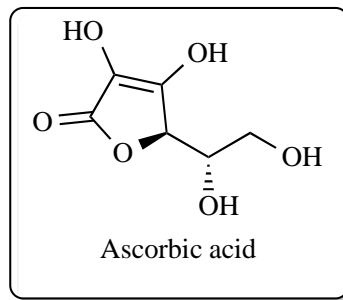
İnsan diyeti, antioksidan kapasiteye sahip veya yapısal özelliklerine göre reaktif oksijen radikallerini temizleyebilen bir dizi farklı bileşik içerir (Gülçin 2012).

Eksojen antioksidanlar içinde diyetle besinlerden alınan, bitkisel kökenli, doğal antioksidanlar ve dışarıdan alınan sentetik antioksidanlar mevcuttur. α -Tokoferol, askorbik asit, karotenoidler ve flavonoidler doğal antioksidanların en önemli temsilcileridir ve oksidatif hasara karşı vücut direncini artırmada önemli rol oynarlar. Sentetik antioksidanların kullanılan en popüler örnekleri bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil galat (PG) ve tersiyer bütillhidrokinon

(TBHQ) gibi fenolik bileşiklerdir. Sentetik antioksidanlar her zaman alkilerin yağlarda çözünürlüğünü artırır. (Gülçin *et al.* 2010; Gülçin 2012). BHA ve BHT'nin toksik ve kanserojen etkilerinin bulunduğu şüphesiyle kullanımı kısıtlanmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu nedenle doğal ve güvenli gıda uygulamalarında doğal antioksidanlara karşı artan bir ilgi vardır (Gülçin 2006b, 2007, 2012).

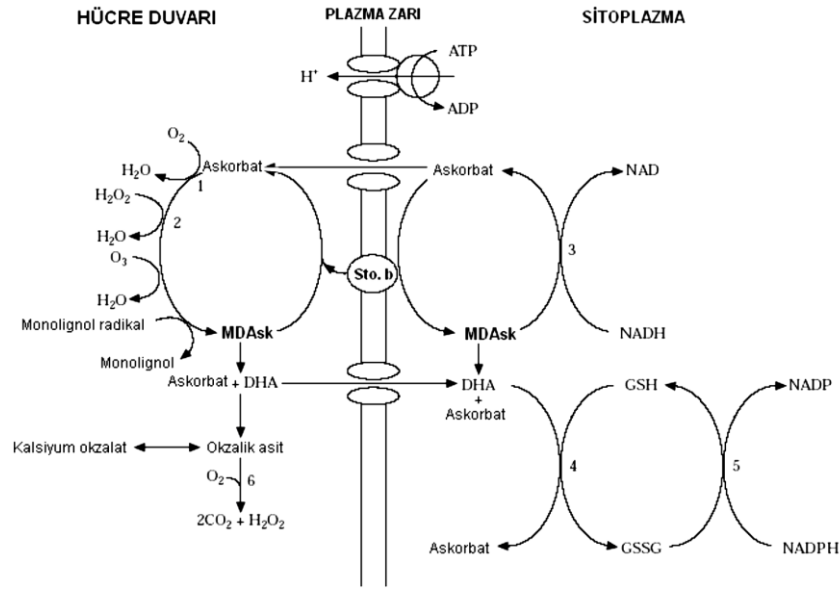
Doğal antioksidanların, antibakteriyal, antiviral, antienflamatuar, antialerjik, antitrombotik (kan sulandırıcı) ve vazodilatör aktivite (damar genişletici) dahil geniş bir biyolojik etki yelpazesine sahiptir. Antikanserojen, antimutajenik ve yaşlanma karşıtı etkiler göstererek diğer antioksidanlar arasında önemli yaşamsal özellikler taşırlar. Bu nedenle sentetik antioksidanlar yerine baharat ve bitki özlerinden elde edilen doğal antioksidanlar geliştirilmiştir (Cook and Samman 1996; Liyana-Pathirana and Shahidi 2006). Doğal antioksidanlar bütün bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantar ve hayvansal dokularda bulunur (Pokorny 1999).

Askorbik asit; en az toksik ve en güçlü antioksidan olarak kabul edilir. Suda çözünen bir vitamindir. Birçok besin ve bitkide yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Elektron transferi ile radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırabilir (Gülçin 2012).



Şekil 1.7. Askorbik asitin kimyasal yapısı

C vitamini, vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir.

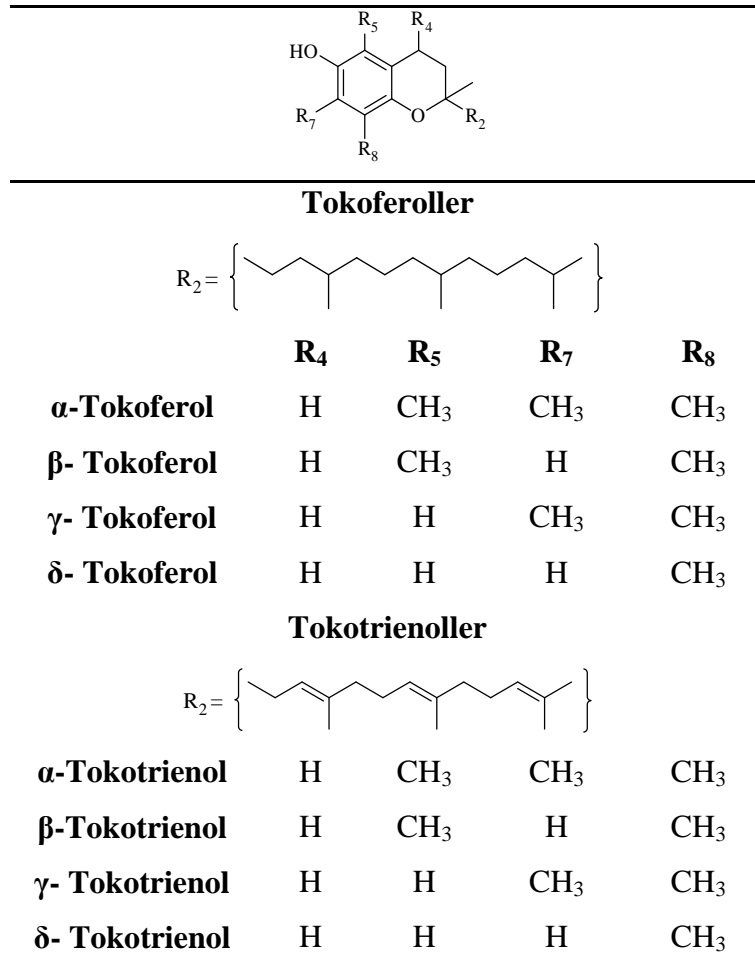


Şekil 1.8. Hücre duvarı ve sitoplazmadaki askorbat sistemi (Simirnoff 1996)

İnsan plazması 60 μmol civarında askorbat içerir. Diyetle meyvelerden alınan askorbik asitin en önemli kaynakları; turuncgiller, kivi, kiraz, kavun ve sebzelerden domates, karnabahar, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerdir. Brüksel lahanası ve lahananın 100 gramı 100 mg'dan fazla askorbat içerir. C vitamini, lipid peroksidasyonunu başlatmadan önce peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur. C vitamininin biyolojik fonksiyonları arasında birkaç önemli enzim için (örneğin; hidroksilazlar) kofaktör aktivitesi de yer alır (Gökpınar *et al.* 2006; Gülçin 2012).

Tokoferoller (Vitamin E); En iyi bilinen ve en yaygın kullanılan antioksidanlar tokoferollerdir. Tokoferoller ve tokotrienoller olarak sınıflandırılırlar ve her birinin de kendi içinde dört izomeri (α , β , γ ve δ) vardır. Bu grupta en yüksek aktiviteye sahip olan α -tokoferoldür.

E vitamini, yağda eriyen bir vitamindir. Hücrede organeller ve membran yapısında bulunur. Zincir kırma etkisi göstererek hücre membranını oksidasyondan korur (Gülçin 2012).



Şekil 1.9. Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması (Gülçin 2012)

Tokoferollerin hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen –OH grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında meydana gelen peroksil ve alkoksil radikallerinin yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşmesiyle reaksiyon zinciri kırılmış olur. Zincir reaksiyonu durdurulduğu için oluşan α -tokoferil-O[•] radikalının bir başka yağ asitiyle birleşme aktivitesi düşüktür (Memişoğulları 2005).



Tokoferollerin başlıca görevleri; membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu ve hücre membranları hasardan korumaktır. Lipofilik özellikleriyle hücre membranlarının yapısına kolaylıkla girebilirler (Çaylak 2011). Tokoferoller ayrıca hidroperoksitlerin parçalanmasını da yavaşlatırlar. Isıya karşı çok dayanıklıdırlar. α -tokoferol, oksidatif stabiliteyi artırır ve sıcaklık arttıkça oksidasyon hızını azaltmada etkilidir (Maslarova 2001). Yüksek konsantrasyonlarda E vitamini içeren başlıca gıdalar; bitkisel yağlar, fındık ve tohumları olmak üzere kepekli tahıllardır. Tokoferollerin eksikliği nörolojik hastalıklara neden olmaktadır. Tokoferollerin Parkinson hastalığına karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Gülçin 2012).

1.1.2.c. Fenolik bileşikler

Suda çözünen antioksidanların en önemli grubu fenolik bileşiklerdir. Meyve ve sebzelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Büyüme ve üremede olumsuz koşullara karşı koruyucu etkileri vardır (Bravo 1998). İnsan ve hayvan diyetlerinde bu bileşiklerin dışarıdan alınmasının gerekli olduğu düşünülmektedir (Gülçin 2012).

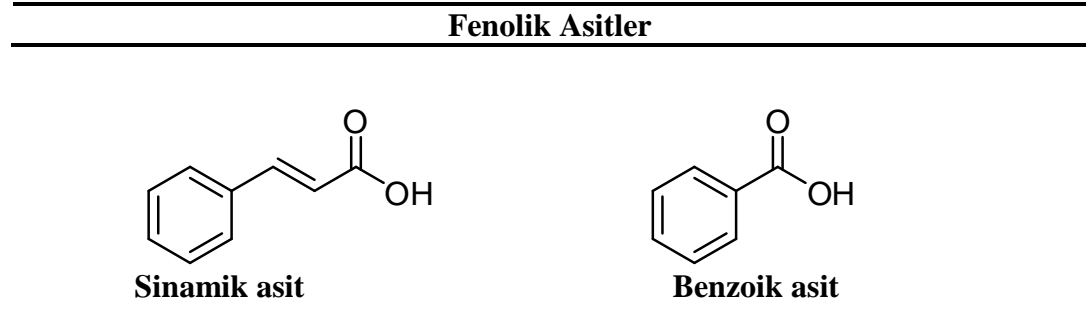
Fenolik bileşikler antioksidan aktiviteye sahiptirler ve bitkilerde doğal olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Aromatik zincir halkasına bir veya birden fazla hidroksil grubu bağlıdır (Balasundram *et al.* 2006). Fenolik bileşikler iyi bir hidrojen veya elektron vericisidirler. Zincir kırma özellikleriyle ve geçiş metalleri ile şelat oluşturarak antioksidan etki gösterirler. Membran akıcılığını azaltarak ve lipitlerin sıralanışını düzenleyerek serbest radikal difüzyonunu engellerler. Bu şekilde peroksidasyonu önlerler. Ayrıca bitki hücrelerindeki H_2O_2 'in temizlenmesinde de rol oynarlar (Çaylak 2011). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, fonksiyonel gruba bağlı hidroksil gruplarının sayısı ve orto, para ve meta pozisyonlarına bağlıdır (Rice-Evans *et al.* 1996; Gülçin 2010). Fenolik bileşikler, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozuklukları önlemede etkilidirler (Materska and Perucka 2005). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite göstermeleri gıdaları koruma çalışmalarında kullanılmalarını sağlamıştır. Yapılan birçok çalışma ile bu bileşiklerin kandaki kolesterol seviyesini azalttığı, antikanserojen etki gösterdiği ve osteoporozu engellediği bilinmektedir.

Fenolik bileşikler; fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılır (Meral vd 2012; Gülçin 2012) . Fenolik bileşikler ve örnekleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

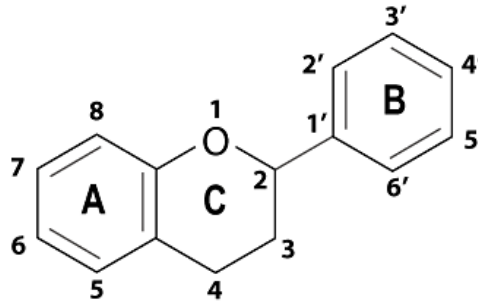
Çizelge 1.3. Fenolik bileşikler ve örnekleri

Fenolik Bileşikler	Örnekler
Fenolik asitler	
Hidroksibenzoik asitler	Gallik asit, siringik asit
Hidroksisünamik asitler	Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit
Flavonoidler	
Antosiyaninler	Depihidin-3-glikozit
Flavonoller	Kuersetin, kaemferol, kuersatagetin
Flavanoller (Flavan-3-oller)	Katekin, epikatekin, epikatekin galat
İzoflavonoidler	Genistein, formononotein, diadzein
Flavonlar	Rutin, apigenin, luteolein
Flavononlar	Mirisetin, naringin

Fenolik asitler; benzoik asit türevleri ya da sünamik asit türevlerinden gelen aromatik karboksili asitin hidroksi türleridir. Meyve ve sebze ağırlıklı diyet ile koroner kalp hastalığı, felç ve kanser gibi oksidatif hasarlara karşı fenolik asitlerin koruyucu potansiyelinden dolayı fenolik asitlere olan ilgi giderek artmaktadır. Fenolik asitlerin ve türevlerinin antioksidan etkileri aromatik halkaya bağlı hidroksil gurubunun pozisyonuna ve sayısına bağlıdır. Sünamik asit türevleri benzoik asit türevlerine oranla daha fazla antioksidan etki gösterir. Komşu inert gruplar sebebiyle oluşan sterik engel fenolik hidroksillerin antioksidan aktivitelerini artırır (Gülçin 2012).

Çizelge 1.4. Fenolik asitlerin genel kimyasal yapıları

Flavonoitler; Bitkilerin ortak bileşeni olan flavonoitler, yapraklar, saplar, kökler, meyve ve tohumlar gibi bitkilerin bütün parçalarından izole edilirler. Flavonoitler, bitkilerde fenilalanin ve tirozin aromatik amino asitleri ile malonattan oluşur. Flavonoitlere örnek olarak; epigenin, krisin, mirisetin, luteolin ve kamferol verilebilir. Ayrıca flavonoitler, düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterirler (Gülçin 2012).

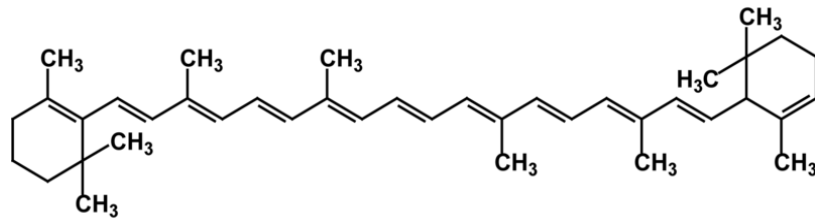
**Şekil 1.10.** Flavonoidlerin temel yapısı

Flavonoidler, radikal temizleme, metal şelatlama, α -tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ilave olarak vazodilatör, immunstimülan, antialerjik, östrojenik etkilerinin yanı sıra HSV, HIV, influenza ve rhinovirüslere karşı antiviral etki gösterirler. Fosfolipaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterirler. Kuersetin gibi majör flavonoidler kandaki trigliserit seviyesini azaltırlar ve agregasyonu azaltarak antitrombolitik özellik gösterirler.

Flavonoidler, hızla H^+ vererek lipid peroksi ve alkoksil radikallerini parçalayarak lipid peroksidasyonunu sonlandırırlar (Burak ve Çimen 1999).

Bitkilerdeki renkli flavonoidler, meyve ve sebzelerin renklerinin oluşmasında rol oynarlar. Flavonoitlerin alt grubu olan antosiyaninler, bitkilerde yaprak, çiçek ve meyvelere berrak mavi, kırmızı, mor ve menekşe rengini veren pigmentlerdir. Ayrıca antosiyaninler kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azaltırlar, ağrı kesici ve antidiyabetik etkileri bulunmaktadır (Du *et al.* 2008).

Karotenoitler; bilinen en yaygın doğal pigment kaynaklarıdır. Sebze ve meyvelere renk verirler. Bugüne kadar 600'den fazla farklı flavonoid karakterize edilmiştir. Vitamin A öncülleri olan bu provitaminler antioksidan etki gösterirler. En önemli karotenoitler; α -karoten, β -karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantindir. En bilinen karotenoit β -karoten'dir. İki vitamin A (retinol) molekülünün kondenzasyonundan oluşur. Ayrıca karoten açısından zengin bir diyetin bazı kanser türleri ile kardiyovasküler ve oftalmolojik hastalıklar gibi pek çok dejeneratif hastalık riskini azalttığı gözlenmiştir. Antioksidan aktiviteleri ile hücre ve dokuları oksidatif hasara karşı korurlar. β -Karoten; sarı, turuncu, kırmızı sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunur (Baskın and Salem 1997; Sies and Stahl 2003; Gülçin 2012).



Şekil 1.11. β -Karoten'in kimyasal yapısı

β -Karoten, çok güçlü bir singlet oksijen temizleyicisidir. Hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunun önlenmesini sağlar.

β -karoten, düşük oksijen seviyelerinde etkili olduğundan yüksek oksijen seviyelerinde etkili olan E vitamininin antioksidan etkisinin tamamlayıcısıdır (Murray *et al.* 1993; Akkuş 1995).

1.2. Kapsaisin

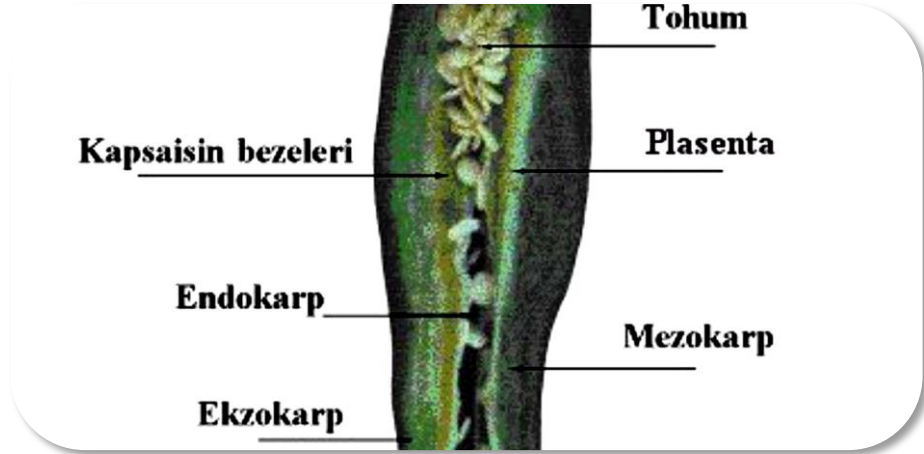
Solanaceae familyasının *capsicum* cinsine ait bir bitki olan acı kırmızı biberin (*Capsicum annuum*) anavatanı Orta ve Güney Amerika olup, sebze ve baharat olarak tüketilmektedir (Şener ve Şahin 2010).



Acı kırmızı biber yapısında kapsaisin, nordihidro-kapsaisin, homodihidro-kapsaisin, dihidro-kapsaisin ve homokapsaisin olarak adlandırılan kapsaisinoidler bulundurur. Kırmızı biberlerin kapsaisinoid miktarı, önemli bir kalite kriteri olduğu gibi birçok ülkede sınıflandırmada dikkate alınmaktadır (Iwai 2001).

Kapsaisinoidlerin sentezinde L-fenilalanin ile başlayan mekanizma sinamik asit ve türevleri ile devam eder. Kırmızı biberin ona acılık veren kapsaisinoidlerden kaynaklanan çeşitli etkileri vardır. Kramp, diyare, soğuk algınlığı, ateş ve spesifik mide rahatsızlıklarında ilaç olarak kullanıldığı gibi tahriş edici etkisinin yanı sıra bir uyarıcı olarak tedavi edici etkisi de mevcuttur. Yapılan çalışmalarla kapsaisinoidlerin karsinojenite, mutajenite ve ülserle karşı etkili olduğu ve iştah açıcı özellik gösterdikleri

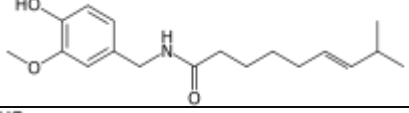
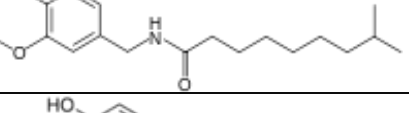
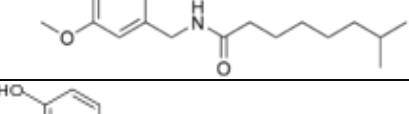
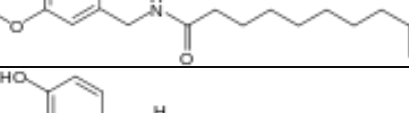
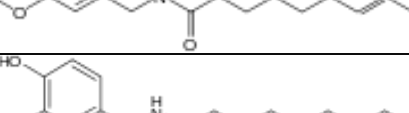

ortaya konulmuştur (Govindarajan and Sathyanarayana 1991).



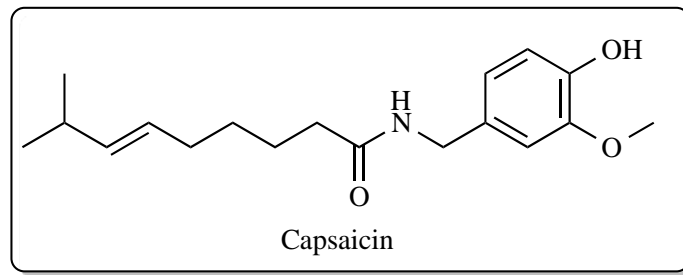
Şekil 1.12. Biber meyvesinin anatomisi (Anonymous 2001)

Kapsaisinoidler içerisinde en önemli acılık maddesi kapsaisindir. Non-nutrient” (besleyici olmayan) olarak değerlendirilen kapsaisinin besleyici özelliği hakkındaki bilgiler oldukça az ve yetersizdir (Iwai 2001). Kapsaisin ve dihidrokapsaisin tat ve sinirler üzerine etkisi diğer kapsaisinoidlerden iki kat daha fazladır. Çizelge 1.5’de kapsaisinoidlerin bağıl oranları, kimyasal yapıları ve acı tatlarının derecesini ifade eden Scoville dereceleri verilmiştir (Şener ve Şahin 2010).

Çizelge 1.5. Doğal ve sentetik kapsaisinoidler

Kapsaisinoid	Miktar	Acı derecesi	Kimyasal yapı
Kapsaisin	% 69	16.000.000	
Dihidro-kapsaisin	% 22	15.000.000	
Nordihidro-kapsaisin	% 7	9100000	
Homodihidro-kapsaisin	% 1	8600000	
Homokapsaisin	% 1	8600000	
Nonivamide		9200000	

Kapsaisin, ilk defa 1876 yılında Tresh tarafından kristal formda izole edilmiştir. Moleküler yapısı 1919'da Nelson ve Dawson tarafından açıklanmıştır. Capsaisin; moleküler formülü $C_{18}H_{27}NO_3$ (trans-8-methyl-N-vanillyl-6 nonenamide) olan kristal yapıda, lipofilik, renksiz ve kokusuz bir alkoloiddir. Molekül ağırlığı: 305,41 g/mol olup alkol ve yağda çözünebilir.



Şekil 1.13. Kapsaisinin kimyasal yapısı (aromatik halka+amid bağı+hidrofobik yan zincir)

Kapsaisin doğal olarak biberden saflaştırılırken, enzimatik olarak vanililamine dallanmış yağ asiti zincirinin eklenmesiyle sentezlenir (Reyes-Escogido 2011).

Kapsaisin ve diğer kapsaisinoid türleri kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, solunum sistemi, limbik sistem ve termoregülatör sistem üzerinde etkilidir (Surh and Lee 1995). Kardiyovasküler sistem üzerine etkisi, kullanılan miktar ve uygulama hızına göre farklılık gösterir. Kapsaisin miktarının artması ile kan basıncında sürekli bir artış gözlenmiştir (Chahl and Lynch 1987). Biber ekstrelerindeki bu etkinin otonom sinir sistemi tarafından düzenlendiği ve özellikle kapsaisinin sempatik sinir sistemini aktive ederek adrenalin salgılanmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Kapsaisinin vücutta oluşan toksinlerin ve yağların hızla dışarı atılması gibi birçok yararlı etkisinin olduğu bilinmektedir. Yapılan hayvansal deneylerde kapsaisinin efferent sempatik sinir liflerini aktive ederek enerji tüketimini artırdığı ve yağ depolanmasını baskıladığı gözlenmiştir. Ayrıca bazı karsinojen maddelerin DNA'ya bağlanmasını önlediği için antikanser ilaç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Söğüt *et al.* 2010). Gastrointestinal sistemde mukus üretimini artırarak gastrik hasarlara karşı koruyucu etkisi bulunur (Holzer and Sametz 1986).

Kapsaisin, nöronlarda bulunan ve ağrı uyarılarının santral sinir sistemine taşınmasını sağlayan P maddesini tüketerek beyine lokal ağrı uyarılarının ulaşmasını engeller. Böylece cilt ve eklem dokularındaki ağrılara karşı duyarlılığı azaltır (Şener ve Şahin 2010).

1.3. Enzimler

Enzimler canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100 'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Organizmada organik maddelerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimlerin yardımı ile gerçekleşmektedir. Enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonların tipine ve reaksiyon mekanizmalarına göre çeşitlilik gösterirler.

Enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılır (Keha and Küfrevioğlu 2005). Bunlar sırasıyla;

- ❖ **Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme veya redoks) reaksiyonlarını katalizlerler.
- ❖ **Transferazlar:** Hidrojen dışındaki fonksiyonel grupların transferrini katalizlerler.
- ❖ **Hidrolazlar:** Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalizlerler.
- ❖ **Liyazlar:** Bu enzimler hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir mekanizma ile substratlardan grup uzaklaştırıp çift bağların oluşmasını katalizlerler. Bizim çalıştığımız Karbonik anhidaz enzimi de ileride daha detaylı bir şekilde anlatılacağı gibi bir adet çift bağ içeren karbonik asitten (H_2CO_3) bir su molekülü uzaklaştırarak iki adet çift bağ içeren karbon dioksitin (CO_2) oluşumunu katalizler.
- ❖ **İzomerazlar:** Bir molekül içindeki geometrik, optik ve yapısal izomerizasyon reaksiyonlarını katalizlerler.
- ❖ **Ligazlar (Sentetazlar):** C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolizleyerek iki molekülün bağlanmasını sentezler.

Aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen fakat protein yapıları farklı olan enzimlere “İzoenzim“ denir.

İzoenzimler;

- ✓ amino asitlerinin sıra ve sayısının farklı olması,
- ✓ izoelektrik noktalarının farklı olması,
- ✓ her bir izoenzimin farklı geninin olması
- ✓ elektriksel alandaki hareketliliklerinin farklı olması

gibi özellikleri ile birbirinden ayrılırlar.

Başka bir deyişle izoenzimler aynı enzimin değişik formlarıdır ve farklı moleküler yapılarından dolayı elektroforez işlemiyle birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Bu

yüzden izoenzimler, canlıların genetik yapılarının belirlenmesinde önemli biyokimyasal belirteçlerdir (Özcan vd 2001; Devlin 2002).

Esteraz enzimleri; hidrolaz enzim grubuna ait olan, ester bağlarını parçalayan ve bu şekilde esterlerin hidrolizini katalize eden enzim grubudur.

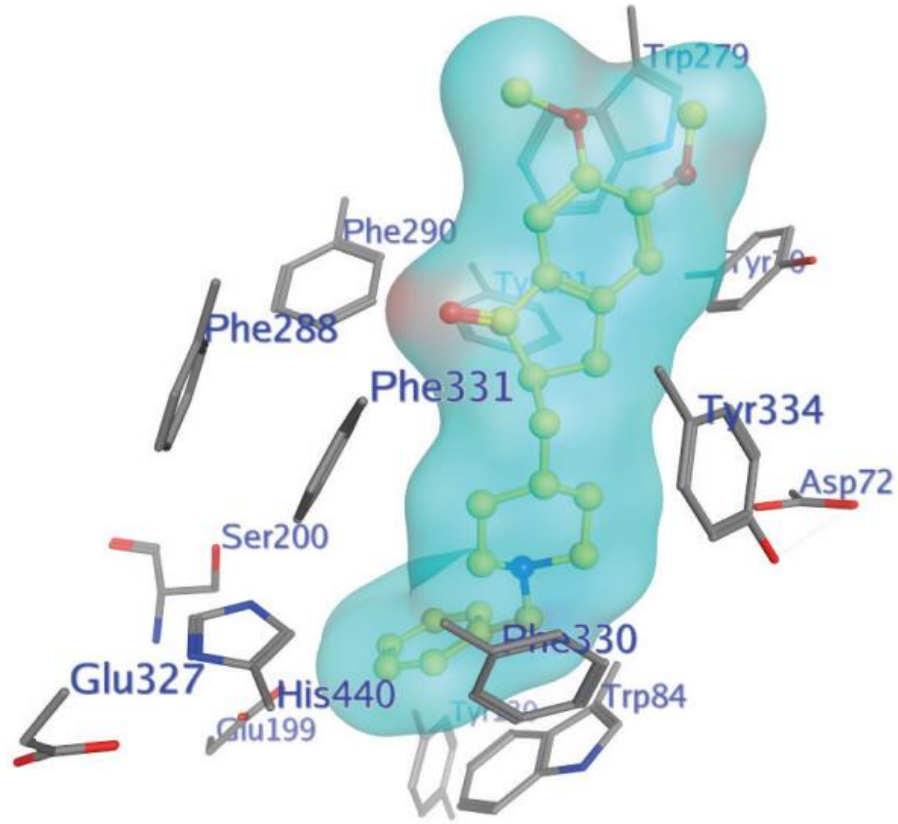
Esterazlar, substrat ortamında hidrolizden önce ve hidroliz süresince karbamat ve organofosfor bileşikleriyle olan farklı inhibisyonlarına bağlı olarak gruplara ayrılırlar. Buna göre esterazlar; kolinesteraz ve non spesifik esterazlar, aromatikesteraz ve aril esterazlar olarak sınıflandırılırken, kolinesterazlar ise asetilkolin esteraz ve pseudokolin esteraz olmak üzere yan gruplara ayrılırlar (Tuna 2007).

1.3.1. Asetilkolinesteraz

Dokularda serbest halde veya fosfolipidlerle bileşik halde bulunan, asetilkolini hidrolizleyen non spesifik bir enzimdir (Güven 2000). Asetilkolinesteraz başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferik birçok dokuda yaygın olarak bulunur ve asıl görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini bitirmektir (Massoulie *et al.* 1993). Pseudokolin esteraz (bütirikolinesteraz) ise serum, karaciğer, pankreas ve santral sinir sisteminde bulunur.

Asetilkolinesteraz (AChE), ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından ekstraksiyonla saflaştırılmıştır (Güven 2000).

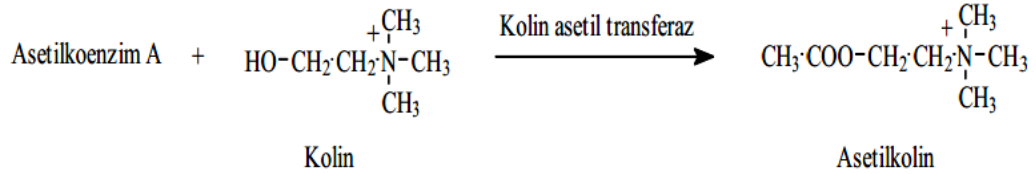
Enzimin üç boyutlu yapısı ilk kez Oakeshott ve arkadaşları tarafından aydınlatılmıştır. Enzim α -heliks ve β tabakalarından oluşur. 14 aromatik rezidü aktif merkezin çevresinde sıralanmıştır. Aktif merkezdeki Serin, Glutamat ve Histidin amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Molekülün yüzeyinde aktif merkezi çevreleyen substrat bağlanma bölgeleri bulunur (Oakeshott *et al.* 1999). Aktif bölge oyuğunda 5 alt bölge yer alır.



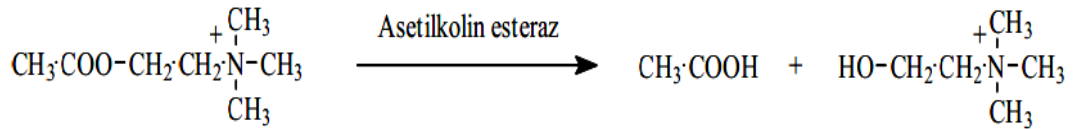
Şekil 1.14. Bir AChE inhibitörü olan E2020 ligandı ile kompleks yapmış asetilkolinesteraz enziminin aktif merkez oyuğu (Küçükkılınç 2014)

AChE, bir nörotransmitter madde olan asetilkolinin kolin ve asetata hidrolizinden sorumlu enzimdir. Asetilkolinin hidroliz olması sonucu sinir veya kasların paralizi ve lokal reseptörlerin devamlı uyarılması engellenir. AChE, asetilkolin ile bağlandığında esteratik alt merkez denilen aktif merkezin ikinci bölgesinde hidrolitik reaksiyonlar meydana gelir. Böylece asetilkolinin ester bağlarının kırılması ile asetat ve kolin açığa çıkar. Daha sonra presinaptik membrandaki yüksek affiniteli kolin toplama sistemi tarafından kolin hızla tutulur. Asetat, esteratik alt merkezdeki serin rezidüleri ile kovalent bağlanır ve AChE'nin geçici asetillenmiş formu oluşur. Bu geçici bileşiğin bir molekül su ile reaksiyona girmesiyle asetat grubu serbest kalır (Vale 1998).

Asetilkolin biyosentezi, kolinerjik sinir uçlarında kolin ile Asetil koenzim A'nın reaksiyona girmesi sonucu gerçekleşmektedir. Bu olay kolin asetiltransferaz (kolin asetilaz) enzimi tarafından katalizlenir (<http://yunus.hacettepe.edu.tr/~ucalis/>).



Asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi aracılığıyla çok hızlı bir şekilde asetik asit ve koline hidroliz olarak inaktif hale geçer.

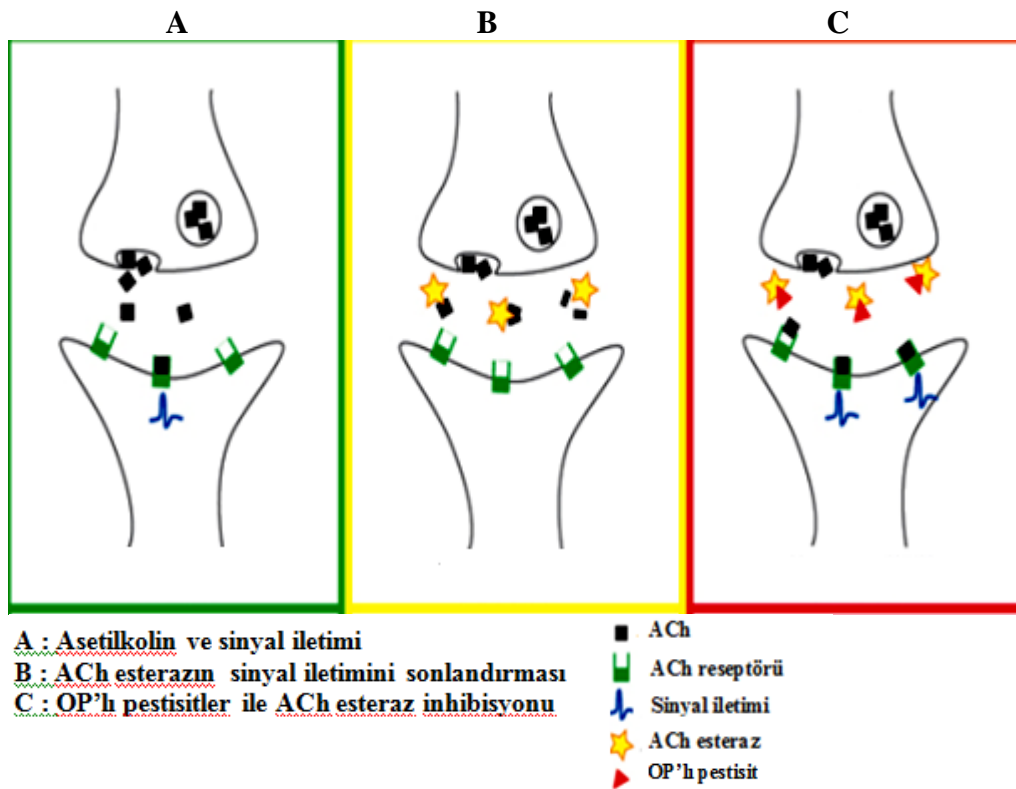


AChE'nin en önemli inhibitörleri organofosfatlı pestisidlerdir. Bu pestisitler asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek merkezi ve çevresel sinir sistemini etkilerler. Organofosfat zehirlenmelerinin tedavisinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanımını yeni bir yaklaşımdır. Organofosfat toksisitesine karşı etkili bir biyotemizleyicinin sahip olması gereken özellikler şöyle belirtilmiştir (Targiani *et al.* 2010):

- ✓ ön ilaç olarak kullanılmak üzere yeterli miktarlarda elde edilebilmesi
- ✓ yüksek dönüşüm sayısı
- ✓ dolaşımda uzun yarı ömür
- ✓ immunouygunluk

Organofosfatlar (OP), enzim aktif merkezinin uzun süre dolu kalmasına ve bu yüzden asetilkolini hidroliz edememesine neden olurlar. OP'ların aktif serini fosforilasyonlarını

takiben bir geçiş formu oluşur ve aktif merkez dolu hale gelir. AChE fonksiyonlarının kaybı sinaptik aralıklarda asetilkolinin birikmesine neden olur ve bunun sonucunda kas paralizi, nöbet ve boğulmalara bağlı ölümler meydana gelir (Aldridge and Reiner 1969; Fukuto 1990). ACh birikimi sonucu kolinerjik sinapsların aşırı uyarılması, organofosfat zehirlenmesinde klinik bulguların ortaya çıkmasını sağlar.



Şekil 1.15. OP zehirlenmelerinde AChE enziminin etkisi

Ortalama yaşam süresi uzadıkça, yaşlılığa ait sorunlar önem kazanmakta ve bu durum toplumları hem sosyal ve hem de ekonomik yönden olumsuz etkilemektedir. Özellikle yaşlı popülasyonda görülen ve halk arasında bunama olarak bilinen demansın en sık görülen tipi Alzheimer hastalığı (Alzheimer's Disease) çağımızın önemli hastalıkları arasına girmiştir (Adams *et al.* 1984; Bachman *et al.* 1992).

Genetik yatkınlık dışında Alzheimer hastalığının en önemli sebeplerinden birisi, beyindeki kolinerjik kayıptır. Kolinerjik kavşak ve sinapslardan salınan asetilkolin

miktarının Alzheimer hastalarında azaldığı saptanmıştır (Quinn 1987; Francis *et al.* 1999). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, bütirikolinesteraz miktarının da Alzheimer hastalarının beyinlerinde normal beyinlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Massoulie *et al.* 1993). Alzheimer hastalığının fizyopatolojisini açıklamak üzere yapılan bazı çalışmalarda glutaminerjik sistemin kronik olarak uyarılması sonucu glutamat miktarının artması ile artan intraselüler kalsiyum (Ca^{2+}) konsantrasyonunun hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Hynd *et al.* 2004).

Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde AChE inhibitörleri (AChEI), belirli bir başarı oranının elde edildiği tek ilaç grubudur. Normal-yaşlı kontrollerle, Alzheimer hastalarının beyindeki asetilkolin düzeyleri arasındaki farkın %50 civarında olduğu hesaplanmıştır (Forette and Boller 2000). AChE ilaçlar, asetilkolini hidroliz eden ve dolayısıyla asetilkolin miktarının azalmasına sebep olan, AChE' yi inhibe ederek, hastanın davranış bozukluklarında önemli bir gerileme sağlamaktadır (Giacobini 1995). Asetilkolin, iki sinir hücresi arasındaki iletişimi sağlayan bir nörotransmitterdir. AChE tarafından asetilkolin hidroliz edildiğinde, sinirler arasındaki geçiş sonlanmaktadır. Hafıza kaybı ile ilgili hastalıklarda asetilkolinin çok kısa sürede parçalandığı tespit edilmiştir. Asetilkolini parçalayan enzimin inhibe edilmesiyle sinirler arasındaki geçiş kuvvetlenmektedir.

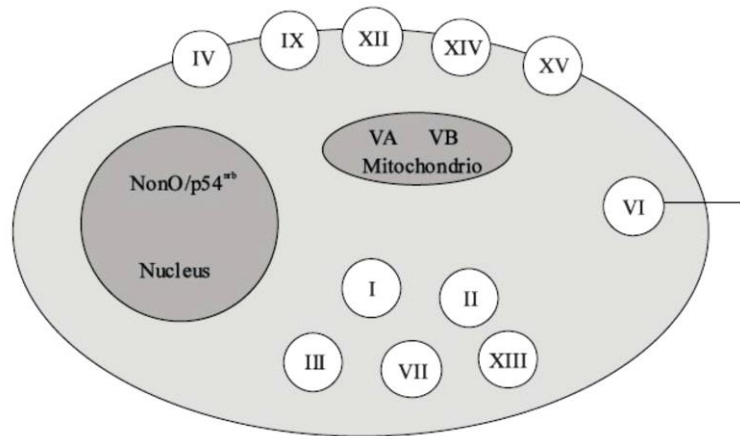
1.3.2. Karbonik anhidraz

Karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1), tüm memeli dokularında yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{2+} içeren karbonik anhidraz ilk defa sığır eritrositlerinde tanımlanmıştır. Bikarbonatın (HCO_3^-) dehidratasyonu ve karbondioksitin (CO_2) hidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir metaloenzimdir (Supuran and Scozzafava 2001; Nuti *et al.* 2007; Göçer and Gülçin 2013).

Tükrük bezleri, kaslar, pankreas, beyin, prostat ve endometriumda CA enzimi bulunmaktadır. Böbrek, göz lensi ve gastrik mukoza CA enziminin aktif olduğu dokular arasındadır. Bunların dışında kabuklu hayvanlarda kabuk yapımında, alglerde, balıkların

solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde de CA enzimi aktivitesi görülür (Wistrand 1981; Chegwiddden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2001). CA, bu dokularda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında son derece önemlidir (Supuran 2008).

Karbonik anhidraz enziminin prokaryot ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunan ve altı farklı gen ailesi tarafından kodlanan izoenzimleri vardır. İzoenzimler, bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak kimyasal özellikleri bakımından birbirinden farklı enzimlerdir. İzoenzimlerin aktiviteleri ve inhibitörlere afiniteleri farklılıklar gösterebilir. Karbonik anhidraz izoenzimleride kinetik özellikleri ve inhibisyon etkileri açısından farklılıklar gösterirler. CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, CAIV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA-VA ve VB mitokondriyal ve CA VI tükürükte olmak üzere 16 tane karbonik anhidraz izoenzimi belirlenmiştir. CA XV ise insanlarda ve diğer primatlarda eksprese olmaz rodent ve yüksek omurgalılarda olur. Ayrıca henüz sınıflandırılmamış formu olan NonO/p54^{nr} tanımlanmıştır (Sly and Hu 1995; Hilvo *et al.* 2005; Supuran 2008; Keha ve Küfrevioğlu 2011; Boztaş *et al.* 2015).



Şekil 1.16. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin hücredeki yerleşim bölgeleri

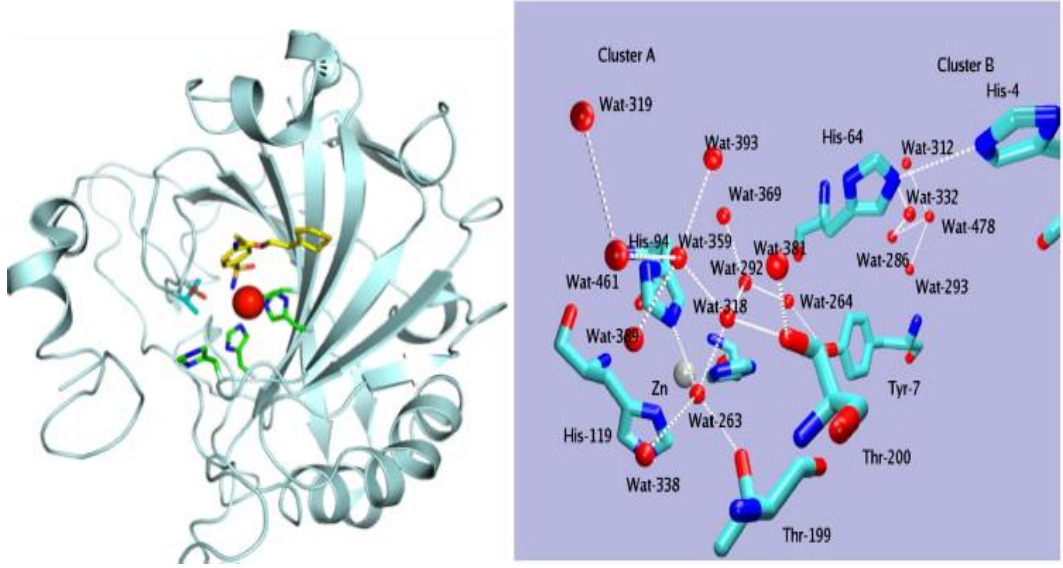
CA I, yaklaşık 30 kDa molekül ağırlığında iyi bilinen bir sitoplazmik CA izoenzimidir. CA I, eritrositlerde en bol bulunan proteinlerden birisidir. Ayrıca CA I izoenzimi, kornea endoteli, göz merceği, fetal membranlar ve plasentada da bulunur.

Gastrointestinal sistemde; yemek borusu, jejunum, ileum ve kolon epitelini ile pankreastaki Langerhans adacıkları ve ince bağırsaktaki enterosit hücrelerinde bulunur.

CA II ise eritrositlerde ilk olarak bulunan ve bilinen en etkili enzimlerden birisidir. Hemen her insanda doku ve organlarda yaygın olarak bulunan CA izoenzimidir. Sindirim sisteminde ekzokrin bezlerde bikarbonat salgılanmasında rol alır. Mide suyunun asitliğinin düzenlenmesini, duodenum, jejunum, ileum, kör barsak, kolon ve rektumdaki yüzey epitel hücrelerinde bulunarak mukus ve bikarbonat salgılanmasını sağlar. Merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere birçok doku ve organda bulunan CA II izoenzimi kemik erimesinin önlenmesinde hücre içi pH ve Ca^{2+} düzeyinin ayarlanmasında etkilidir (Leppilampi 2006).

CA I , 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 CA izoenzimidir. Aktivitesi en az olan CA III izoenziminin CO_2 hidrataz aktivitesi CA I izoenziminin %5'i kadardır (Wistrand 1980; Ryon *et al.* 1982).

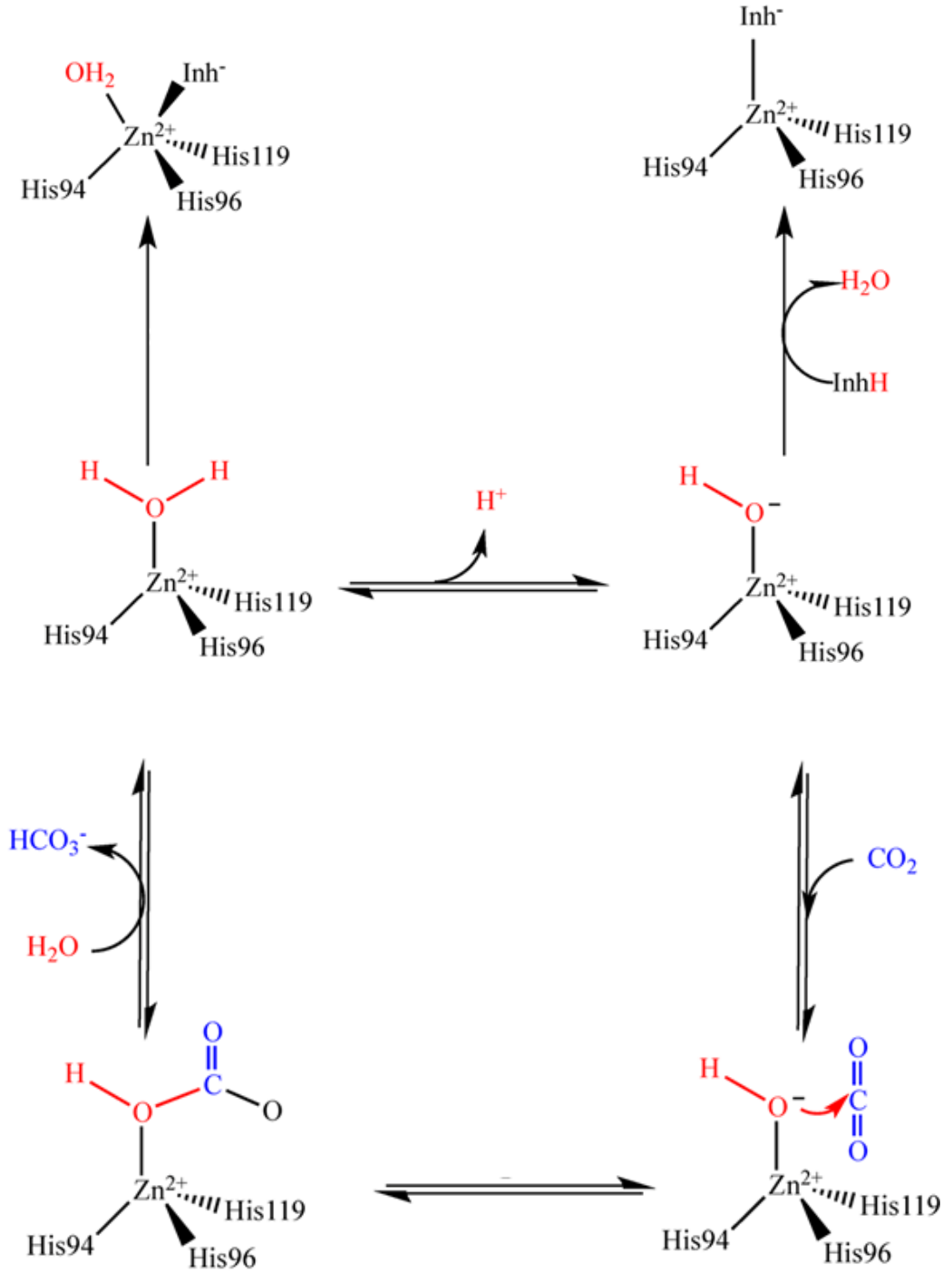
CA enziminin aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu ve bu iyonla bağlı bir hidroksil grubu bulunmaktadır. Reaksiyonların katalizlenmesinde Zn^{2+} iyonunun önemi büyüktür. Aktif bölgede bulunan 15 \AA derinliğindeki yarık H_2O veya OH^- iyonu ve His-94, His-96 ve His-119'dan oluşan üç histidin rezidüsü ile koordine edilmiştir. Metal iyonu bu yarığın tabanında yer alır. Aktif bölge yakınındaki aminoasitler proton verici ve proton gradienti oluşturacak biçimde düzenlenmiştir.



Şekil 1.17. Karbonik anhidraz II izoenzimi ve katalitik bölgesi

CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmak amacı ile yapılan çalışmalar, bu enzimin metabolizmada önemli görevlerinin bulunması, uygun şartlar altında uzun süre aktivitesini kaybetmemesi ve saklanabilmesi, çözelti ortamında kararlı olması sebebiyle avantajlı olduğunu göstermiştir (Supuran and Scozzafava 2001).

Şekil 1.18’de gösterildiği gibi OH^- grubunun Zn^{2+} iyonuna bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur. Oluşan aktif form güçlü nükleofilik yapısı ile CO_2 molekülüne saldırır. Böylece Zn^{2+} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonu oluşur. Bikarbonat (HCO_3^-) iyonu bir su molekülü ile yer değiştirerek çözelteye geçer. Zn^{2+} iyonuna su molekülü bağlanır ve enzim asit formuna dönüşür (Stams *et al.* 1998; Akıncioğlu *et al.* 2013).



Şekil 1.18. CA enziminin katalitik önleme mekanizması

CA enzimi karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizlerini katalizleyerek hidrataz aktivitesi gösterir. Aldehit, pirüvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları katalizlemesi ise CA

enziminin esteraz aktivitesini ortaya koymaktadır. Fakat organizmanın asit-baz dengesini düzenlemesi açısından hidrataz aktivitesi fizyolojik olarak daha önemlidir (Jabusch and Deutsch 1989; Supuran and Scozzafava 2001; Nar 2011).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir (Arslan *et al.*1996).

CA enzimi inhibitörleri; metalle kompleks yapan anyonlar ile aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. En güçlü inhibitörler R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahip sülfonamidlerdir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları inhibisyon etkisi gösterebilmeleri için önemlidir. Sülfonamidler hidrofilik ve hidrofobik bölgelere sahiptirler. İlk etkileşme sülfonamid yapısındaki N atomunun CA enziminin aktif bölgesindeki Zn²⁺ iyonuna bağlanması ile olurken, hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile etkileşme tamamlanmış olur (Maren 1987; Supuran and Scozzafava 2000; Arslan 2001).

1.4. Çalışmanın Amacı

Canlı sistemlerin temel özelliklerinden birisi enerji üretimini kontrol edebilmeleridir. Aerobik organizmalarda substratların okside edilmesi ile ATP gibi yüksek enerjili bir fosfat bileşiği üretilir. Bu esnada oksijenin redüksiyonu ve suya dönüşümü sırasında birçok serbest radikal ve reaktif ürünler oluşabilir. Serbest radikaller eksojen kaynaklar dışında vücuttaki oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarda devamlı üretilirler (Delibaş ve Özcankaya 1995). Çoğu serbest radikallerden oluşan ROS, normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar 1996). Metabolizmada oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü süperoksit radikali (O₂⁻) açığa çıkar. Bu radikalin dismutasyonu ile ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit oluşur. Yine süperoksit radikalinin yer aldığı bir dizi reaksiyon sonucu, özellikle mitokondri içinde hidroksil radikali (OH[·]) meydana gelir (Kavas 1989).

Fizyolojik miktarları hücre fonksiyonları için gerekli olan ROS'nin, aşırı üretimi birçok hastalığa yol açar ve erken yaşlanmaya sebep olur. ROS'nin aşırı üretilmesi lipid peroksidasyonunu başlatır. ROS üretimi ve ROS'nin antioksidan savunma sistemi tarafından inaktif hale getirilmesi arasındaki denge bozulduğunda, hücre zarları ve hücre içinde oksidatif modifikasyonlar oluşur.

Antioksidan savunma sistemleri, ROS'nin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak ve hücreleri oksidatif hasarlara karşı korumak için vardır. Bu nedenle antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarının başlamasını veya ilerlemesini inhibe eden bileşikler olarak da tanımlanabilir. Ayrıca antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu geciktirerek gıda ve ilaç ürünlerinin işleme ve depolama sürecinde raf ömrünü uzatırlar. BHA, BHT ve propil galat gibi bazı sentetik antioksidanların güvenilirliğinin şüpheli bulunması ve kullanımlarının kısıtlanması sebebiyle doğal antioksidanlara olan ilgi artırmıştır (Gülçin 2008; Gülçin 2012).

Doğal antioksidanların kaynağı ve kullanımı ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bitki ve baharatların bazılarının antioksidan kapasitelerinin, sentetik antioksidanlardan daha fazla olduğu kanıtlanmıştır. Kendilerine özgü lezzet ve aromaları, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri nedeniyle, daha geniş bioaktivite profiline sahip olan bitki ve baharatlar doğal antioksidan maddelerdir (Çoban ve Patır 2010).

Çalışmamızda acı kırmızı biberden elde edilen etken madde olan kapsaisin, antioksidan etkisinin yanı sıra karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ve asetilkolinesteraz enzimi (AChE) üzerinde gözlenen inhibisyon etkileri de araştırıldı.

Karbonik anhidrazlar, glikoneogenez, lipogenez (yağ üretimi), üregenez (üre üretimi), çeşitli hastalık yapıcı patojenlerin tümör oluşturması dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılırlar. CA inhibitörlerinin bilinen diüretik ve anti-glokom ilaç olarak kullanımı dışında antiobezite, antikanser ve antienfektif ilaç olma potansiyeline sahip olabileceği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle CA enziminin inhibisyon

mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi oldukça önemlidir (Supuran and Scozzafava 2001; Beydemir and Gülçin 2004; Supuran 2008).

Asetilkolinesteraz, başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferel birçok dokuda yaygın olarak bulunan ve kütlesi 70-80 kDa aralığında olan bir glikoproteindir (Massoulie *et al.* 1993). Asetilkolinin (ACh) kolin ve asetik asite hidrolizini sağlar. Asetilkolin (ACh), beyinde bellek kaybı ile ilgili önemli bir nörotransmitterdir. Alzheimer hastalığı, AChE aktivitesinin bozulması sonucu merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkar. Alzheimer hastalığında normal fizyolojik koşullarda dikkati arttıran ve öğrenmeye yardım eden ACh seviyesinde değişiklikler meydana gelmektedir (Fisher 2008). Bu hastalığın tedavisinde ilaç olarak AChE inhibitörleri kullanılmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Gıda endüstrisinde gıdaların depolanma süreçlerini artırmak amacıyla BHA, BHT ve PG gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak antioksidan olarak kullanılan bu kimyasalların olası toksik etkilerine karşın doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır (Vareltzis *et al.* 1997; Gülçin *et al.* 2006; Gülçin 2008).

Bitkiler arasında yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay, hayvansal ürünlerdeki peptitler, amino asitler ve karotenoidler, enzimlerden glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz ile bazı mikroorganizmalar en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer almaktadır (Hall III 2001). Bunların antioksidan aktiviteleri C vitamini, fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Koca ve Karadeniz 2005).

Gıdalarda bulunan çeşitli doğal antioksidanların, oksidasyonu engelleyerek arteroskleroz, malarya, romatoid artrit ve diyabette faydalı olabileceği, antitümoral, antimutajenik, antimetastatik, antitrombik, antiülser, antikarsinojenik ve antihipertansif ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiaging etkileri de olduğu yapılan *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır (Yılmaz 2010).

Bitkilerdeki bazı fenolik bileşikler şu şekilde sıralanabilir: klorojenik asit; kahve, havuç ve patatesten ferulik asit; mısır, pancar ve tek çenekli sebzelerde, flavonlar ve flavonoller; soğan, yeşil sebzeler, çay ve elmada, katekin ve diğer flavan-3'ler; çay, elma ve üzümde, isoflavonlar soya tohumunda, ligantlar ise mısırdan bulunur (Stahl *et al.* 2002).

Süt ve et ürünleri, β -karoten, lutein, likopen, β -kriptoksantin ve zeaksantin yönünden zengindirler. Karotenoidler bitkilerin fotosentetik kısımlarında, meyvelerde, havuç ve domateste bulunurlar (Stahl *et al.* 2002). Yapılan hayvan deneylerinde β -karoten alımı

ile akciğer, mide, sindirim sistemi gibi bazı kanser tiplerinin engellenmesi arasında doğru bir orantı olduğu belirlenmiştir (Dimascio *et al.* 1991).

C vitamini, nitrik oksitin yıkımında ve LDL oksidasyonunda görev alır. Suda iyi çözünmesi nedeniyle trombosit birikimini engelleyebildiği ve hipotansif etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Akın vd 2008; Kusano and Ferrari 2008).

Bitkisel yağlar, yağlı gıdalar, mayonez, fındık, ceviz, tahıllar, soya, kakao, unlu gıdalar, baklagiller, ayrıca hayvansal gıdalarda mevsimlere göre (özellikle deniz ürünleri) değişkenlik gösterebilir de önemli α -tokoferol kaynağıdır. Tokoferol ve tokotrienoller yağlarla birlikte barsakların üst kısımlarından emilmekte, lenf yoluyla karaciğere erişmekte, safra asitleri ve pankreas salgılarının emilimlerinde etkili olmaktadır (Stahl *et al.* 2002). Ayrıca tokoferoller, hücre çoğalması ve pıhtılaşmayı önleyerek bağışıklık sisteminin korunmasında görev alırlar (Kurilich *et al.* 1999). E vitaminince zengin bir diyet katarakt ve kalp-damar hastalıkları riskini de azaltır (Koca ve Karadeniz 2005).

Doğal antioksidanlara olan ilginin artması ile birlikte bitkisel kökenli antioksidanlarla ilgili çalışmalarda artış göstermiştir. Çilek (Abuja *et al.* 1998), kiraz (Wang *et al.* 1999), ılgın (Oktay *et al.* 2007), turunçgiller (Saleh *et al.* 1998), kızılıçık (Gülçin *et al.* 2005c), ahududu (*Rubus idaeus*) (Gülçin *et al.* 2011), kivi (Bursal and Gülçin 2011), su mercimeği (Gülçin *et al.* 2009b), nane (Elmastas *et al.* 2005), defne (Elmastas *et al.* 2006a), fesleğen (Gülçin *et al.* 2007), ısırgan (Gülçin *et al.* 2004b), mantar (Elmastas *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a), adaçayı (*Melisa officinalis*) (Köksal *et al.* 2011), madımak (*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2003), evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), lavanta ve karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), karabiber (Gülçin 2005), kuru erik (Donavan 1998), brokoli (Gülçin *et al.* 2004e), meyan kökü ve yaprakları (*Glycyrrhiza glabra L.*) (Şerbetçi Tohma and Gülçin 2009), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), muşmula (*Mespilus germanica*) (Gülçin *et al.* 2011) gibi çeşitli sebze, meyve ve bitkilerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998) ve meyve sularında (Wen *et al.* 1999) yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir.

Bu sebzeler, meyveler ve bitkiler dışında farklı kaynaklardan saflaştırılmış veya saf haldeki bazı maddelerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri de araştırılmıştır. Dantrolene sodyum (Büyükokuroğlu *et al.* 2001), serotonin (Gülçin 2008), melatonin (Gülçin *et al.* 2002; 2003b; Gülçin 2008), morfin (Gülçin *et al.* 2004a), L-karnitin (Gülçin 2006b), L-adrenalin (Gülçin 2009a), L-tirozin ve L-dopa (Gülçin 2007), propofol (Gülçin *et al.* 2005a), yeni sentezlenmiş bazı dimerik fenol bileşikleri (Gülçin and Daştan 2007), kafeik asit (Gülçin 2006), kurkumin (Ak and Gülçin 2008), CAPE (Göçer and Gülçin 2011), rezveratrol (Gülçin 2010) ve eugenol (Gülçin 2011) gibi biyolojik açıdan önemli olan saf moleküllerin antioksidan kapasiteleri ve radikal giderme aktiviteleri incelenmiş, bazıları için muhtemel mekanizmalar önerilmiştir.

Son yıllarda kapsaisinin, antitoksik, antimutajenik ve antikanserojen etkileri saptanmıştır. Ayrıca kapsaisinin tümör uyarıcı etkisi olabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir (Singh *et al.* 2001). Szolcsanyi and Bartho (1981) düşük konsantrasyonlarda kapsaisin tüketiminin midenin savunma mekanizmasını artırdığını ve ülser oluşumunu önlediğini gözlemlemişlerdir.

Kapsaisin, tükürük ve ter salgısını da artırmaktadır. %10 acı biber içeren ve protein değeri düşük bir diyetle beslenen sıçanlarda %54 sıklıkta hepatom (karaciğer tümörü) olduğu ifade edilmektedir. Bu durum, özellikle diyet proteinin düşük olduğu yörelerde kapsaisinin karaciğer kanseri etyolojisinde rol oynadığını düşündürmektedir (Beis 1990).

Kapsaisinin lipit peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ancak etki mekanizmasının net olarak ortaya konulmadığı belirtilmektedir. Kapsaisinin DPPH radikalleri ve sudaki OH⁻ radikallerini etkili bir şekilde giderdiği ve etki düzeyinin α -tokoferolle benzer olduğu ve bir molekül kapsaisinin 2 molekül DPPH radikalini giderdiği bildirilmiştir.

Bununla beraber kapsaisinin ADP/Fe²⁺ tarafından sıçan karaciğerinin mitokondrial membranında oluşturulan lipit peroksidasyonunu çok etkili bir şekilde inhibe ettiği ve

bu etkinin α -tokoferolden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. α -Tokoferol sadece lipit membran içindeki radikal zincir reaksiyonlarını inhibe ederken, kapsaisinin hem aktif oksijen türlerinin farklı formlarını hem de radikal zincir reaksiyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu antioksidatif etkinin, membrandaki yerleşim yeriyle de ilişkili olduğu, membran yüzeyi ve yakınındaki reaktif oksijen türleri için kapsaisinin en etkin ajan olduğu belirtilmiştir (Kogure *et al.* 2002).

ACh sentezinde meydana gelen düşüşler, kolinasetiltransferaz enziminin miktar ve işlevlerinin ve kolinin geri alımının azalması, kolinerjik nöron ve aksonlarda oluşan hasarlara, hatta nöronlarda kayıplara sebep olmaktadır. Bu hasarlar sonucu meydana gelen nörodejeneratif hastalıkların en yaygın olanı Alzheimer hastalığıdır. Bilişsel işlevlerde azalma, özbakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize edilen bir hastalıktır (Gilman 1997; Lleo *et al.* 2006; Fisher 2008).

Alzheimer hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlar olan AChE inhibitörleri, kolinerjik sinapslardaki ACh miktarlarını yükselterek kolinerjik nörotransmisyonu güçlendiren ilaçlardır. Takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş kolinesteraz inhibitörleridir. Takrinin hepatotoksik etkisi sebebiyle kullanımı kısıtlanmıştır (Friedlander *et al.* 2006; Lleo *et al.* 2006; Bassil and Grossberg 2009). Bu durum dikkatleri doğal kaynaklı inhibitörlere çekmektedir.

Benzer şekilde OP zehirlenmesi tedavisinde yararlanılan AChE inhibitörleri arasında, karbamik asit türevleri, antimuskarinik maddeler, sinir sistemini ekileyen maddeler ve güçlü nükleofiller olan oksimler sıralanabilir (Küçükkılınç 2011). OP ve karbomatlı pestisitler ACh analoglarıdır. Ancak enzim komplekslerine dönüşümsüz bağlanırlar (Güven 2000). AChE enzimi stoikiyometrik bir biyotemizleyici olup, enzim başına bir molekül OP temizlemektedir (Cochran *et al.* 2011).

Yapılan çalışmalarda bir karbomat pestisiti olan karbofuran, çeşme suyundan çıkarılarak test edilmiş ve çok iyi bir kolinesteraz inhibitörü olduğu belirlenmiştir. Ahtapot beyni, dana ön beyni ve insan eritrositlerinden çıkarılan on iki adet alkil ve aril grubu bileşik farklı AChE inhibisyonları göstermiştir. İnhibitörler substrat ile yarışma halinde olup asetilkolin tarafından hidrolize edilmişlerdir (Moris *et al.* 1995; Pang *et al.* 1997).

Kurt ayağı (*Club moss*) bitkisinden ekstrakte edilen Huperzine'nin kuvvetli bir AChE inhibitörü olduğu bulunmuştur. Huperzine'nin substrata yüksek afinite gösterdiği gözlenmiştir (Boyle *et al.* 1997).

Lui ve arkadaşları (1997) yaptıkları bir çalışmada marul ve domates gibi yüze yakın sebze ve meyveyi test ettiklerinde AChE üzerine inhibitör etkisinin %6'dan daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum test edilen sebzelerdeki karbofuran miktarının 0.1 mg/kg'dan az olması ile açıklanmıştır (Lui *et al.* 1997).

Karbonik anhidraz enzimi (CA; E.C.4.2.1.1), pH düzenleyici etkisiyle karakterize edilmiş, eritrositler dahil çoğu dokuda bulunan bir enzimdir. CO₂'nin hidratasyonu ve HCO₃⁻'in dehidratasyonu reaksiyonlarını geri dönüşümlü katalizler. Ayrıca fizyolojik pH kontrolü, gaz dengesi, kireçlenme, fotosentez ve benzeri proseslerde kilit rol oynamaktadır (Gülçin *et al.* 2004).

Memelilerde α -CA ailesine bağlı aktif olan 14 adet karbonik anhidraz izoenzimi bulunur. CA izoenzimleri hücresel dağılımları, kinetik özellikleri, doku dağılımları ve inhibisyon profilleri ile farklılık göstermektedirler (Karhumaa *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2001).

CA gen ailesine ait izoformlar omurgalı dokularında, yüksek bitkilerde ve siyanobakterileri de içeren alglerde, prokaryotlarda, *Thalassosira weissfloggi*'de keşfedilmiştir (Roberts *et al.* 1997; Lane and Morel 2000; So *et al.* 2004). Karbonik anhidraz enzimi, suda yaşayan fotosentetik organizmalarda çevredeki CO₂ artışını önlemek amacıyla CO₂ konsantrasyonunu da sağlamaktadır.

Klinik biyokimya ve tıptaki araştırmalarda yeni ilaçlar geliştirmek ve yeni teşhis araçları elde etmek amacıyla CA izoenzimleri ve inhibitörleriyle ilgili çalışmalar hala yoğun bir şekilde devam etmektedir (Supuran 2008).

CA enzimleri, hayvanlar ve özellikle de insan hastalıklarının çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef olmuştur. Asetazolamit, brinzolamit ve dorzolamit gibi sülfonamit türevi ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2003).

Hastalıkların tedavi ve teşhisinde CA inhibitörlerinin önemi, Glaukoma hastalığının tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu alışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış, bunun sonucu olarak da CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu alışmalar sayesinde çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler Glaukoma tedavisi başta olmak üzere antitümör, ağrı kesici, antiülser, diüretik, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali geliştirilmesinde yol gösterici olmuştur. Farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel prosesinin anlaşılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine imkan sağlamaktadır (Franchi *et al.* 2003; Winum *et al.* 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Antioksidan çalışmalarda kullanılan 2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonikası) (ABTS), N,N-dimetil-p fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, α - tokoferol, oktopamin, linoleik asit, aseton ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, (Sternheim Germany)'dan satın alındı.

Sepharose- 4B, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve L-tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamit, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetil aminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamit, N,N'-metilen bisakrilamit, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk'ten alınmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Hanna Instrument
Hassas terazi	Scaltec SBA 41
İnkübatör	Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still

Magnetik karıştırıcı	Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ 'lük Kuartz küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

3.1.3.a. Fe³⁺ - Fe²⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

- 1. 0,2 M pH:6,6 fosfat tamponunun hazırlanması:** 6,24 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 destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- 3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması:** 15 g TCA destile suda çözüldü ve çözeltilinin toplam hacmi destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- 4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması:** 165 mg FeCl₃.6H₂O destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

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

- 1. 0,01 M'lık CuCl₂ çözeltisinin hazırlanması:** 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
- 2. 7,5x10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması:** 78 mg Neokuprin alındı ve 50 mL etanolde çözüldü.
- 3. 1 M'lık CH₃COONH₄ tamponunun hazırlanması (pH:6,5):** 7,7 g CH₃COONH₄ 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.

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

1. 10^{-3} M'lık DPPH çözeltilisinin hazırlanması: 39 mg DPPH 100 mL etanolda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

3.1.3.d. 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⁺ çözeltilisinin 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. 2,45 mM'lık K₂O₈S₂ çözeltilisinin 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.

3.1.3.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⁺ çözeltilisinin hazırlanması: 209 mg DMPD 10 mL destile suda çözümlenerek hazırlandı.

3. 0,001 M'lık DMPD⁺ çözeltilisinin hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltilisinden 1 mL alınarak 100 mL'lik ve 0,1 M'lık (pH:5,3) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 mL ve 0,05 M'lık FeCl₃ ilave edilerek hazırlandı.

4. 0,05 M'lık FeCl₃ çözeltilisinin hazırlanması: 0,81 g FeCl₃ 100 mL saf suda çözümlenerek hazırlandı.

3.1.3.f. Total antioksidan aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. **0.04 M pH:7,4 Fosfat Tamponu Hazırlanması:** 0,48 g NaH_2PO_4 alındı ve 80 mL destile suda çözüldü, pH metre ile PH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. **Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması:** 0,017 M linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 μL linoleik asit 50 mL pH:7,4 fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.
3. **%3,5'luk HCl Çözeltisinin Hazırlanması:** %37'lik HCl'den 9,46 mL alınarak destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
4. **20 mM FeCl_2 Çözeltisi Hazırlanması:** 281 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$, %3,5'luk HCl ile çözümlenerek hacim aynı çözeltiyle 100 mL'ye tamamlandı.
5. **%30'luk NH_4SCN Çözeltisinin Hazırlanması:** 15 g NH_4SCN destile suda çözüldü, hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.g. 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. **10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,312 g TPTZ alındı ve 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.
4. **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.
5. **FRAP Reaktifinin Hazırlanması:** 10 hacim 0,3M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20mM'lık $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden oluşur.

3.1.3.h. Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler

1. **0,1 M'luk Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması:** 1,21 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'luk HCl Çözeltisinin Hazırlanması:** 1,60 mL %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. **%0,2'lik Bipiridil Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,2 g Bipiridil alındı ve 100 mL'lik, 0,2 M'luk HCl çözeltisinde çözüldü.
4. **2 mM'luk FeSO₄ Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,028 g FeSO₄.7H₂O alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.

3.1.3.i. Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. **1 M'luk Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması:** 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'luk 0,370 g EDTA 200 mL destile suda çözüldü pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. **10mM'luk Asetilkolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.145 g Asetilkolin iyodat alındı ve 50 mL destile suda çözüldü.
3. **10 mM'luk DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması:** 0.01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat alındı 50 mL destile suda çözüldü.

3.1.3.j. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. **Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon (0,2 M NaHCO₃, pH:8,8) :** 16,8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözümlenerek, 1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. **CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon (0,15 M Na₂CO₃/0,1 M NaHCO₃ pH:10):** 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4g (0,1 mol) NaHCO₃'m 1 L saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
3. **Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl/0,1**

M Na₂SO₄, pH:8,7): 3,03 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 1L'ye tamamlandı.

4. Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ pH:8,7): 3,026 g (25 mmol) Tris ve 3,12 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. Daha sonra 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 L'ye tamamlandı.

5. Kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH:6,3): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,63 g NaCl alınıp, pH:6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.

6. Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti (0,05 M Tris-SO₄, pH:7,4): 6,06 g Tris 950 mL destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

7. Kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄, pH:5,6): 9,2 g NaClO₄ tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol CH₃COONa.3 H₂O, 120 mL 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.

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 çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

9. Veronal tamponu (0,025 M); 5,17 g sodyum barbitalin 950 mL suda çözülüp pH:8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

10. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

11. İndikatör çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,22 g NaHCO₃' ün 1 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

12. Brom Timol Mavisi Çözeltisi (%0,04): 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

13. Stok kapsaisin çözeltilisinin hazırlanması: 10 mg kapsaisin (g/mol) 10 mL etanol içerisinde çözüldü.

3.1.3.k. SDS - Poliakrilamit 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. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

4. Akrlamit-Bisakrlamit çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamit ve 0,8 g bisakrlamit karışımı 100 mL suda çözüldü.

5. SDS çözeltisinin hazırlanması (%10): 10 g SDS 90 g saf suda çözüldü.

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

7. Jel fiksasyon 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.

3.2. Kapsaisinın Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerine Etkisi ile İlgili Çalışmalar

3.2.1. Deneyde kullanılacak kanın temini

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

3.2.2. Enzim saflaştırma çalışmaları

3.2.2.a. hCA enzim hemolizatının hazırlanması

Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınarak, tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için 4°C'de 20.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklarla dikkatlice alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

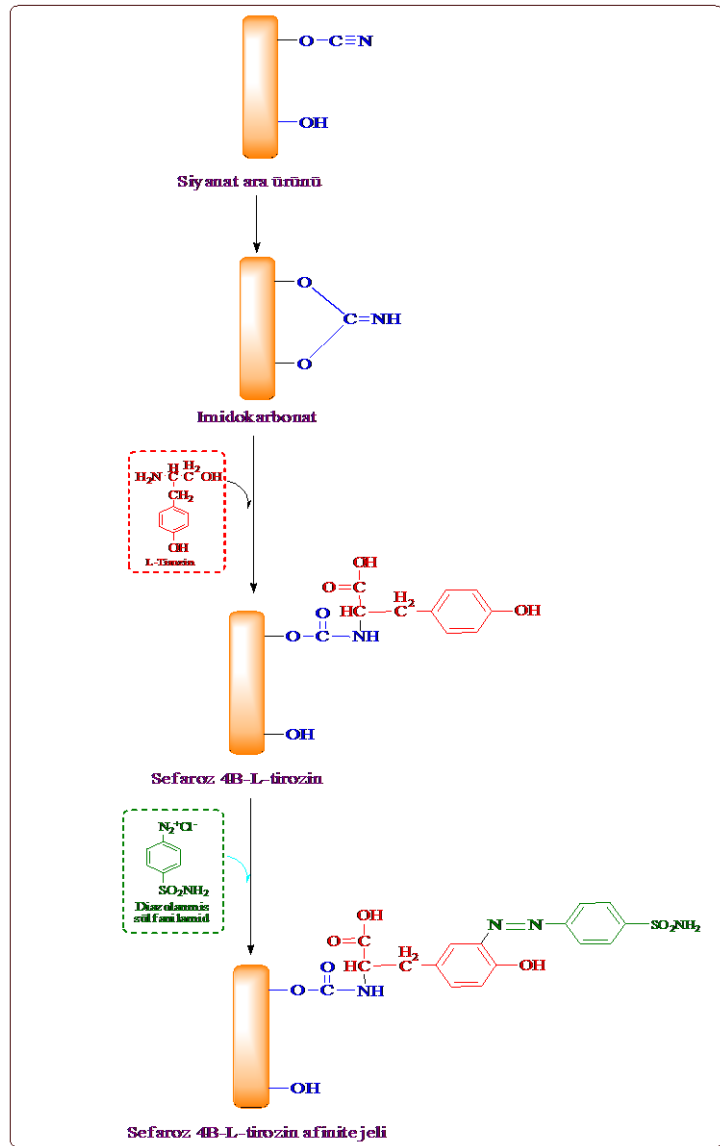
3.2.2.b. hCA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite 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 afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

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 çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2

saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C’de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL’lik 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.



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

Sülfanilamit kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamit, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit 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.

Afinite kolonunun paketlenmesi

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

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 hCA 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.

3.3. hCA Enzim Aktivitesi Tayini

3.3.1. Hidrataz aktivitesi

hCA I ve II izoenzimlerinin aktivite tayini için hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metodudur (1964). CO₂'in hidrasyonu 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 (0.025 M, pH:8,2), 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 (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

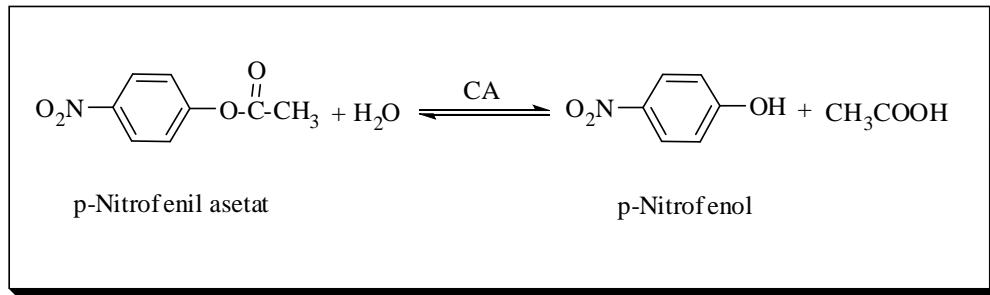
Bu yönteme göre hCA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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.

3.3.2. 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 aşağıda 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). 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 katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.1. Esteraz aktivitesi için 3 mL’lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (pH:7,4;0,5 M)	1400	1400
<i>p</i> -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 katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.2. Esteraz aktivitesi için 1 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

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

Çizelge 3.2'deki 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 sıfırlandı.

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 tercih edildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbands 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, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.4.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması 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 çözeltisinden 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 karıştırıldı. 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.

3.5. hCA Enzimi İçin Yapılan Kinetik alışmalar

3.5.1. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili alışmalar

İnsan kanından saflaştırılan hCA enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (1970). 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 (oban *et al.* 2008).

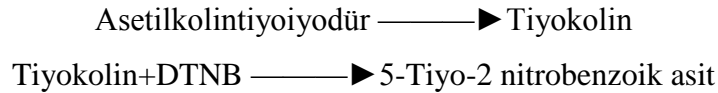
3.7. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Kapsaisinin Etkisinin Belirlenmesi

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

3.8. Kapsaisinin Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Kapsaisinin İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Kapsaisinin Asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi, Asetilkolinesteraz yöntemiyle araştırıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türü belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesterazlar,

asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan renk 412 nm'de ölçülür (Ellman 1961). Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda, başlangıç ve 5. dakikadaki absorbanları ölçülür.



Çizelge 3.3. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın küvet içeriği

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

3.9. Antioksidan Çalışmalar

3.9.1. Fe³⁺ - Fe²⁺ indirgeme kapasitesi

Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (1986). Bunun için öncelikle 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözülden farklı konsantrasyonlarda alınarak deney tüplerine aktarıldı ve çözeltinin hacmi destile suyla 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 mL ve 0,2 M'lık fosfat tamponu (pH:6,6) ile 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] ilave edilerek karışım 50°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 alınarak üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL %0,1'lik FeCl₃ ilave edildikten sonra 700 nm'de absorban ölçümü

yapıldı. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol olarak numune yerine su kullanıldı.

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

Kapsaisin Cu²⁺ indirgeme aktivitesinin belirlenmesinde Apak ve arkadaşlarının kullandığı metodun (2006) hafif bir modifikasyonu kullanıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda kapsaisin içeren deney tüplerine sırasıyla 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) eklendi. 30 dk.lık inkübasyon süresi sonunda 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

3.9.3. FRAP indirgeme kapasitesi

Total antioksidan için hazırlanan stok çözelti bu deneyde de kullanıldı. Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/mL konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde kapsaisin ve standart çözeltiler aktarıldı. Hacimleri tampon çözelti ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µL ,20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi ve 2250 µL FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 mL olması sağlandı. Deney tüpleri Vortex ile karıştırıldı ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbansları kaydedildi. Kör olarak asetat tamponu kullanıldı.

3.9.4. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıya 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı. Toplam hacimleri etanol ile 3 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH' çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında yarım saat inkübe edildikten sonra etanoldan oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 mL etanol ve 1 mL DPPH'çözeltisi kullanıldı.

3.9.5. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre belirlendi (1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi ilave edilerek ABTS radikalleri üretildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin absorbanı 734 nm'de 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesi tayin edilecek olan farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kapsaisin içeren tüplere birer ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildi. Yarım saatlik inkübasyon sonunda etanoldan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanlar kaydedildi.

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

N,N'-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliano ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal kation (DMPD⁺) elde edildi. Bunun için 100 mL'lik DMPD çözeltisine (pH:5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 mL FeCl₃ ilave edildi. Bu çözeltinin 1 mL si için 505 nm'de ölçüm yapıldı. DMPD⁺ radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik yoğunluğu 0,1 M'lık ve pH'ı 5,3 olan fosfat tamponu ile $0,900 \pm 0,100$ nm'ye ayarlandı. Günlük hazırlanan DMPD⁺ çözeltisinin absorbanı 12 saate kadar kararlı kalabilir.

Kapsaisin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10-30 µg/mL) deney tüplerine aktarıldı ve hacimleri destile suyla 0,5 mL'ye tamamlandı. Bunun üzerine 1 mL DMPD⁺ çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorban değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.9.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi

Kapsaisinın Bipiridil reaktifi ile Fe^{2+} şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşları tarafından belirlenen metoda göre yapıldı (1999). Bu amaçla deney tüplerine 0,25 mL $FeSO_4$ çözeltisi (2 mM) aktarıldı. Bu çözeltinin üzerine 0,12 mL kapsaisin ve 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'lik ve %0,2'lik bipiridil çözeltisi 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 ile hazırlanan çözelti kullanıldı.

3.9.8. Total antioksidan aktivitesi

Kapsaisinın antioksidan aktivitesi tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Yen and Chen 1995). Bu amaçla daha önce hazırlanan kapsaisin stok çözeltisi kullanıldı. İstenilen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözelti vezin kaplarına otomatik pipetlerle aktarıldı ve toplam hacim tampon çözelti (0,01 M'lık pH: 7,4) ile 2,5 mL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak da 2,5 mL tampon çözelti ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu kullanıldı.

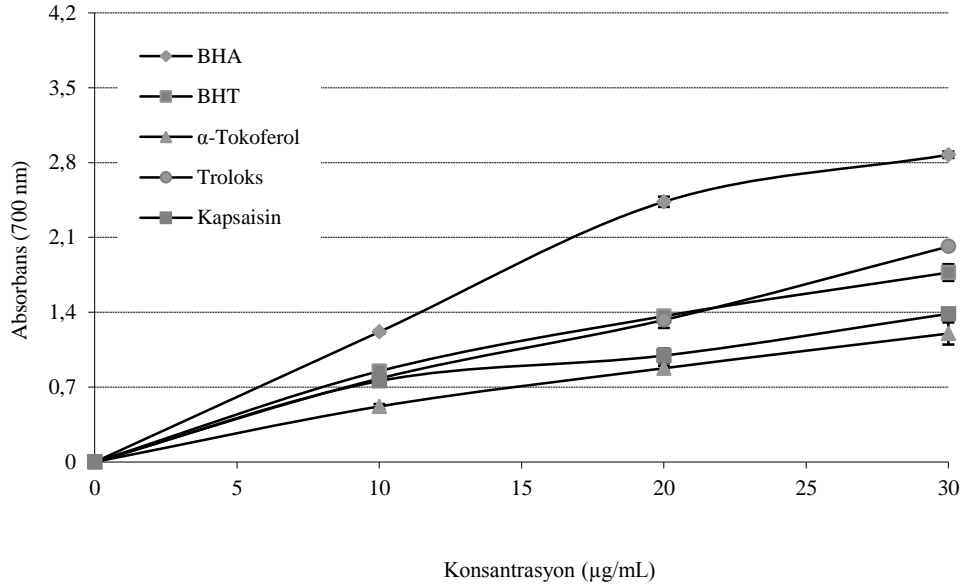
İnkübasyon $37^{\circ}C$ 'de ve karanlıkta gerçekleştirildi. Her 12 saatte bir vezin kaplarından 100'er μL alınarak 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine konuldu ve sırasıyla 100 μL Fe^{2+} çözeltisi ve 100 μL SCN^{-} çözeltisi ilave edildi. Kör numune ise 4,8 mL etanole 100 μL Fe^{2+} çözeltisi ve 100 μL SCN^{-} çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları köre karşı okundu. Kontrol maksimum absorbansa ulaşıktan sonra inkübasyon işlemine son verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.1.1. Fe³⁺ - Fe²⁺ indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006a). Çalışmada kullanılan kapsaisinin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.1). Kapsaisinin indirgeme kapasitesi konsantrasyonla doğru orantılı olup, artan konsantrasyon ile birlikte artmaktadır.

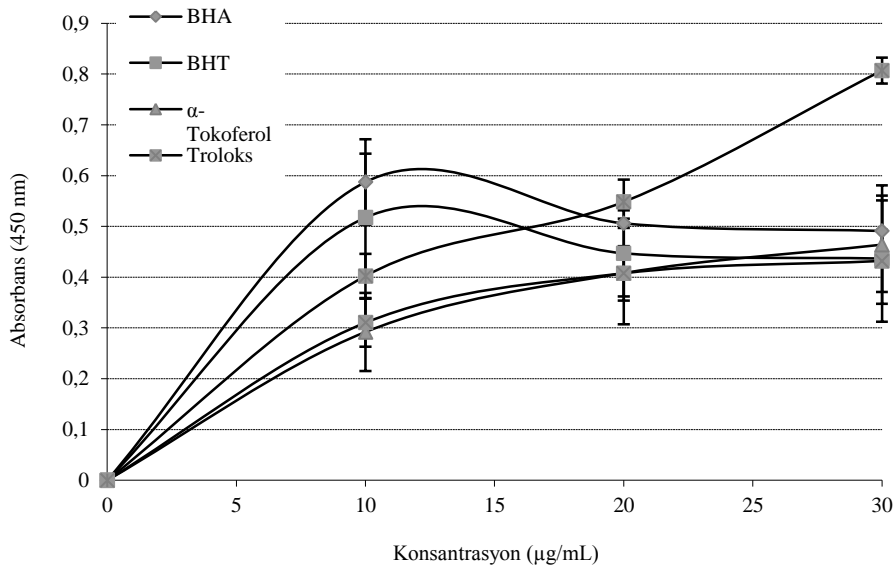


Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kapsaisinin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Kapsaisin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra her bir standart antioksidan ve kapsaisin için $10 \mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi. Bu konsantrasyonda kapsaisin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetleri birbirleriyle karşılaştırıldığında $BHA > BHT > \text{Troloks} > \text{Kapsaisin} > \alpha\text{-Tokoferol}$ şeklinde bir sıralama elde edildi. Ayrıca Çizelge 4.1'de gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

4.1.2. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları:

Kapsaisin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyonlardaki ($10\text{-}30 \mu\text{g/mL}$) çözeltilerinin 450 nm 'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Kapsaisin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesinin, konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi. Kapsaisin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme grafiği çizildikten sonra her bir standart antioksidan ve kapsaisin için $10 \mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.



Şekil 4.2. Kapsaisin farklı konsantrasyonlardaki ($10\text{-}30 \mu\text{g/mL}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

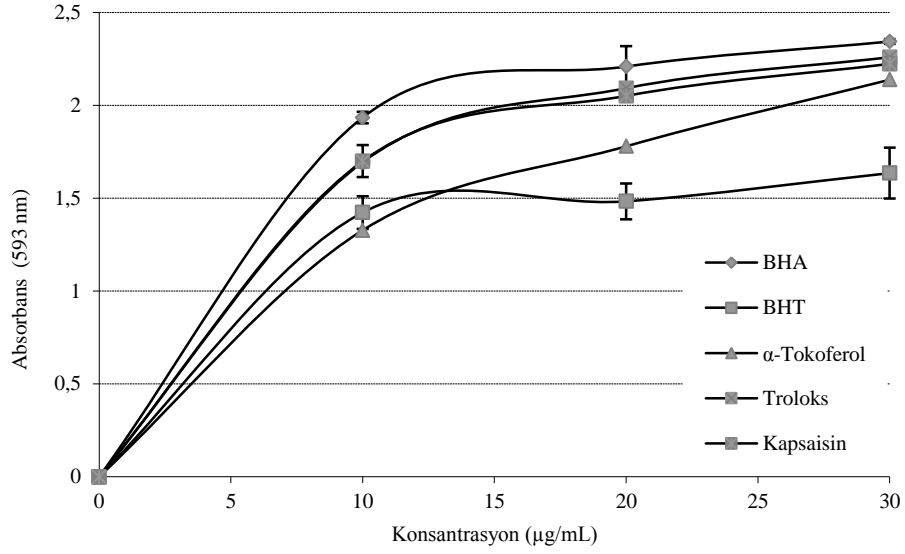
Bu konsantrasyonda kapsaisin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında: BHA > BHT > Kapsaisin > Troloks > α -Tokoferol şeklinde sıralanmaktadır.

Çizelge 4.1. 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda kapsaisinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılmaları

Antioksidanlar	Absorbans (700 nm)	Absorbans (450 nm)
BHA	1,217	0,587
BHT	0,849	0,517
α-Tokoferol	0,519	0,292
Troloks	0,780	0,310
Kapsaisin	0,757	0,402

4.1.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu, antioksidan bileşiklerin elektron kaybederek antioksidan aktivite gösterdiği bir metottur. 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 oluşturur. Bu mavi renkli kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans gösterir. Kapsaisinin FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesinin, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı belirlendi. Ayrıca kapsaisinin standart antioksidanlarla FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesi belirlenirken BHA>Kapsaisin>Troloks>BHT> α -Tokoferol şeklinde bir sıralama gözlemlendi.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki kapsaisinin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Kapsaisin ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2:0,999$).

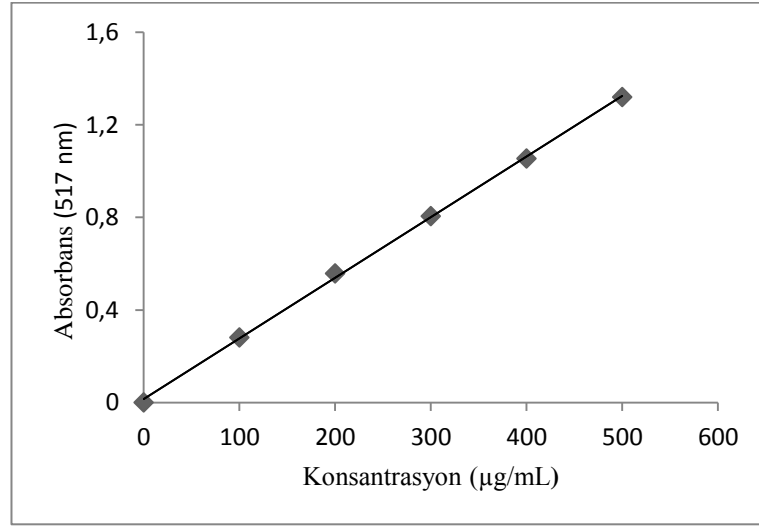
DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH serbest radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{517}) = 0,002 \times [\text{DPPH}]$$

DPPH serbest radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

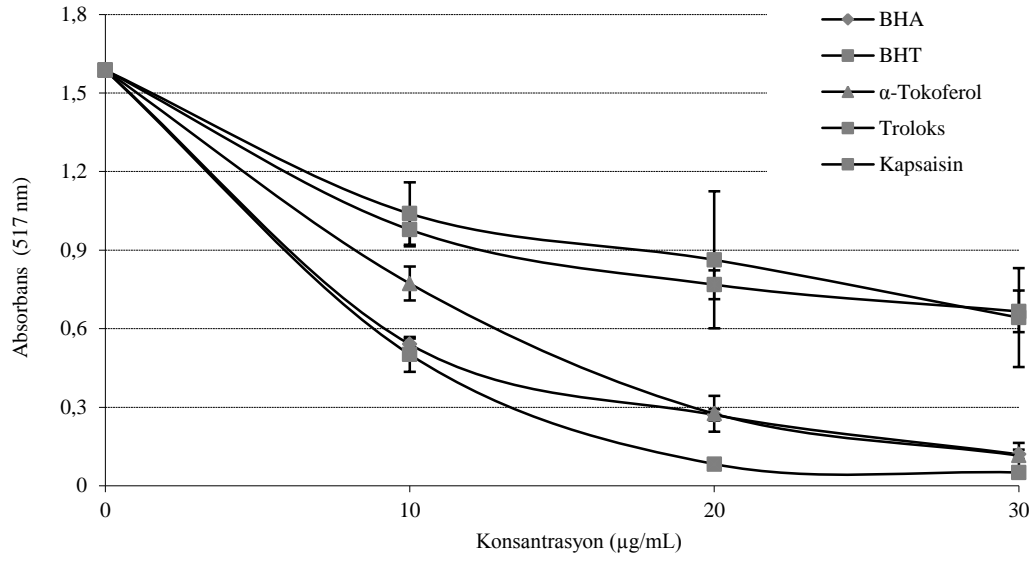
$$\text{DPPH} \cdot \text{giderme } (\%) = \left(1 - \frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$

Burada λ_{517-N} DPPH serbest radikal çözeltilisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, λ_{517-K} , ise sadece DPPH serbest radikal çözeltilisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı.



Şekil 4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Kapsaisin DPPH serbest radikali giderme aktivitesi Şekil 4.5’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



Şekil 4.5. Kapsaisin farklı konsantrasyonlardaki (10–30 µg/mL) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Kapsaisin DPPH serbest radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra her bir standart ve kapsaisin için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Kapsaisin çözeltilerinin DPPH \cdot , ABTS $^{+}$ ve DMPD $^{+}$ aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

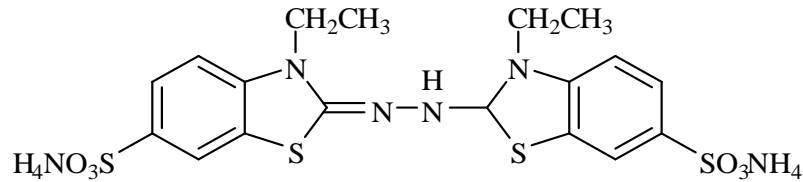
Antioksidanlar	DPPH \cdot Giderme	ABTS $^{+}$ Giderme	DMPD $^{+}$ Giderme
BHA	11,55	3,85	51,50
BHT	34,65	3,30	-*
α-Tokoferol	8,66	3,65	-*
Troloks	6,93	69,30	23,10
Kapsaisin	34,65	4,33	96,50

* DMPD $^{+}$ Giderme metodunda BHT ve α-tokoferol gibi hidrofobik özelliğe sahip standartlar net sonuç vermemektedir (Gülçin 2008)

Kapsaisin ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla Troloks>BHA> α -Tokoferol>Kapsaisin>BHT şeklinde DPPH serbest radikali giderme aktivitesi sergilediler.

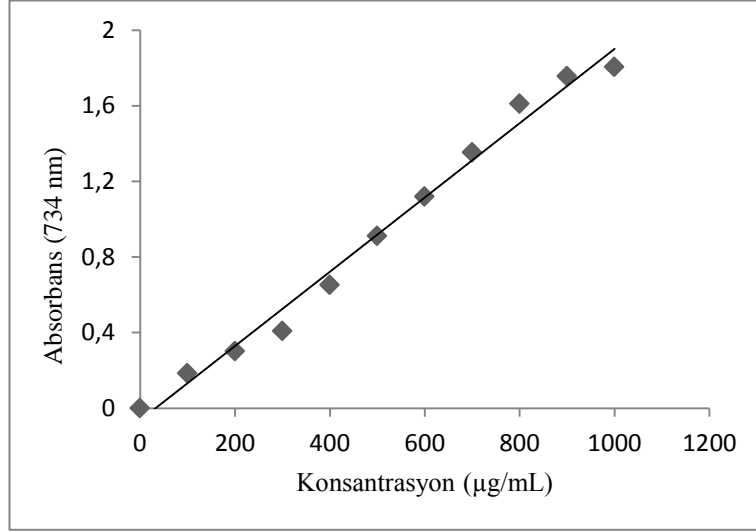
4.1.5. ABTS⁺ radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS⁺ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstraların veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996; Gülçin *et al.* 2007b). Bunun için öncelikle ABTS'den ABTS⁺'nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu ile 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 kaplanarak, 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 seyreltilti.



Şekil 4.6. ABTS'nin açık kimyasal yapısı

Bu aşamadan sonra kapsaisinle yapılan çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS⁺ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,988).



Şekil 4.7. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS⁺ için hazırlanan standart grafik

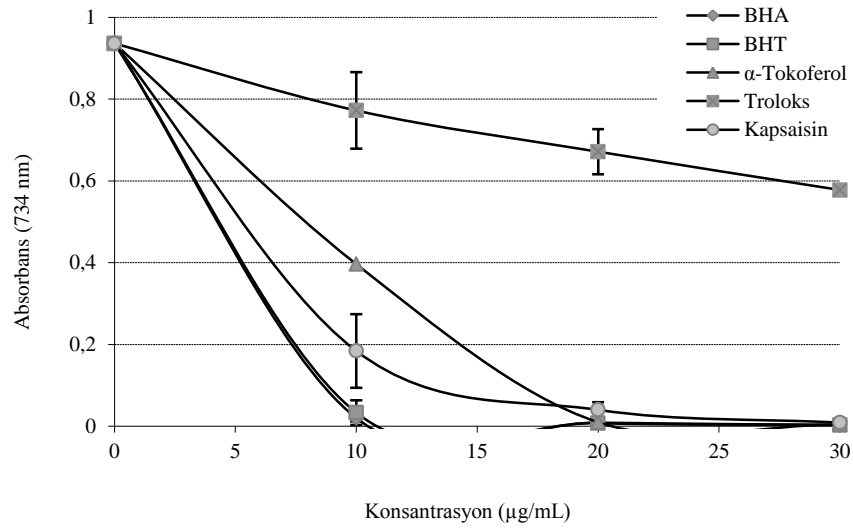
ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan ABTS⁺ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{734 \text{ nm}}) = 0.001 \times [\text{ABTS}^{*+}]$$

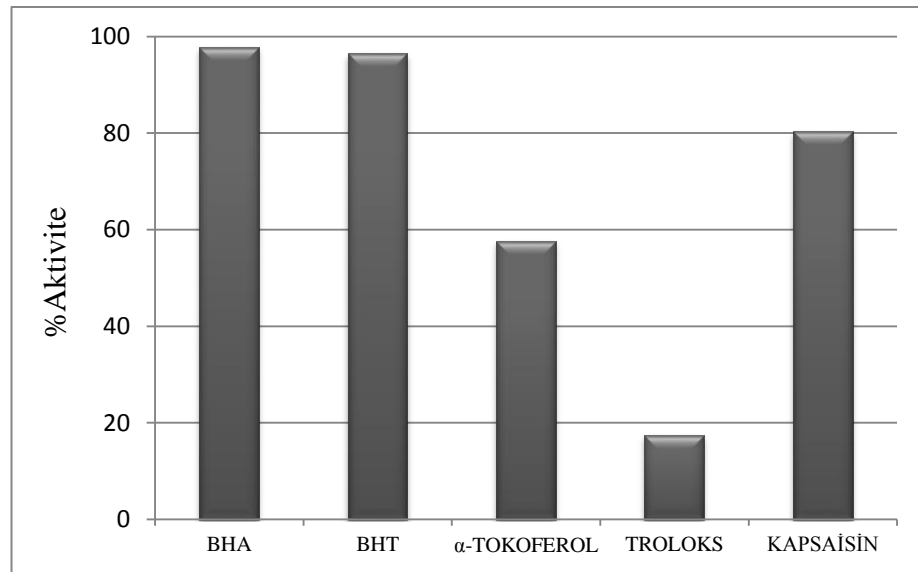
ABTS⁺ giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

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



Şekil 4.8. Farklı konantrasyonlardaki kapsaisin (10-30 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

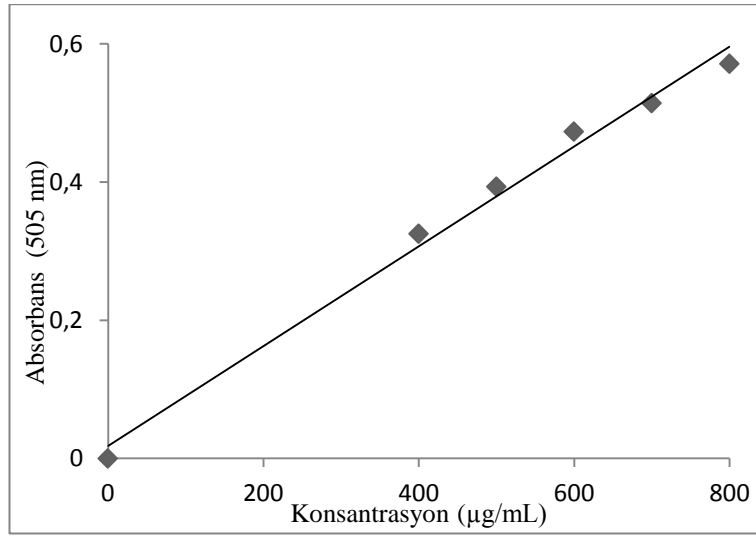


Şekil 4.9. Kapsaisin, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloksun 10 µg/mL konantrasyonunda ABTS⁺ giderme aktivite yüzdeleri

Kapsaisin ve kullanılan standart antioksidan moleküllerin ABTS⁺ giderme aktivitelerinin sırasıyla BHA>BHT>kapsaisin>α-tokoferol>troloks şeklinde olduğu gözlemlendi.

4.1.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan kapsaisin, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DMPD^{•+} giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (r^2 : 0,990).



Şekil 4.10. DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

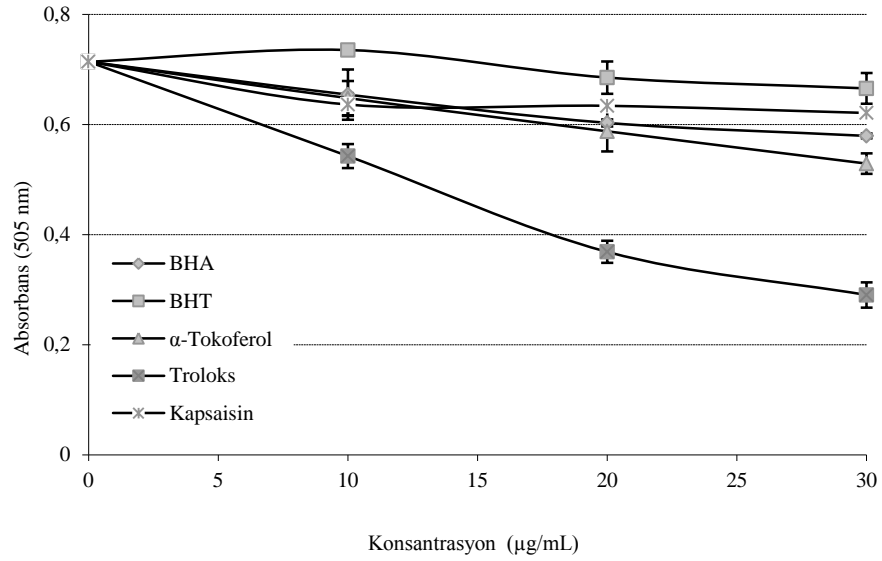
DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD^{•+} miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{505\text{nm}}) = 0.001 \times [\text{DMPD}^{\bullet+}]$$

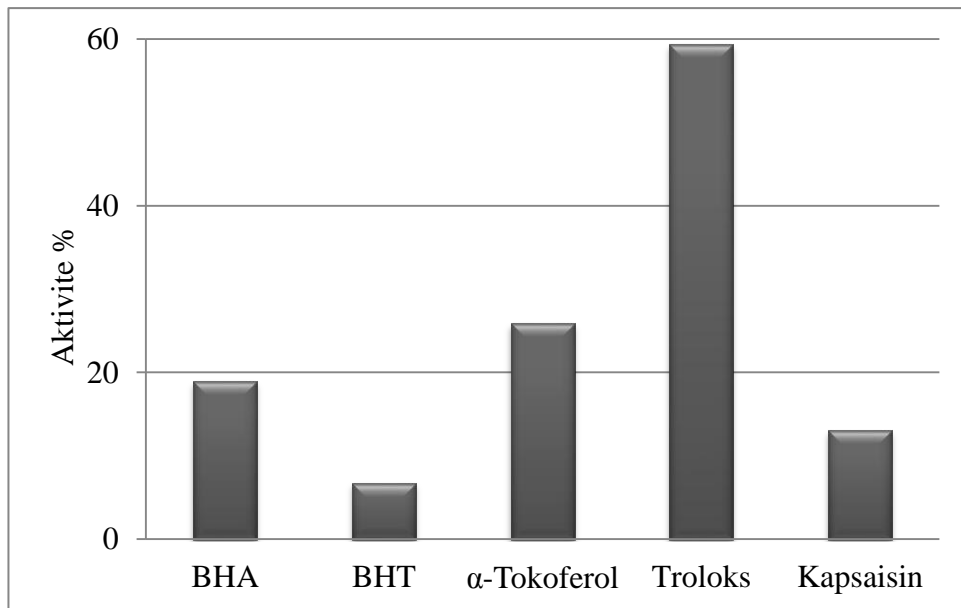
DMPD^{•+} miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

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

Burada λ_{505-N} , $DMPD^{+}$ çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, λ_{505-K} ise sadece $DMPD^{+}$ çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak α -tokoferol ve troloks kullanıldı.



Şekil 4.11. Kapsaisin'in $DMPD^{+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

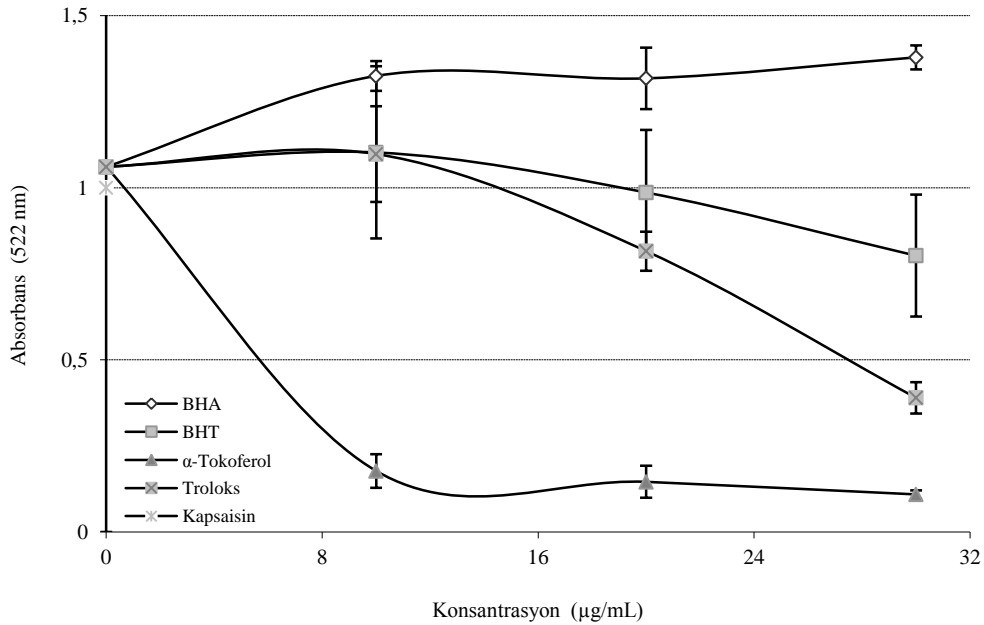


Şekil 4.12. Kapsaisin, BHA, BHT, α -tokoferol ve troloksun 30 µg/mL konsantrasyonunda $DMPD$ giderme aktivite yüzdeleri

Kapsaisin ve kullanılan standart antioksidan moleküllerin DMPD^{+} giderme aktivitelerinin Troloks> α -Tokoferol>BHA>Kapsaisin>BHT şeklinde olduğu gözlemlendi.

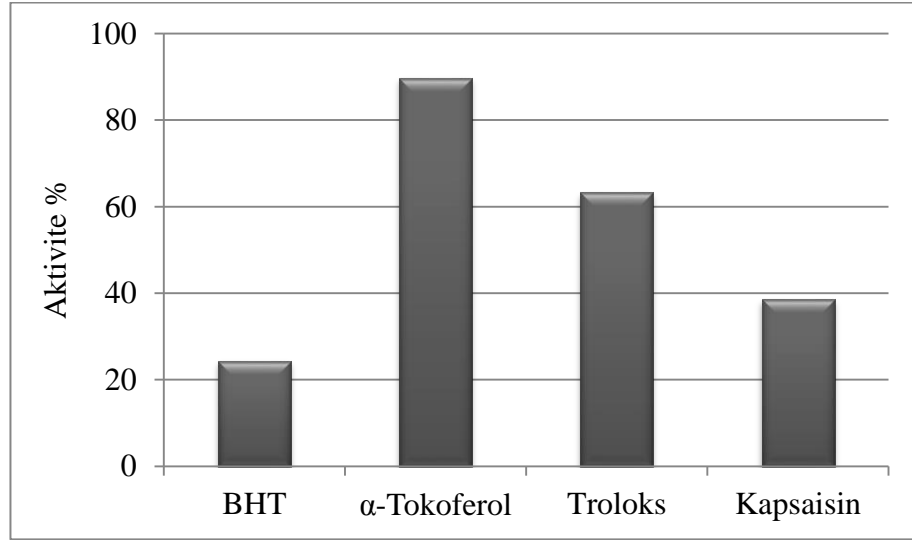
4.1.7. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulguları

Fe^{2+} şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı. 0,25 mL FeSO_4 çözeltisi (2 mM), 0,120 mL kapsaisin çözeltisi, 1 mL Tris-HCl tamponu (pH:7,4) 1,5 mL bipiridil çözeltisi (%0,2'lik 0,2M HCl içerisinde), 2,5 mL etanol ve 0,630 mL saf su içeren numunenin absorbansı 522 nm'de ölçüldü.



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kapsaisinın bipiridil metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Kapsaisin ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil reaktifi kullanılarak belirlendi. Bu tayinde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmedi. 30 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık gelen metal şelatlama yüzdeleri Şekil 4.14'de verildi.



Şekil 4.14. Kapsaisin, BHT, α-tokoferol ve troloksun IC₅₀ konsantrasyonunda bipiridil metal şelatlama aktivite yüzdeleri

Kapsaisin ve kullanılan standart antioksidan moleküllerin bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktiviteleri karşılaştırıldığında α-Tokoferol > Troloks > Kapsaisin > BHT > BHA şeklinde olduğu gözlemlendi.

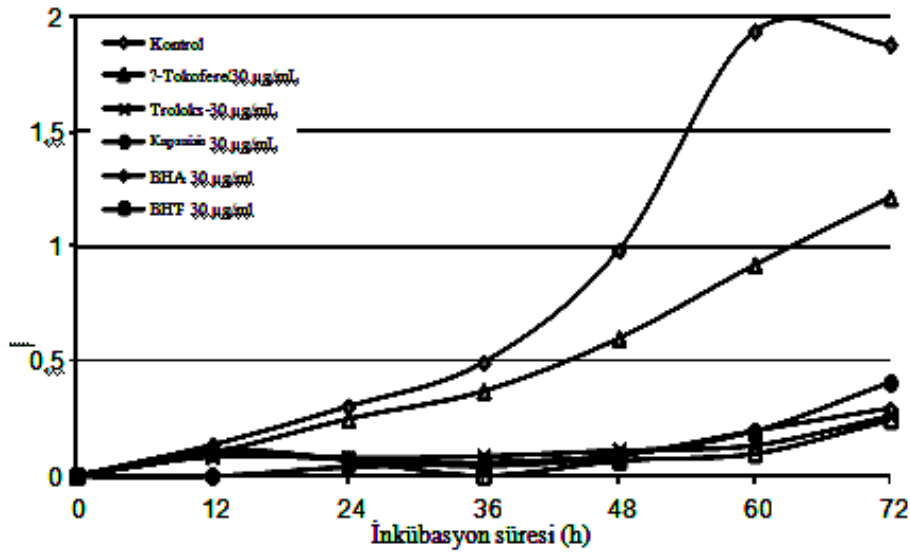
4.1.8. Total antioksidan aktivitesi bulguları

Kapsaisinin total antioksidan aktivitesi “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını (Fe²⁺) ferik iyonlarına (Fe³⁺) yükseltir. Daha sonra yükseltgenen ferik iyonları (Fe³⁺) tiosiyanat (SCN⁻) ile Fe(SCN)²⁺ kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks spektrofotometrik olarak 500 nm’de maksimum absorbans gösterir. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Total antioksidan aktivite kapsaisinin 30 µg/mL konsantrasyonundaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin 500 nm’deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Şekil 4.15’de de görüldüğü gibi antioksidan aktivite, kapsaisinin artan miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Kapsaisin ile standart antioksidan moleküllerin 500 nm’deki absorbansları aynı şekilde ölçülmüştür.

Kapsaisin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{500-N}}{\lambda_{500-K}}\right) \times 100$$

Burada λ_{500-N} numune veya standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değeri, λ_{500-K} ise linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değeri ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks standart antioksidan bileşikleri kullanıldı (Şekil 4.15).



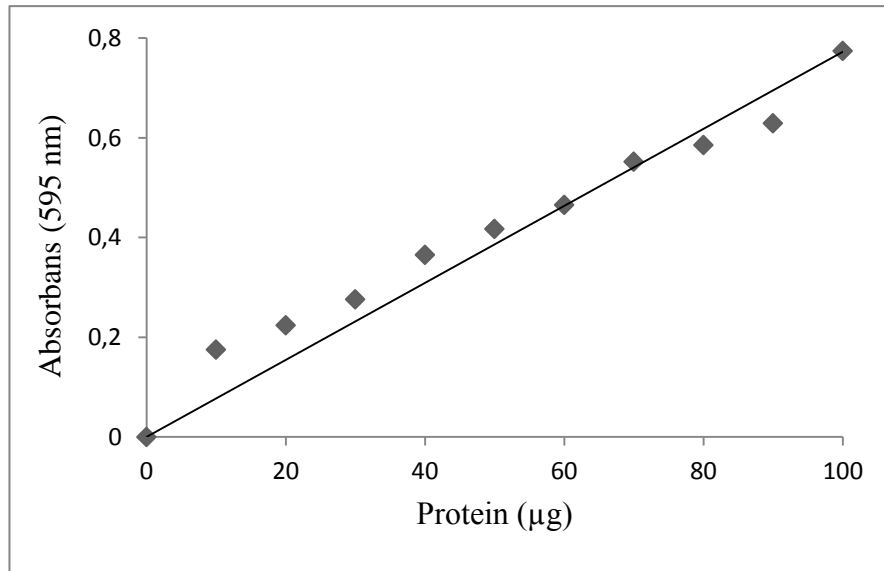
Şekil 4.15. Kapsaisin'in (30 µg/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı kapsaisin için %88,91 iken BHA için %88,9, BHT için %93,5, troloks için %90,3 ve α -tokoferol için %65,3 olarak bulunmuştur. Buna göre kapsaisin'in total antioksidan aktivite kapasitesi BHA ve α -tokoferolden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanından elde edilen hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.16'dan elde edilen denklemden hesaplandı ($r^2: 0,949$).

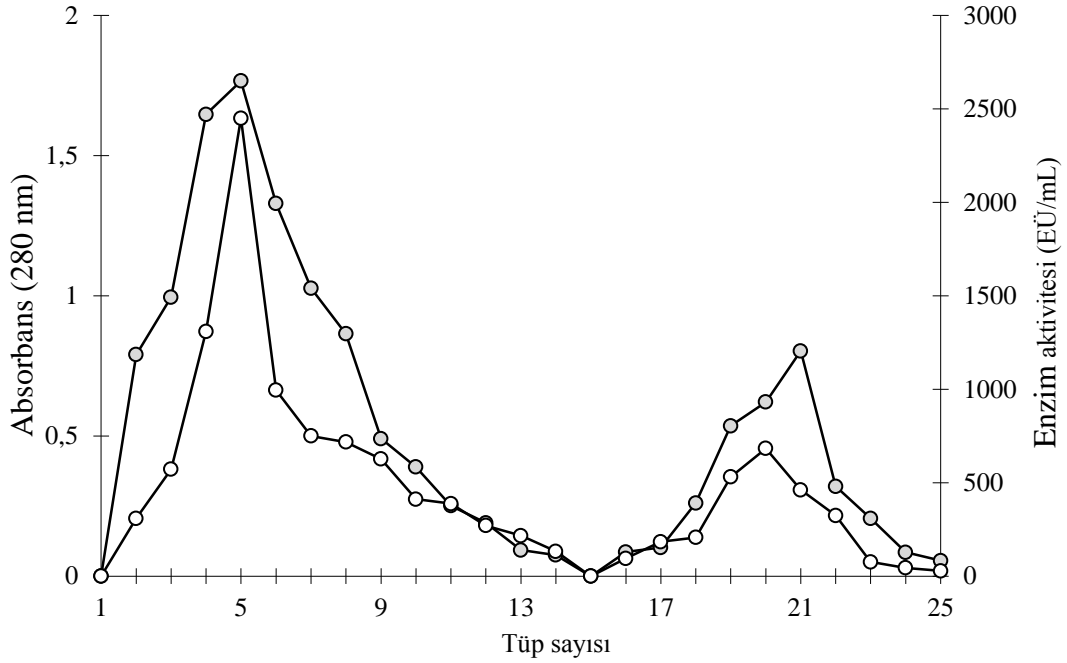


Şekil 4.16. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

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

İnsan eritrositlerinden hCA I ve II izoenzimleri ayrı ayrı saflaştırıldı. 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 alınarak 280 nm'deki absorbansları ölçüldü. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.17'de gösterildi.



Şekil 4.17. 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 absorbans grafiği

*(Kolon çapı 1,3 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL)

4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile 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 hemolizatın Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterildi.

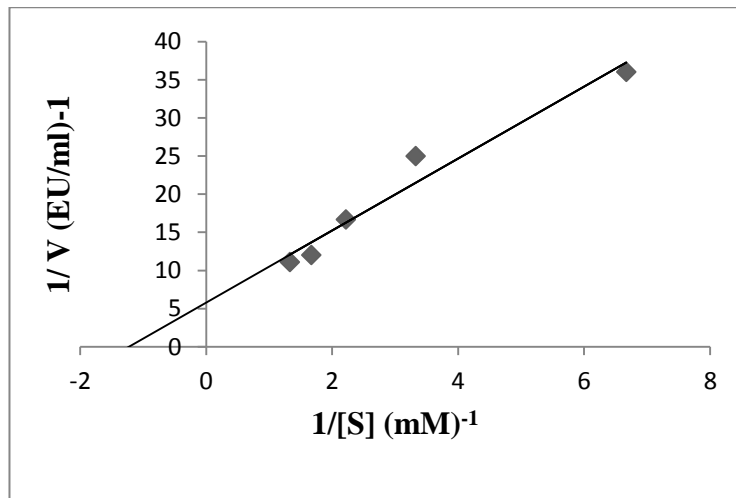
Çizelge 4.3. Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	554	26	36,23	941,98	14404	15,29	100	1
Sepharose-4B-L-Tirozin	CA I 1111	6	0,28	1,68	6666	3967,86	46,28	259,51
Sülfanilamid afinitelikolon kromatografisi	CA II 4000	3	0,16	0,48	12000	25000	83,31	1635,1

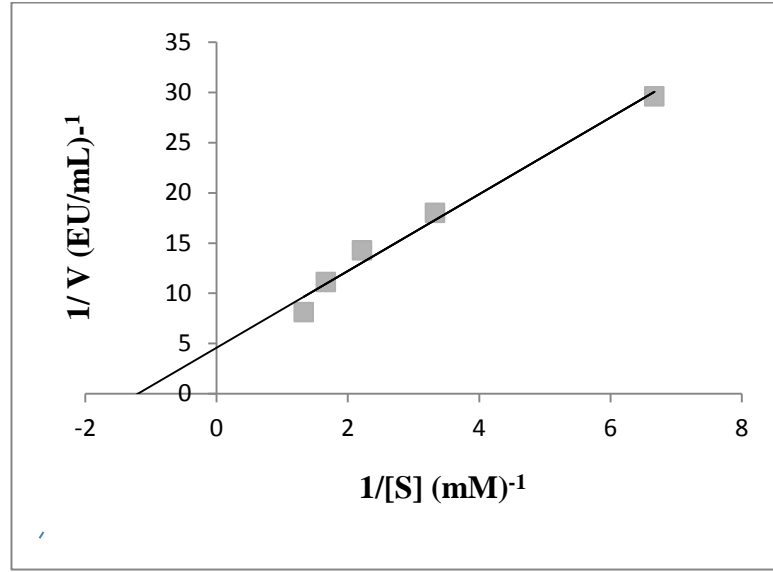
4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları

4.2.4.a. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışma sonuçları

İnsan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ve bu grafiklerden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

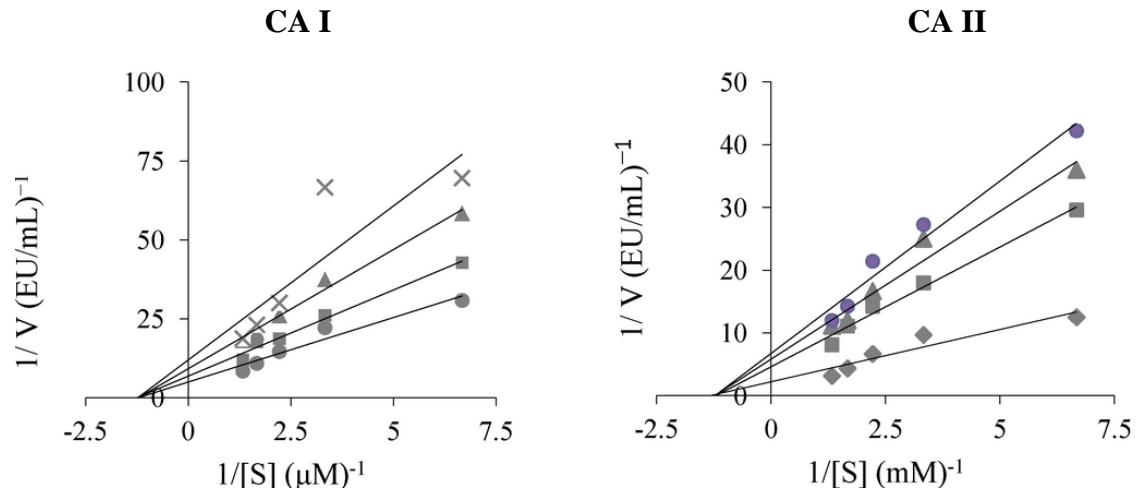


Şekil 4.18. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. 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.

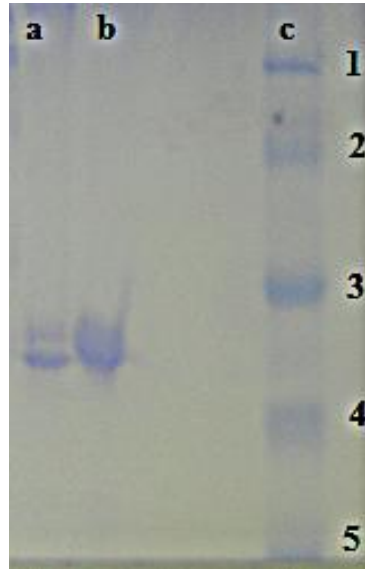


Şekil 4.20. hCA I VE hCA II izoenzimleri kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

hCA I izoenzimi için K_m 0,816 mM, V_{max} 0,173 ise EU/mL.dak. olarak hesaplandı. hCA II izoenzimi için K_m 0,832 mM, V_{max} 0,218 ise EU/mL.dak. olarak hesaplandı.

4.2.5. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezine insandan saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafları çekildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.21. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı

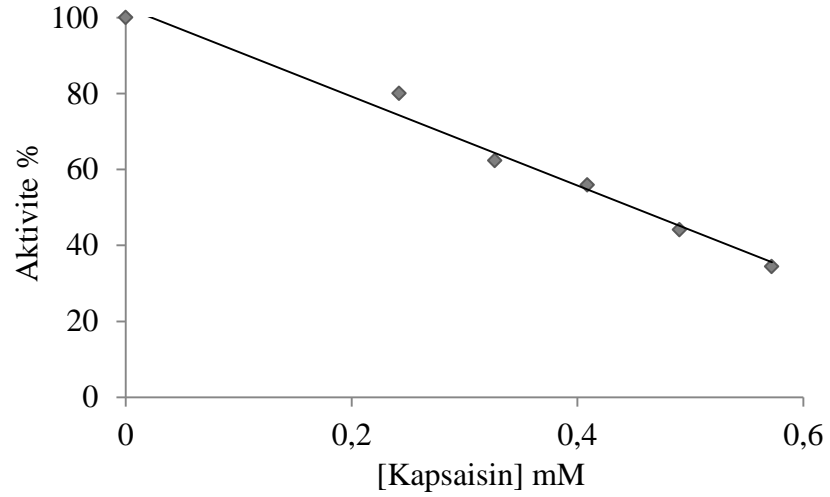
*[a: hCA II, b: hCA I, c: Standart proteinler (1: 116 kDa β -Galaktozidaz (*E. Coli*), 2: 97 kDa fosforilaz (tavşan kası), 3: 66 kDa Albumin (sığır), 4: 45 kDa Albumin (Ovalbumin), 5: 29 kDa karbonik anhidraz (sığır eritrositi)]

4.2.6. hCAI ve hCAII izoenzimleri aktiviteleri üzerine kapsaisin etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

4.2.6.a. hCAI izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren kapsaisin ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA I izoenzimi için kapsaisinin

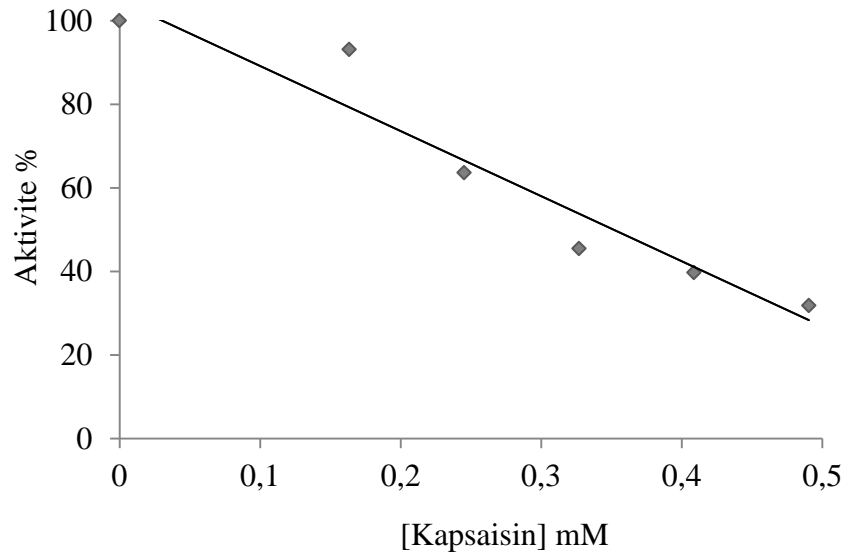
saflaştırılacak olan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir kapsaisin için Aktivite (%)-Kapsaisin grafiği çizildi. Çizilen grafiklerden her bir kapsaisin için K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.22. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği

4.2.6.b. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren kapsaisin ile ilgili sonuçları

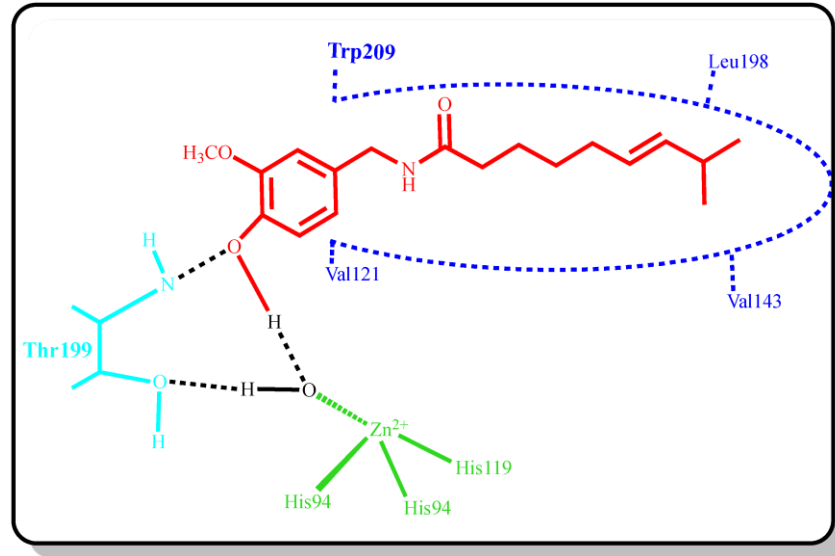
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA II izoenzimi için kapsaisin saflaştırılacak olan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir kapsaisin için Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği çizildi.



Şekil 4.23. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği

Çizelge 4.4. hCA I ve hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kapsaisinin K_i değerleri ve inhibisyon türü

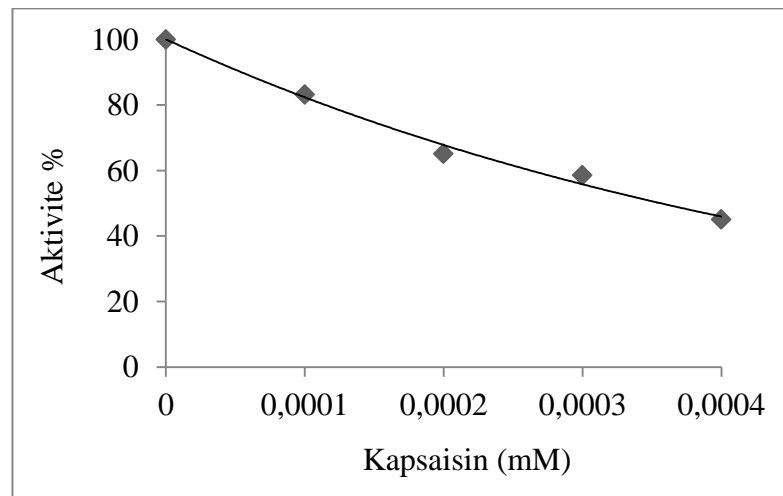
İnhibitör	IC_{50} (μM)	K_i değerleri (μM)	İnhibisyon türü
hCA I	428,04	696.15 ± 59.37	Yarışmasız
hCA II	316,01	208.37 ± 14.38	Yarışmasız



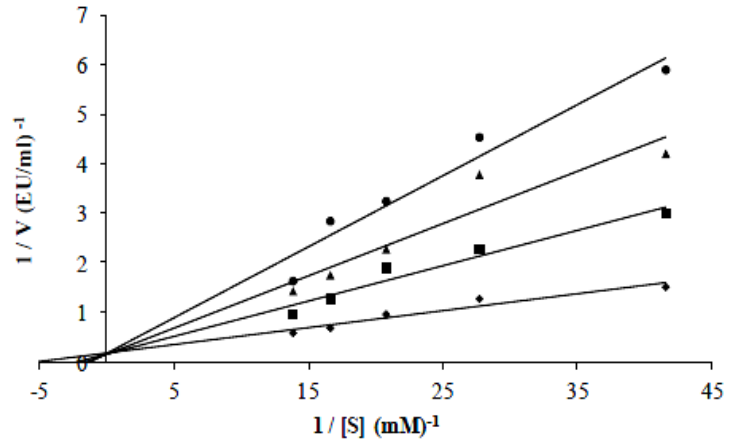
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna fenolik bir antioksidan olan kapsaisinin inhibitör olarak bağlanma modeli

4.3. Asetilkolin esteraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

Doygun substrat konsantrasyonunda AChE enzimi için kapsaisinin inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler AChE yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir kapsaisin için Aktivite (%)-[Kapsaisin] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.25. Asetilkolin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan kapsaisin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Kapsaisin] grafiği



Şekil 4.26. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.5. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Kapsaisin'in K_i değeri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC50 (μM)	Ki Ortalama (μM)	İnhibisyon Türü	R^2
Kapsaisin	0,356	0,083	Yarışmalı	0.988

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bilindiği gibi serbest radikaller, geçiş metal iyonları ve Fenton reaksiyonları yaşlanma sũrecinde önemli rol oynar. Ateroskleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi yaşa bağlı hastalıklar, serbest radikaller ve geçiş metal iyonlarının karbohidrat, lipid, protein ve nũkleik asitlerde oksidatif hasar oluşturması ile ilişkilidir.

Gũnũmũzde antioksidan özellik gũsteren gıda bileşenleri ve koruyucu tıbbi ũrnlere olan ilgi giderek artmaktadır. Bu sebeple antioksidanlar, gıda koruma teknolojisi ve çağdaş yaşamın önemli bir parçası haline gelmiştir. Antioksidan aktivitede, serbest radikallerin elektronlarını nũtralize edebilme ilkesi esastır. Bitkilerin antioksidan ve farmakolojik özellikleri, yapılarında bulunan fenolik bileşiklerle, bilhassa fenolik asit ve flavonoidler ile ilişkilidir.

Fenolik bileşikler, biyotik ve abiyotik stres koşullarına adaptasyonun sonucu olarak bitkiler tarafından sentezlenen önemli sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler insan vũcudunda ũretilemez ve gũnlũk diyetle alınmalıdır.

Bu çalışmada gıda bileşenlerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek için birçok biyoanalitik metot kullanılmıştır. Bu metodlar, reaksiyon mekanizmaları, diğer oksidanlar ve hedef tũrler, reaksiyon koşulları ve sonuçların sunum şekli açısından farklılık gũsterebilir. *In vitro* ortamlarda yapılan analitik deneylerde oksidasyon kaynakları, diğer oksidan tũrler ve biyolojik hedefler ile etkileşimleri, konsantrasyonlar ve onların oksidatif stres için önemi gibi bazı bilgiler önceden belirlenmelidir.

Biber meyvesi, sebze ve baharat olarak kullanılan önemli bir C ve E vitamini kaynağıdır. Bunun yanı sıra içerdiği provitamin A ve karotenoidlerle antioksidan özellik gũsterir. Yapısındaki zengin kapsaisinoid alkaloidleri biberlere farmakolojik özellik kazandırmaktadır. Fakat biberlerde bulunan fenolik bileşikler eksik tanımlanmıştır. Sukrasno ve Yeoman, tarafından biber meyvesinde sinamik asit ve flavonoid

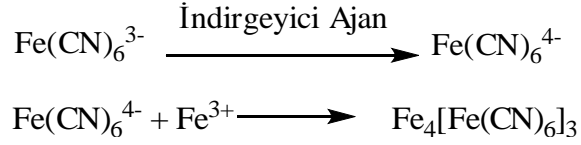
türevlerinde varlığı kanıtlanmıştır (Cheung *et al.* 2012; Gülçin 2012; Zhuang *et al.* 2012).

Antioksidan özelliklerin belirlenmesi için en ideal metod; reaksiyon koşulları taklit edilerek, *in vivo* şartlarda ROS ve RNS tarafından oksidatif stres uyarıldığında, gıda bileşenlerinin antioksidan etkisinin belirlenmesidir. Biyoaktif bileşikler veya gıda bileşenlerinin indirgeme gücünü elektron verme kapasitesi ve antioksidan aktivitesi yansıtır (Köksal and Gülçin 2008).

Çalışmamızda bir fenolik bileşik olan kapsaisin, antioksidan kapasitesi ile hCA I ve II izoenzimleri üzerine etkisi araştırıldı. Bu kapsamda kapsaisin antioksidan, antiradikal, indirgeme kapasitesi ve metal şelatlama özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesi, bipiridil reaktifi kullanarak ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS⁺ giderme aktivitesi, DMPD⁺ giderme aktivitesi ile riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi, tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini gibi farklı biyoanalitik metotlar kullanıldı.

Antioksidan ve antiradikal yöntemlerle elde edilen sonuçlar, BHA, BHT, α -tokoferol ve α -tokoferolün suda çözünen bir analogu olan troloks gibi gıda ve farmokoloji endüstrisinde yaygın olarak kullanılan standartlarla karşılaştırılarak değerlendirildi.

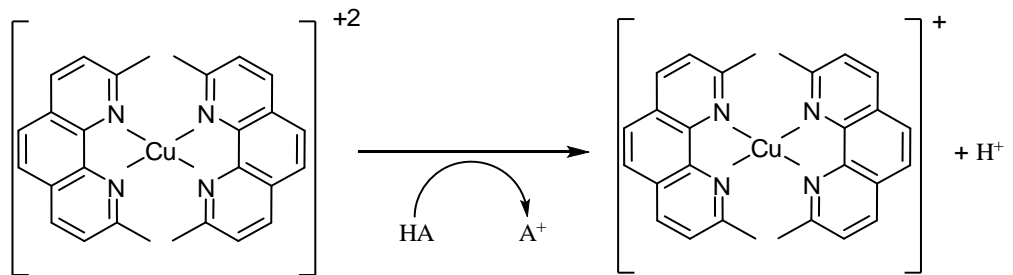
İndirgeme kapasitesi bir biyoaktif bileşiğin doğrudan $Fe[(CN)_6]^{3+}$ ü $Fe[(CN)_6]^{2+}$ 'e indirgemesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} 'in ilavesi, güçlü Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $Fe_4[Fe(CN)_6]$ oluşumuna yol açar ve oluşan kompleks 700 nm'de maksimum absorbands gösterir. 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 absorbans ölçüm sonuçlarına dayanarak capsaisinın ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak; BHA > BHT > Troloks > Kapsaisin > α -Tokoferol şeklinde bir sıralama elde edilmiştir.

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.

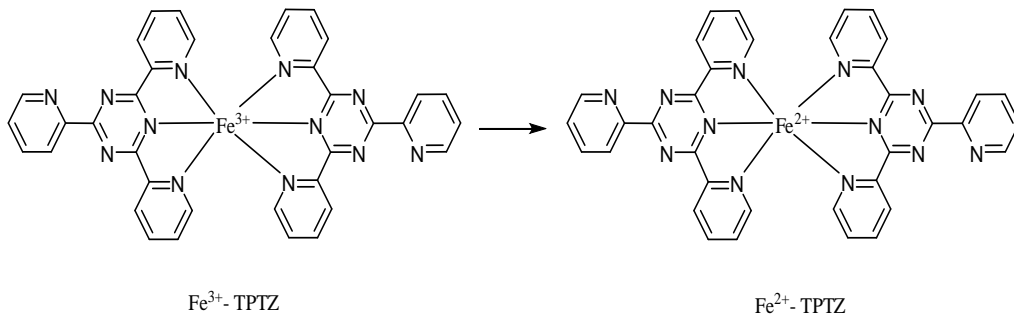
Apak vd tarafından geliştirilen kuprak metodu, indirgeme kapasitesini belirlemek için geliştirilen bir yöntemdir (2006). Bu methoda, CuCl_2 ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Kullanılan neokuprin, heterosiklik bir organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır. Kuprak metodu, antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi esasına dayanır. Neokuprinin varlığında Cu^{2+} , Cu^+ 'e indirgenir. Oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorbans verir.



Şekil 5.1. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu

Bu yöntem, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve seçicidir. İndirgeyici maddenin türü ve hidrofilitliği 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).

İndirgeme kapasitesini belirlemek amacıyla kullanılan diğer bir metod, FRAP metodudur. FRAP yöntemi kolay standardize edilebilen, basit, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemin dezavantajı, glutasyon gibi bazı antioksidanlarla çok yavaş reaksiyona girmesidir. Ancak bitkilerde bulunan glutasyonlar, güçlü antioksidan aktivitelerine rağmen, iyi absorbe edilemedikleri için, meyve ve sebzelerde antioksidan aktivite tayininde FRAP metodu geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu metodun esası; oksidan olarak kullanılan Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin düşük Ph'da renkli formdaki Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesidir. Oluşan renkli kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Bu demir kompleksinin redoks potansiyeli 0.70 V'tur. Bu değer $ABTS^{+}$ 'nin redoks potansiyeline (0.68 V) yakındır. $ABTS^{+}$ ve FRAP metodu arasındaki tek fark, FRAP'ın daha asidik bir ortamda (pH:3.6) gerçekleşiyor olmasıdır (Benzie and Strain 1996; Guo *et al.* 2003; Huang *et al.* 2005).



Şekil 5.2. Ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenme reaksiyonu

İndirgeme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan her üç indirgeme metodu arasında bir ilişki olduğu belirlendi. Bu metodlarda kapsaisin, artan konsantrasyona bağlı olarak indirgeme kapasitelerinde de artış gözlemlendi.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan Kapsaisin'in 20 µg/mL konsantrasyonunda ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ve kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi

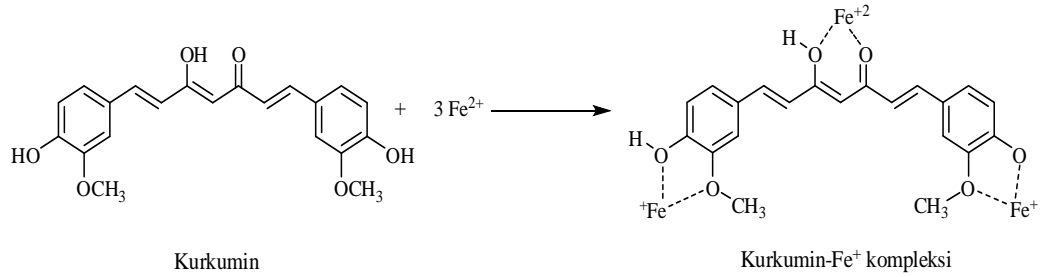
Antioksidanlar	Fe³⁺ indirgeme (700 nm)	Cu²⁺ indirgeme (450 nm)	FRAP metodu (593 nm)
BHA	2,433	0,506	2,209
BHT	1,364	0,447	1,483
α-Tokoferol	0,876	0,408	1,779
Troloks	1,328	0,408	2,092
Kapsaisin	0,995	0,548	2,051

Demir, normal fizyolojik proseslerde bulunması gerekli bir mineral iken fazlası hücrel hasarlara yol açabilir. Yapılan biyokimyasal çalışmalarda vücutta demir düzeyi arttıkça kanser, vasküler ve nörolojik hastalıklar gibi farklı hastalıklar için risk faktörü artmaktadır. Demir, tüm canlı hücreler için gerekli bir elementtir. Hem grubu içeren proteinlerin önemli bir bileşenidir. Ferröz iyonu (Fe²⁺) gibi elementel türler, canlı sistemlerde ROS üretimini kolaylaştırabilir.

Demir ve bakır gibi geçiş metalleri, oksidatif hasarı hızlandırarak antioksidan aktivite için önem kazanırlar. Demir ve bakır iyonları *in vivo* şartlarda reaktivitesi az olan bileşikleri kısa sürede daha reaktif hale getirebilir. Bu sebeple organizmada taşıyıcı protein ve depo proteinlerine bağlı halde ve inert şekilde bulunurlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını sitümüle etmeyen bir formda olup, seruloplazmin proteinine bağlı haldedir. Ayrıca seruloplazmin proteini, Fenton reaksiyonlarında ferröz iyonlarını (Fe²⁺) ferrik iyonlarına (Fe³⁺) yükseltgeyerek meydana gelen OH[·] oluşumunu inhibe eder. Bu şekilde ekstrasellüler antioksidan savunmaya katkı sağlar. Demir ise yüksek reaktivitesinden dolayı geçiş metalleri arasında en önemli lipid oksitleyici olarak bilinmektedir. (Gutteridge *et al.* 1980; Halliwell 1994; Onat vd 2002; Gülçin 2012). Demir, doğada ferröz iyonları (Fe²⁺) veya ferrik iyonları (Fe³⁺) şeklinde bulunmaktadır. Gıdalarda ferrik iyonları (Fe³⁺) formu daha baskındır.

Vücuttaki demirin 2/3'si hemoglobinde, az bir kısmı miyoglobinde, çeşitli enzimlerde, demir taşıyıcı protein transferrinde ve kalan kısmı da ferritinde bulunur. Ferritin dokulardaki demiri bağlayıp depolar. Demir iyonları, transferrin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{3+}) şeklinde demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları (Fe^{2+}) şeklinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Transferrine spesifik olarak bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar ve böylece metabolizma için zararsız halde kalırlar. Ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi, ferröz iyonları (Fe^{2+}) konsantrasyonunu en aza indirerek oksidatif hasara neden olan serbest radikal oluşumunu ve moleküler hasarı inhibe etmektedir. Metal şelatlama aktivitesi, metallerin katalizlediği oksidasyonu geciktirmesi ile önemli bir antioksidan özelliktir. Ayrıca şelatlama aktivitesi, ferrozinden daha yüksek bir afinite ile demir bağlama kapasitesi gerektirir (Halliwell and Gutteridge 1990; Gülçin 2007; Gülçin 2012).

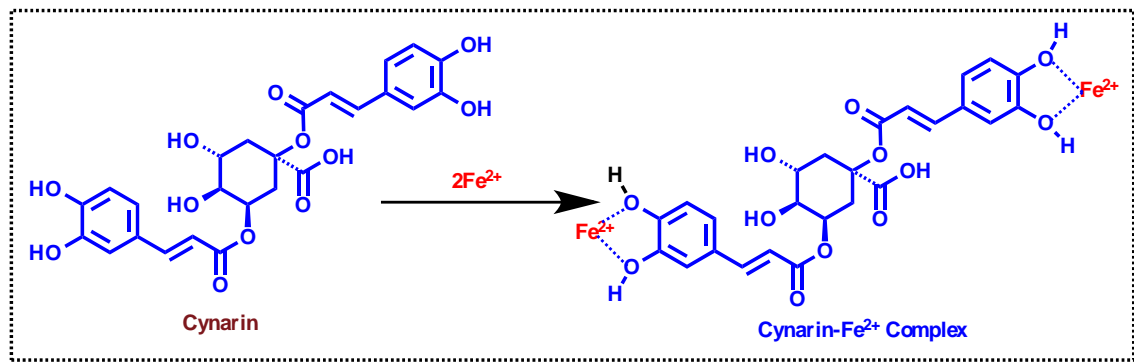
Bir peroksidasyon inhibitöründe bulunması gereken temel özellik; demir bağlama kapasitesidir. Yani demir iyonlarını ferrozinden daha yüksek bir afinite ile bağlayabilmelidir. Örneğin; metal şelatlama aktivitesine sahip bir molekül olan kurkumin, aynı zamanda çok önemli bir gıda maddesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda kurkuminin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmiştir. Kurkumin serbest oksijen radikallerinin bir temizleyicisi olarak antioksidan etkisi göstermektedir. Ayrıca antioksidan enzimlerin aktivitelerini koruyarak lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Kurkumin molekülü yapısındaki her iki aromatik halkaya bağlı metoksi grupları ile hidroksil fonksiyonel grupları arasında ikişer adet ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlayabildiği gibi hidrokarbon zincirindeki enol ve keto grupları ile bir adet ferröz iyonunu (Fe^{2+}) şelatlaması da yüksek ihtimaldir.



Şekil 5.3. Kurkumin molekülünün metal şelatlama mekanizması

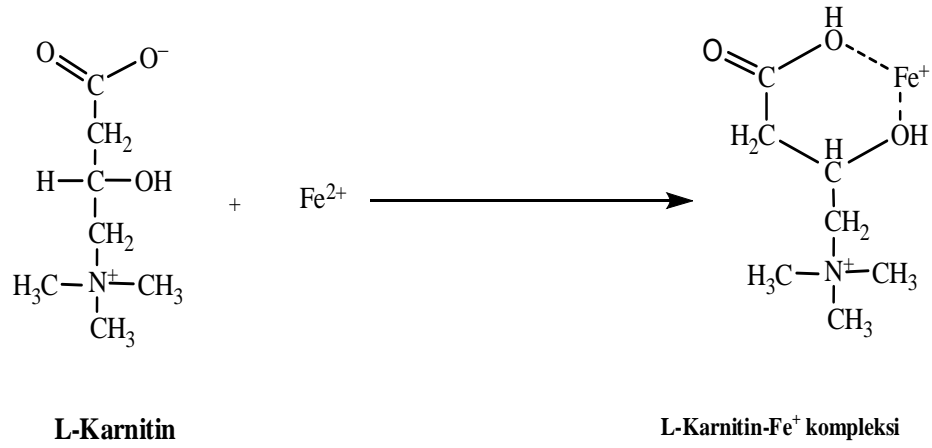
Kazazica ve arkadaşları, bir flavonoit olan kamferolün fonksiyonel karbonil grupları tarafından kuprik (Cu^{2+}) ve ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatladığını bildirmiştir (2006). Böylece $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_3$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$ ve $-\text{O}-$ fonksiyonel gruplarından iki veya daha fazlasını yapısında uygun konumlarda içeren bileşikler metal şelatlama aktivitesi gösterir (Toda *et al.* 1985; Reddy and Lokesh 1994b; Das and Das 2002; Gülçin 2012).

Benzer şekilde metal şelatlama kapasitesinin Cynarin molekülünde de olduğu gözlenmiştir. Doğal bir bileşik olan Cynarin molekülünün kurkumin molekülüne benzer bir şekilde iki ferröz iyonunu (Fe^{2+}) şelatladığını bildirmiştir (Topal *et al.*, 2015). Tek fark kurkumin aromatik halkaya bağlı hidroksi ($-\text{OH}$) ve metoksi ($-\text{OCH}_3$) grupları üzerinden ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlarırken, Cynarin molekülü her iki ferröz iyonunu (Fe^{2+}) aromatik halkalara bağlı her iki hidroksi ($-\text{OH}$) gurubu üzerinden şelatlama yaptığı tahmin edilmektedir (Topal *et al.* 2015).



Şekil 5.4. Cynarin molekülünün Fe²⁺ iyonlarını şelatlama mekanizması

Gülçin (2006b) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise L-karnitin fonksiyonel karbonil ve hidroksil grupları üzerinden ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatladığı gözlenmiştir. L-karnitin kurkumin molekülü gibi fonksiyonel grupları ile ferröz iyonlarını sınırlandırmıştır (Ak and Gülçin 2008). Şekil 5.6'da görüldüğü gibi bir L-karnitin molekülünün karboksil grubu ile yine aynı L-karnitin molekülünün γ -karbonuna bağlı hidroksil grubu arasında bir metal köprüsü oluşur ve bir ferröz iyonu (Fe^{2+}) şelatlanır. Böylece kurkumin molekülü de stabilize edilmektedir. Altılı halkaların oluşumu molekülü daha stabil hale getirmektedir.



Şekil 5.5. L-Karnitinin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama mekanizması

Çalışma kapsamında kullandığımız kapsaisinın bipyridil reaktifi kullanılarak ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi belirlendi ve sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans değerleri, metal iyonlarının bipyridil bağlanmadan önce şelatlandığını gösterir.

Çizelge 5.2. Çalışmada kullanılan kapsaisinin IC50 konsantrasyonunda bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulgularının birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	Metal şelatlama aktivitesi (%)
BHA	0,033
BHT	24,31
α-Tokoferol	89,72
Troloks	63,24
Kapsaisin	38,54

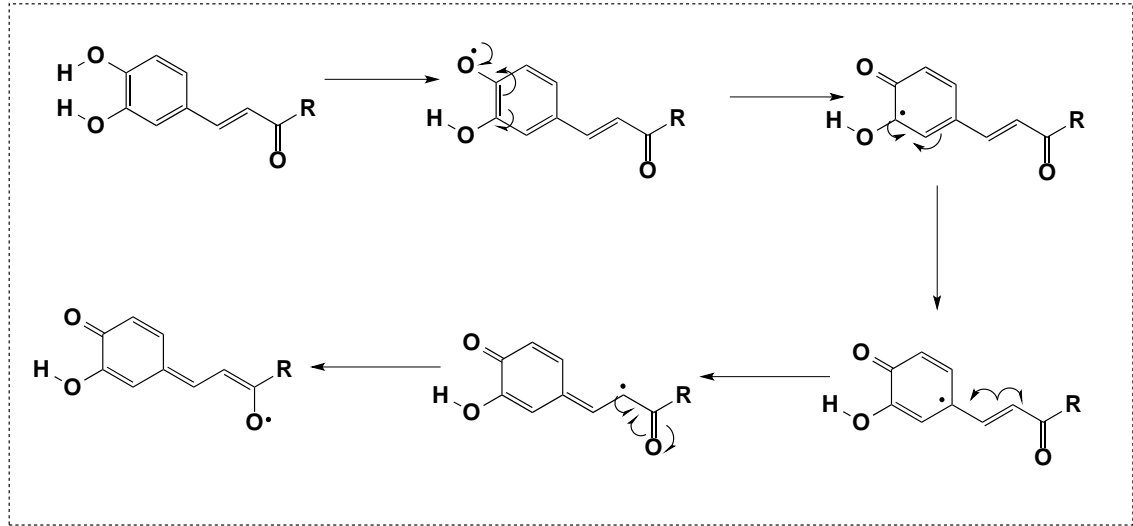
Kapsaisinin bipiridil metal şelatlama aktivitesi standart antioksidanlarla kıyaslandığında kapsaisinin artan konsantrasyonla birlikte şelatlamamanın arttığı ve α -Tokoferol>Troloks >BHT>Kapsaisin>BHA şeklinde bir sıralama olduğu gözlenmiştir.

Antioksidan aktivite tayininde indirgeme ve şelatlama aktivitelerinin yanı sıra radikal giderme kapasitesinin belirlenmesi de antioksidan bileşikler için oldukça önemlidir. Radikal giderme aktivitesi serbest radikallerin gıdalar ve biyolojik sistemlere verdiği hasarların önlenmesi açısından da oldukça büyük önem taşımaktadır. Radikal gidericilerin en belirgin etkileri, lipid peroksidasyonunu inhibe etmeleridir. Ayrıca radikal gidericiler peroksit radikalleri ile doğrudan etkileşerek peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırırlar ve gıdaların kalitesini ve güvenilirliğini artırır (Gülçin 2012).

DPPH \cdot , ABTS $^{+}$, DMPD $^{+}$ ve O $_2^{\cdot -}$ radikal giderme metotları antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik yöntemlerdir. Bu metotlarda kromojenik bileşikler ve radikal bileşiklerin her ikisinde antioksidanlarla doğrudan reaksiyona girebilirler. Ayrıca DPPH \cdot ve ABTS $^{+}$ radikal giderme metotları basit, hızlı, hassas ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Özçelik *et al.* 2003; Gülçin 2012). Bu radikal çözeltilerine bir antioksidan madde ilave

edildiğinde reaktif türlerin indirgenmesi ile bir renksizleşme meydana gelir. Çözeltide bulunan antioksidan DPPH· radikali, ABTS⁺ ve DMPD⁺ katyonlarının oluşumunu tersine çevirir. Yüksek hassasiyeti olan bu kromojenler kullanılarak birden fazla numunenin antioksidan aktivitesi belirlenebilir (Köksal *et al.* 2009).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada fenolik halkaya ve bunun dışında alifatik grupta konjuge çift bağlara sahip olan ve bir hidroksi sinamik asit türevi olan Cynarin molekülünün radikal giderirken meydana gelen ara ürünler gösterilmiştir (Topal *et al.* 2015).

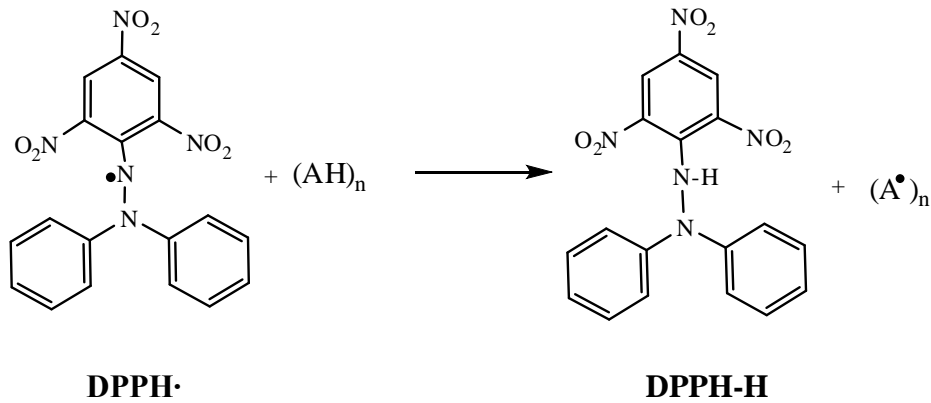


Şekil 5.6. Cynarin molekülünün radikal giderme mekanizması ve ara ürün oluşumu

DPPH· radikali giderme metodu, ilk kez 1950 yılında doğal ürünlerdeki hidrojen donörlerini bulmak için önerilmiş en eski metodlardan biridir. Daha sonra fenolik bileşikler ve gıdalardaki antioksidan miktarını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Aynı zamanda bir elektron transfer yöntemidir. Basit ve hızlı olan bu yöntem doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. DPPH radikali, canlı organizmalardaki radikallerin tersine kararlı, uzun ömürlü bir azot radikalidir. Kısa ömürlü peroksil radikalleri ile hızlı reaksiyon veren çoğu antioksidan, DPPH radikali ile yavaş reaksiyona girebilir veya sterik engel nedeniyle DPPH radikaline karşı inert olabilir. Küçük moleküller radikale daha kolay ulaşabildikleri için daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler. DPPH

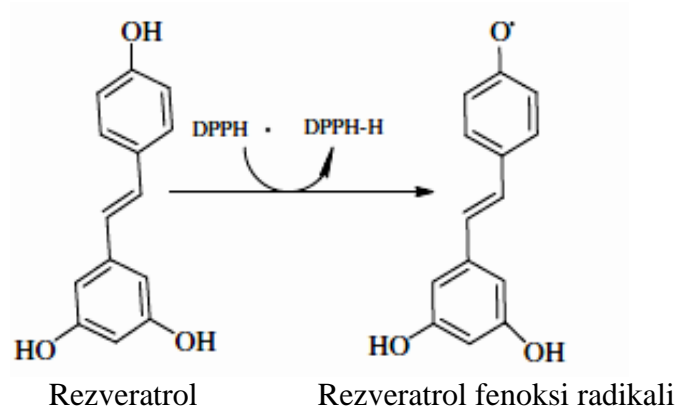
radikali organik ortamda özellikle alkol ortamında çözünür, sulu ortamda çözünmez. Bu durum hidrofilik antioksidanlar için önemli bir sınırlamadır (Gülçin 2012; Büyüktuncel 2013).

DPPH· radikali giderme metodu; koyu menekşe renkli DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından redoks reaksiyonu ile giderilmesi esasına dayanır. Antioksidanlar DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine (DPPH-H) indirger. Metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve azalan absorbans değerleri 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. İndirgenen DPPH radikali antioksidan veya antiradikal [(AH)_n] türlerin varlığında DPPH-H formuna dönüşür. DPPH çözeltisinde daha fazla renk açılması ve reaksiyon karışımının absorbans değerlerinin giderek azalması artan radikal giderme kapasitesini gösterir (Gülçin 2002; Büyüktuncel 2013).



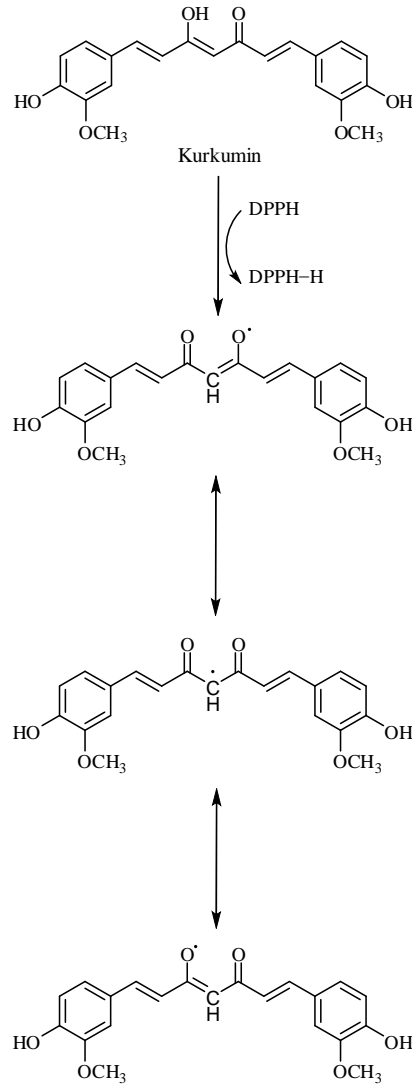
Şekil 5.7. Bir antioksidan [(AH)_n] tarafından DPPH serbest radikalinin giderilmesi

Yapılan çalışmalarla gıda bileşenlerinin güçlü DPPH radikal giderme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bunların başında üzüm meyvesinin etken maddesi olan rezveratrol gelir. Gülçin tarafından yapılan çalışma ile rezveratrolün belirgin bir radikal giderme aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır (2010). Monofenol ve difenol olmak üzere iki fenolik halka içeren rezveratrol molekülünde monofenolik hidroksil grup, kolaylıkla hidrojen atomunu bağlayabilir. Böylece rezveratrolün DPPH serbest radikalini söndürdüğü ve oluşan rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün fenolik halka tarafından süspense edilerek radikal formunun dağıtıldığı belirtilmiştir (Gülçin 2012).



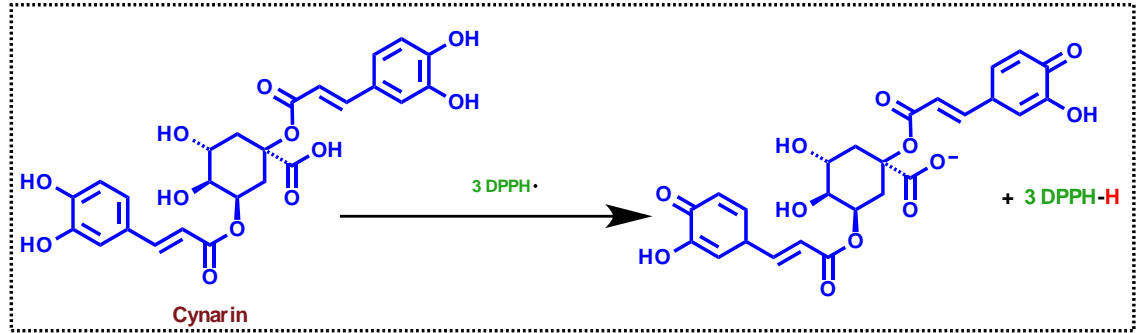
Şekil 5.8. Rezveratrol molekülünün radikal giderme mekanizması (Gülçin 2012)

Yine Gülçin tarafından yapılan bir diğer çalışmada kurkumin molekülünün radikal giderme aktivitesi farklı bir mekanizma ile açıklanmıştır. Keto formundaki kurkuminin iki metoksifenol halkası arasında yüksek aktiviteli karbon atomu bulunur. Şekil 5.9’da görüldüğü gibi kurkumin molekülü bu karbon atomundan kolaylıkla bir hidrojen atomu koparabilir.



Şekil 5.9. Kurkuminin radikal giderme mekanizması (Gülçin 2012)

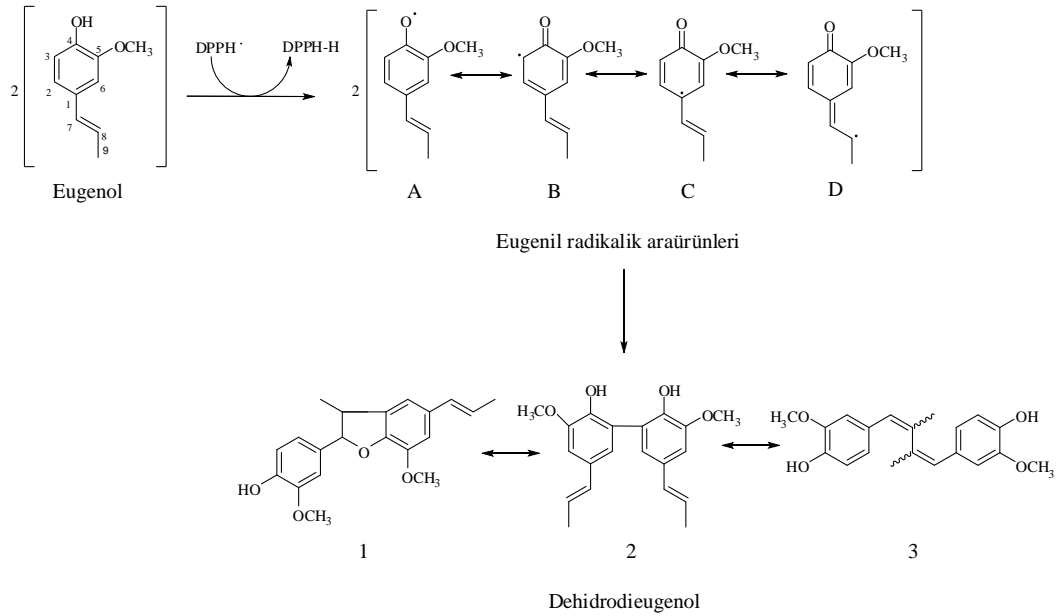
Benzer şekilde son zamanlarda Cynarin üzerine yapılan bir çalışmada DPPH radikal giderme aktivitesi için benzer şekilde giderildiği gözlenmiştir. Ayrıca rezveratrol'den farklı karboksil grubu (-COOH) üzerinden de bir DPPH radikalini söndürebileceği öne sürülmüştür (Topal *et al.* 2015).



Şekil 5.10. Cynarinin DPPH. serbest radikalini söndürme mekanizması

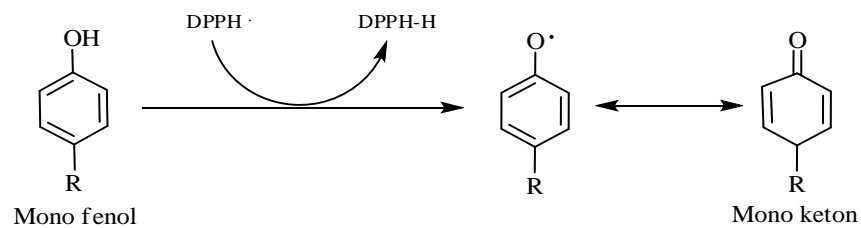
Yapılan çalışmalarla DPPH radikali ile eugenol molekülü arasındaki reaksiyonun tersinir olduğu bildirilmiştir. Bu durum eugenol ve benzer polifenollerini içeren bileşiklerin antioksidan kapasitelerinde düşüşe sebep olmaktadır (Huang *et al.* 2005).

Karanfil (*Eugenia caryophyllata*) bitkisinin etken maddesi olan Eugenol üzerinde Gülçin tarafından yapılan bir çalışmada, Eugenol ve İzoeugenol'un karmaşık yapıdaki dimerik türleri de içeren kompleks reaksiyon mekanizmaları aydınlatılmış ve ilginç bulgular elde edilmiştir (2011). Bu çalışma ile Eugenol molekülünün yan zincirindeki konjugasyon sayesinde antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin daha da arttığı ileri sürülmüştür. Yapısında sadece bir adet aromatik hidroksil grubu bulunmasına rağmen Eugenol molekülünün iki veya daha fazla DPPH serbest radikalini giderdiği bildirilmiştir. Şekil 5.11'de görüldüğü gibi A, B ve C molekülleri iki fenolik hidroksil grupları üzerinde dimerleşir ve bu bileşikler C₈-C₈ ve C₅-C₅ arasındaki kapling reaksiyonları sonucu oluşur.



Şekil 5.11. Eugenol molekülünün DPPH· serbest radikalini söndürme mekanizması ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu

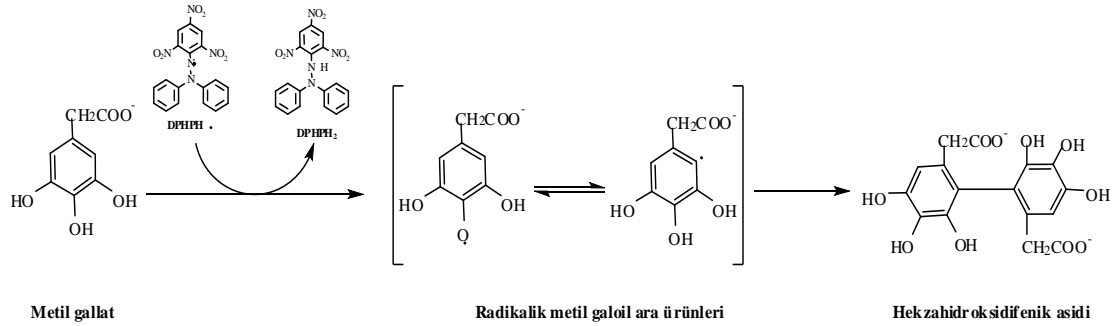
Fenolik halkaya sahip moleküllerin DPPH serbest radikali giderme mekanizmaları ile ilgili yapılan mekanistik çalışmalar, fenolik bileşiklerin muhtemel DPPH· serbest radikali giderme mekanizmaları hakkında genel fikir verir. *p*-Hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit gibi mono fenoller için muhtemel DPPH· serbest radikalini giderme mekanizması Şekil 5.12 ile özetlenebilir.



Şekil 5.12. Mono fenoller için muhtemel DPPH serbest radikali giderme mekanizması

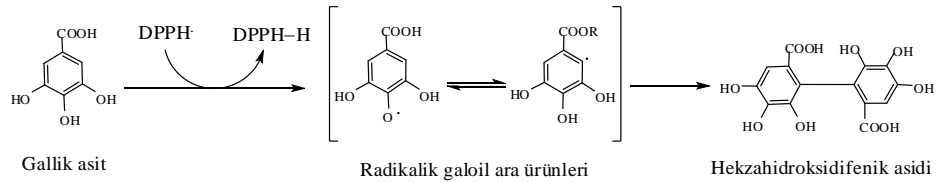
Yüksek aktiviteye sahip oldukları bilinen polifenol radikalleri, farklı C-C ve C-O grupları üzerinden kapling reaksiyonları vererek dimerleşirler. Bu tür kapling reaksiyonlarında bir polifenol bileşiği olan metil galattan oluşan galoil radikallerinin

DPPH·'a karşı aktivitesi oldukça yüksektir. Metil galat molekülünün DPPH· serbest radikali giderme mekanizması Şekil 5.13'de verilmiştir.



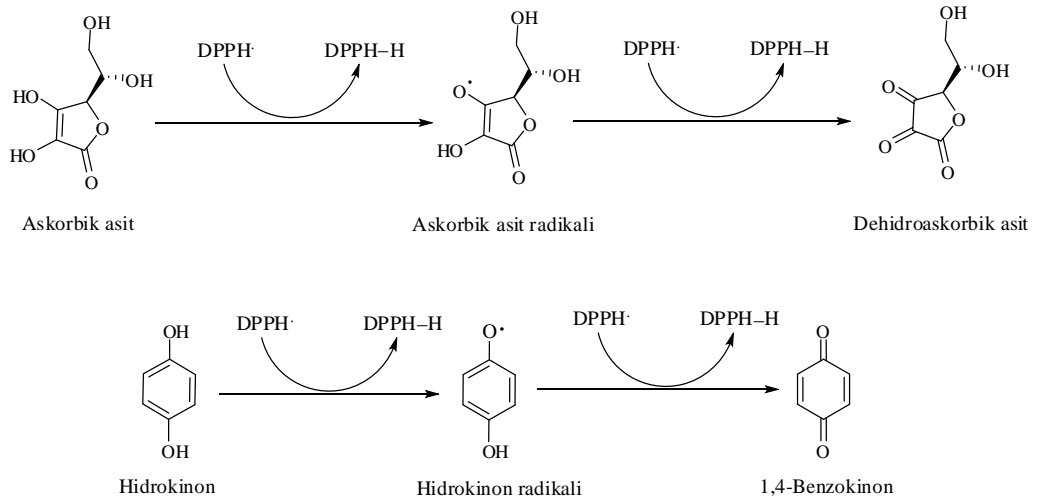
Şekil 5.13. Bir metil galat molekülünün DPPH· serbest radikalini giderme mekanizması ve radikalik metil galoil ara ürününün oluşumu

Gallik asitin DPPH serbest radikal giderme mekanizması ise metil galatınkine benzer bir mekanizma üzerinden yürür. Tek fark metil galatın fazladan bir metil gurubuna sahip olmasıdır. Gallik asit için DPPH· serbest radikalini giderme mekanizması, metil galat için ön görülen mekanizma modifiye edilerek Şekil 5.14'deki gibi verilebilir.



Şekil 5.14. Bir gallik asit molekülünün DPPH· serbest radikalini söndürme mekanizması ve radikalik galoil ara ürününün oluşumu

DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesinin antioksidan vitaminler ve polyhidroksi aromatik bileşiklerin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Yoshida *et al.* 1989; Nishizawa *et al.* 2005). Konjuge gruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon için Nishizawa ve arkadaşları tarafından bir mekanizma öne sürülmüştür (2005).



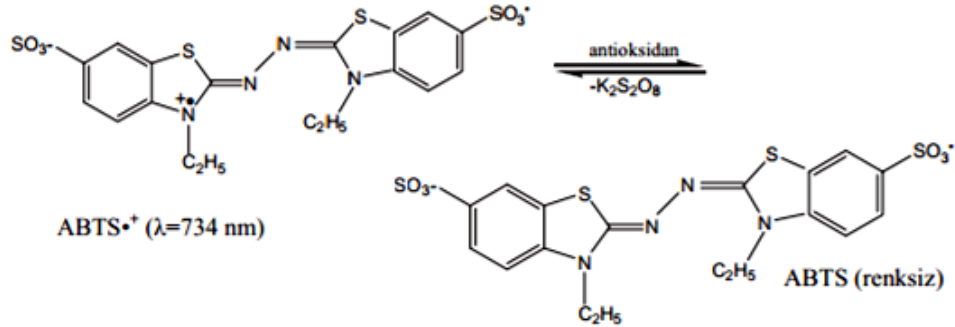
Şekil 5.15. Askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH serbest radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon

Askorbik asitin DPPH· serbest radikalleri ile etkileşmesi sonucu, askorbik asidin üç nolu karbon atomuna bağlı olan hidroksil gurubundan bir adet hidrojenin homolitik olarak ayrılması ile DPPH· indirgenir ve DPPH-H oluşur. Askorbik asit ise askorbil radikaline dönüşür. Askorbik asit ikinci bir DPPH· radikali ile etkileştiğinde askorbil radikalini söndürür ve askorbik asit dehidroksi askorbik aside dönüşür. Benzer bir mekanizma hidrokinonun antioksidan aktivitesinde görülmektedir. Hidrokinon, birinci DPPH· etkileşmesi ile hidrokinon radikaline dönüşür ve ikinci DPPH· ile etkileştikten sonra da 1,4-benzokinona dönüşerek iki radikalide söndürür.

DPPH· serbest radikali giderme aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan kapsaisin, BHT standardı gibi davrandığı gözlemlendi. Kapsaisin farklı konsantrasyonlarındaki (10-30 µg/mL) DPPH· serbest radikalleri giderme aktivitelerine ait grafiklerde artan konsantrasyonla birlikte absorbansta azalma ve dolayısıyla artan konsantrasyonla birlikte giderme aktivitesinin arttığı görüldü.

Radikal giderme kapasitesini belirlemek amacıyla uygulanan ABTS^{·+} giderme metodunda, ABTS oksidanlar tarafından yükseltgenir ve ABTS^{·+} radikali oluşur. ABTS metodu, ABTS radikali ve potasyum persülfat (K₂S₂O₈) arasındaki reaksiyon sonucu

mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşması ve oluşan bu radikal kationun spektrofotometrik olarak 734 nm de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Oksidan olarak $K_2S_2O_8$ yerine Mn_2O_3 'de kullanılabilir.



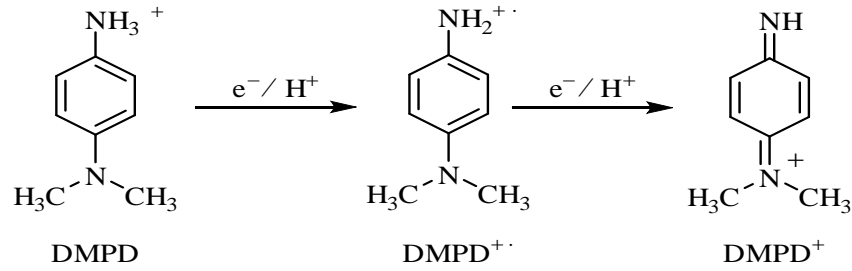
Şekil 5.16. ABTS•⁺'nin kimyasal yapısı ve persülfatla oksidasyonu

Kolay uygulanabilir bu metotta, ABTS radikali sulu çözücüler ve organik çözücülerin her ikisinde de çözünebilir. Böylece lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitelerini ölçmede kullanılabilir. Ayrıca ABTS radikali geniş bir pH aralığında kararlıdır ve bu özelliğiyle antioksidan mekanizma üzerine pH etkisini araştırmak amacı ile kullanılabilir. Düşük redoks potansiyeline (0.68 V) sahip bu radikal birçok fenolik bileşiklerde reaksiyona girebilir (Büyüktuncel 2013).

Kapsaisinın farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) ABTS⁺ radikali giderme aktivitesine ait grafikde, artan konsantrasyonla birlikte absorbansın azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak, artan konsantrasyonla birlikte radikal giderme aktivitesinin arttığı belirlendi.

Antioksidan özellik belirlemek amaçlı yapılan çalışmalarda kullanılan bir diğer radikal giderme metodu ise HAT esaslı DMPD⁺ radikal giderme metodudur. Metodun esası; asidik pH'da ve uygun bir oksidan varlığında kararlı ve renkli bir DMPD radikal kationu olan DMPD⁺'nin oluşmasına dayanır. Oluşan DMPD⁺ 505 nm'de maksimum absorbans gösterir. DMPD⁺'ye bir H atomu transfer eden antioksidan madde rengi söndürür ve çözeltide bir renksizleşme meydana gelir. Bu reaksiyon on dakikadan daha

az zamanda gerçekleşir. Radikal katyonunun oluşumu yavaştır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar, son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk solüsyonu veren FeCl₃ ile elde edilir. DMPD metodu hidrofilik antioksidanlar için uygundur. BHT ve α-tokoferol gibi hidrofobik antioksidanlar için metodun hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği belirgin bir şekilde azalmaktadır (Gülçin 2008; Gülçin 2012).



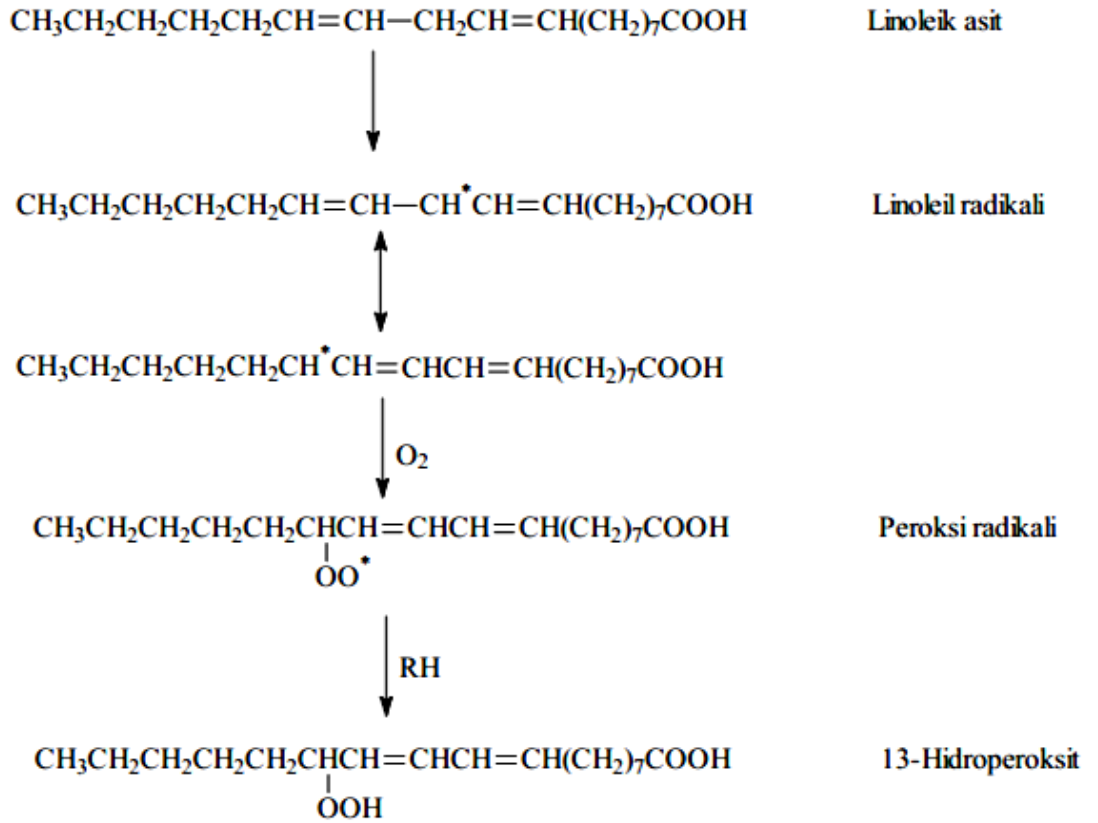
Şekil 5.17. Kararlı DMPD^{+•} radikalinin oluşum ve giderilme mekanizması

DMPD^{+•} radikal giderme aktivitesi için kapsaisin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DMPD^{+•} radikali giderme aktivitesine ait grafikte, artan konsantrasyonla birlikte absorbansın azalması sonucu radikal giderme aktivitesinin arttığı gözlemlendi.

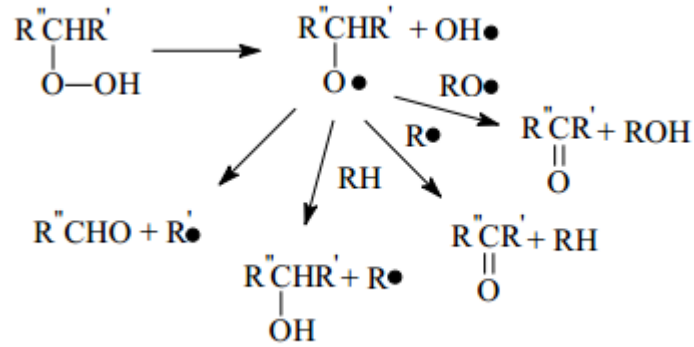
Total antioksidan kapasitesi, gıda ve tıbbi biyoaktif bileşenler için yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Bu metod, bir bileşiğin lipit peroksidasyonu gibi oksidatif hasarı inhibe edebilmesi şeklinde tanımlanır. Lipit oksidasyonu, bir dizi serbest radikal zincir reaksiyonu sonucu meydana gelir ve birçok biyolojik hasarla ilişkilidir. Bir biyoaktif bileşiğin olası etkisini belirlemek için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu azaltabilme kabiliyeti test edilir. Linoleik asitin oksidasyonu boyunca peroksitler oluşur ve antioksidan varlığında linoleik asit oksidasyonu azalır. Bu nedenle antioksidanlar, lipit peroksidasyonunun inhibe edilmesinde ve ROS'nin zararlı etkilerine karşı korunmada önemli rol oynarlar (Gülçin 2012).

Lipit oksidasyonu üç aşamalı bir serbest radikal oluşum mekanizmasıdır. Bu reaksiyonda ışığa, ısıya, ağır metal iyonlarına ve oksijene maruz kalan yağ asidinden hidrojenin ayrılması ile serbest radikaller oluşur. Daha sonra serbest radikallere

moleküler formda oksijen bağlanarak aktif peroksi radikalleri oluşur. Oluşan aktif peroksi radikalleri, nötr duruma gelebilmek için, ya aynı zincir üzerindeki, ya da başka bir yağ asiti molekülünün zincirindeki hidrojenlerden birini kendine çekerek bağlanır ve böylece ilk oksidasyon ürünleri olan hidroperoksitler meydana gelir. Hidroperoksitler kararlı olmadıkları için ikinci derecedeki oksidasyon ürünlerine, çoğunlukla da karbonilli bileşenlere parçalanırlar. Bu bileşenler; aldehit, keton, asit, hidrokarbon ve epoksi asitlerdir (Pokorny *et al.* 2001; Kayahan 2003).



Şekil 5.18. Linoleik asitin otoksidasyon mekanizması (Pokorny *et al.* 2001)



Şekil 5.19. Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşum mekanizması (Pokorny *et al.* 2001)

Kapsaisinın total antioksidan aktivitesi, “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) ferrik iyonlarına (Fe^{3+}) yükseltger. Yükseltgenen ferrik iyonları (Fe^{3+}) tiyosiyanat (SCN^-) ile $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ kompleksini oluşturur.

$\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ kompleksi 500 nm’de maksimum absorbans verir. Görülen yüksek absorbans değeri, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazla olduğunun göstergesidir. Deney periyodik olarak 12 saatte bir ölçüm olarak toplam 72 saatte gerçekleştirildi. Total antioksidan aktivite, kapsaisinın 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonundaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin 500 nm’deki absorbansı ölçülerek belirlendi. Daha sonra absorbansa karşı inkübasyon süresine ait grafik çizildi ve sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldı.

Tez kapsamında karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) afinite kromatografisi ile insan eritrosit kanından ayrı ayrı saflaştırılarak kapsaisinın her iki izoenzim üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

Karbonik anhidraz enzimi eritrositlerden saflaştırılırken, Sepharose-4B üzerinde hazırlanan afinite jeli kullanıldı. Afinite kromatografisinde kullanılan bu jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. Matriks olarak seçilen Sepharose-4B öncelikle CNBr ile aktifleştirilir, daha sonra aktifleşen jele L-tirozin uzantı kolu takılır ve

sülfanilamit diazolan ile tirozine kenetlendirilir. Sülfanilamit, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligant olarak kullanılır.

Karbonik anhidrazın 15Å^o derinliğindeki aktif bölgesine erişebilmek için afinite jeline istenilen uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla uzantı kolu olarak seçilen tirozin, enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamaktadır.

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH: 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezi ile saflaştırılan izoenzimlerin saflıkları kontrol edildi. hCA I ve hCA II için tek bant gözlemlendi.

hCA I izoenziminin spesifik aktivitesi 3967,86 EU/mg olup %46,28 verimle saflaştırıldı. hCA II izoenziminin spesifik aktivitesi 25000 EU/mg olup, %83,31 verimle saflaştırıldı.

Kinetik çalışmada K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması için Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı.

Kalitatif protein tayininde afinite kromatografisi uygulandı. Bu yöntem eluatlardaki proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayini ise coomassie-blue yöntemi ile belirlendi. Bozucu faktörlerin az olması, protein-boya kompleksinin uzun süre çözeltilerde kalması ve kısa sürede uygulanması bu yöntemi diğer yöntemlerden avantajlı kılmaktadır (Bradford 1976).

Kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz enzimi için diğer aktivite yöntemi esteraz aktivitesidir. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat, karbonik anhidraz tarafından p-nitro fenol ve p-nitro fenolata hidroliz edilir ve oluşan ürün 348 nm dalga boyunda

absorbans verir. Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun her ikisinin de aynı absorbansı verdiği bölgedir. p-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için öncelikle az miktarda asetonda çözüldü, daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltileri hazırlandı. Asetonun çözücü olarak tercih edilme sebebi; hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır.

hCA I ve II izoenzimlerinin saflaştırıldığı eritrositlerin pH'sının 7,4 olması sebebiyle aktivite ölçümleri sırasında bu izoenzimler için pH:7,4 olarak alındı.

Son olarak hCA izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı.

CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi birçok hastalığın tedavisinde oldukça önemlidir. CA inhibitörleri, diüretik ilaç olarak kullanılmalarının yanı sıra obezite ve kanser tedavisinde de kullanılmaktadır. Özellikle anti-glokom ilaç olarak glokom tedavisinde hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yoğunlaşmıştır. Alzheimer hastalığı için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde de CA aktivasyonu önemlidir.

Çalışmamızın son basamağında kapsaisin AChE üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapıldı. 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 BuChE'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).

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.* 2003).

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 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).

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 görölen Alzheimer hastalığı (AH), nörodejeneratif bir hastalıktır (Geula and Mesulam 1995, 1999). Hastalığın kesin nedeni bilinmemekle birlikte kolinerjik eksikliğin giderilmesi amacıyla asetilkolinin sinaptik aralıktaki 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, BuChE aktivitesi artmaktadır (Perry *et al.* 1978).

Yapılan mikroskopik incelemeler, Alzheimer hastalarında AChE'nin yanı sıra BuChE aktivitesinin de aşırı derecede arttığını göstermiştir. Bu durum, AH'nin tedavisinde, AChE'nin yanısıra BuChE'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).

Fenolik bileşikler serbest radikalleri gidermekle birlikte onların neden olduğu olumsuz etkileride ortadan kaldırırlar. Bu kapsamda çalışmamızda kullandığımız ve aynı zamanda bir fenolik bileşik olan kapsaisin AChE inhibisyon etkisi değerlendirildi. Ellman metoduna göre inhibisyon türü, K_i ve IC_{50} değerleri belirlendi (Ellman 1961).

KAYNAKLAR

- Abuja, P.M., Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Antioxidant and prooxidant activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density-lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4091-4096.
- Adams, R.L., Craig, P.L., Parsons, O.A., 1984. Neuropsychology of Dementia, *Neurolog. Clin.*, 387-405.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 27-37.
- Akın, E.B., Karabulut, I., Topçu, A., 2008. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chem* , 939-48.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1379-1385.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya.
- Aldridge, W.N., Reiner, E., 1969. Acetylcholinesterase. Two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibition by substrate. *Biochem J.* ,147-162.
- Anonymous, 2001. <http://www.chilepepperinstitute.org/anatom.html>
- 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.
- Arslan, O., 2001, Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds, *Turk J. Med. Sci.*, 982.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrelioğlu, Ö.İ. 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 163-166.
- Bachman, D.L., Wolf, P.A., Linn, R.T., 1992. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the framingham study, *Neurol.*, 115-9.
- Balasundram, N., Sundram, K., Saman, S., 2006. Phenolic compounds in plants agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 191-203.
- Baskın, S.L., Salem, H., 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Washington, D.C. Taylor & Francis, 364 p.
- Bassil, N., Grossberg, G.T., 2009. Novel regimens and delivery systems in the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs.*, 293-307.
- Beach, T. G., Kuo, Y.M., Spiegel, K. ve ark. 2000. The cholinergic deficit coincides with Ab deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *JNeuropathol Exp Neurol*, 308-313.
- Beis, S.H., 1990. Kırmızı biber'den gıda boyası eldesi. Anadolu Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Benzie, I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 70-76.
- Betteridge, D.J., 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 3-8.

- Blekas, G., Boskou, D., 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenil acetic acid and a-tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. *Grasasy Aceites*, 34-37.
- Boyle, N.A.J., Talesa, V., Giovannini, E., Rosi, G., Norton, S., J., 1997. Synthesis and study of thiocarbonate derivatives of choline as potential of acetylcholinesterase. *J Medicinal Chemistry*. 3009-13.
- Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin, İ., Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., and Supuran, C.T., 2015. Synthesis and Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, IX, and XII Inhibitory Effects of Dimethoxybromophenol Derivatives Incorporating Cyclopropane Moieties *J. Med. Chem.*, pp 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.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 317-333.
- Burak, M., Çimen Y., 1999. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 296–304.
- Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 1482-1489.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 371-375.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Büyüktuncel, E., 2013. *Marmara Pharm J.*, 93-103.
- Chahl, L.A., Lynch, P.M., Hung, 1987. kardiyovasküler sistem üzerine kapsaisin akut etkileri *Acta Physiol.de.*, 413-419[PubMed].
- 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.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 481-93.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., 2000. In the carbonic anhydrase new horizons, Birkhauser Verlag, Basel, 343-363.
- Cheung, B.M., Ong, K.L., Tso, A.W., Leung, R.Y., Xu, A., Cherny, S.S., Sham, P.C., Lam, T.H., Lam, K.S., 2012. C-reactive protein as a predictor of hypertension in the Hong Kong cardiovascular risk factor prevalence study (CRISPS) cohort. *J Hum Hypertens.*, 108-16.
- 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.
- Cochran, R., Kalisiak, J., Küçükılınç, T., Radić, Z., Garcia, E., Zhang, L., Ho, Y.K., Amitai, G., Kovarik, Z., Fokin, V., Kansız, B.K., Taylor, P., 2011. Oxime-

- assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging. *J Biol Chem.*, 29718-29724.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66- 76.
- Çaylak, E., 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stress ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9,73-83.
- Çoban, Ö.E, Patır, B., 2010. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *GıdaTehnolojileri Elektronik Dergisi*, 7-19.
- 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*, 266-270.
- Das, Kumuda C., and Chandan K., Das.,2002. Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O₂) quencher. *Biochemical and biophysical research communications* 62-66.
- Deaton, C.M., Marlin, D.J., 2003. Exercise-associated oxidative stress, *Clin. Tech. Equine Pract*, 278-291.
- Delibaş ,N.,Özcankaya ,R., 1995. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fak. Derg.*, 11-17.
- 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.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry With Clinical Correlations*. Kanada
- Di Mascio, P.D., Murphy,M., Sies, H., 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* ,194-200. disease *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 23-28.
- Di Targiani, R.C, Chandrasekaran, L., Belinskaya, T., Saxena, A., 2010. In search of a catalytic bioscavenger for the prophylaxis of nevre agent toxicity. *Chem-Biol Interact* ,349-354.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S., Waterhouse, A.L., 1998. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1247-1252.
- Du, Q., Zheng, J., Xu, Y., 2008. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity . *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 390-395.
- Eberhardt ,M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H., 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 903–904.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*, 46-48.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherston R.M., 1961. A new and rapidcolorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 88-95.
- Elmastas, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y., 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 258-266.
- Elmastas, M., Türkekul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella*

- vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 443-448.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 137-148.
- Erden, M., 1992. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*, 201-7
- Evans, P., Halliwell, B., 2001. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr.*, 85, 67-74.
- Fırat, S., 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon glutatyonperoksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D. Uzm.Tezi, Ankara.
- Fisher, A., 2008. Cholinergic treatments with emphasis on m1muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 433-42.
- Forette, F., Boller, F., 2000. Alzheimer hastalığında ilaç geliştirilmesi: Tarihesine bakış ve geleceğine ilişkin öngörüler In: Alzheimer hastalığının farmakoterapisi, (Gauthier, S., Ed.), pp. 1-15, Yelkovan Yayıncılık, İstanbul.
- Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The Cholinergic hypothesis of Alzheimer's Disease: A Review of Progress, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 137-47.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 239-257.
- Friedlander, A.H., Norman, D.C., Mahler, M.E., Norman, K.M., Yagiela, J.A., 2006. Alzheimer's disease: psychopathology, medical management and dental implications. *J Am Dent Assoc.*, 1240-51.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*, 245-254.
- 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.
- Ganesan, K., Kumar, K.S., Rao, P.V.S., 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innov Food Sci* 73-78.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1995. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer
- 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.
- Giacobini, E., 1995. Cholinesterase Inhibitors: From preclinical studies to clinical efficacy in Alzheimer Disease In: *Enzymes of the cholinesterase family* (Quinn, D., Balasubramaniam, A.S., Doctor, B.P., Taylor, P., Eds.), pp. 463-9, Plenum Press, New York .
- Gilman, S., 1997. Alzheimer's disease. 230-45.
- Govindarajan, V.S., Sathyanarayana, M.N., 1991. Capsicum: production, technology, chemistry and quality. part v. impact on physiology, pharmacology, nutrition

- and metabolism; structure, pungency, pain and desensitization sequences. Crit.Rev. Food Sci. Nutr., 435-474.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. International Journal of Academic Research , 149-154.
- Göçer, H.,Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 821-825.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar.Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 85-89.
- Greig, N., Utsuki, T., Yu, Q ve ark. 2001. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase, 1-7.
- Guo, C., Yang, J., Li, Y., Xu, J., Wei, J., & Jiang, Y. 2003 .Antioxidant capacity of different parts of fruits determined by FRAP assay. Zhongguo Gonggong Weisheng, 841–843.
- Gutteridge, J.M.C., Richmond R., Halliwell B., 1980. Oxygen free radicals and lipid peroxidation: Inhibition by the protein caeruloplasmin. FEBS Letters, 269-272.
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem., 1819-1828.
- 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, Erzurum.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. International Journal of Food Sciences and Nutrition491-499.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 213-220.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. Life Sciences, 803-811.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. Amino Acids, 431-438.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009a. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. Chemico-Biological Interaction, 71–80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. Journal of Medicinal Food, 975-985.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. Journal of Ethnopharmacology, 287-293.

- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. *In vitro* antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) *Acta Alimentaria*, 193-202.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010a. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 2227-2238.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003b. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 278-281.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.İ., 2002. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 167-171.
- Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 685-695.
- 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*, 354-361.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004b. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, 205-215.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004c. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, 561-563.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006a. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, 130-134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003a. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 371-382.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004d. Comparison
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004e. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), *Italian Journal of Food Sciences*, 17-30.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel M., Erdoğan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, 585-593.
- Gülçin, İ., Topal, F., Oztürk Sarikaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel M., 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 158-175.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu, M.E., 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.* 613-616.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 345-391.
- Güner, U., 2014. www.academia.edu/6520109/Toksikoloji_Ders_Notlari_V2

- Güven, A., 2000. Asetilkolinesterazın önemi ve inhibitörleri. Kafkas Üniv. Vet.Fak.Derg., 145-151.
- Hall, III C., 2001. Source of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. Antioxidants in Food, Practical Applications, J Pokorny, N Yanishlieva and M Gordon (eds), pp., 169-219, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). Free Radic. Res., 261-272.
- Halliwell, B., 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J;1,358-64.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutritional Review, 52, 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In: Methods in Enzymology, 186, 1-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford, pp 543.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, p.543, Oxford.
- Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., 1997. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. Clinical Chemistry, 562-68.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, P., Hänninen, M., Hämäläinen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, **392**, 83-92.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D., 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272,16644-16651.
- Holzer, P., Sametz, W., 1986. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology* 91, 975-981.
- Hou, Y.C., Janczuk, A., Wang, P.G., 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr. Pharm. Des.* June, 417- 471
<http://yunus.hacettepe.edu.tr/~ucalis/>
- Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., 2000. (Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase, *J Biol Chem*, 16044-16049.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 1841-1856.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1841-1856.
- Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 583-95.
- Iwai, K., 2001. Food functionality of capsaicin and its analogs in red pepper. 11th World Congress of Food Science and Technology, 22-27 April 2001. Seoul, Korea.
- Jabusch, J. R., Deutsch, H. F., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with *p*-nitrophenyl acetate. *Arch Biochem. Biophys.*, 238-170.
- Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W.,

- Kavas, G.Ö., 1989. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri, 1-8.
- Kayahan, M., 2003. Yağ Kimyası, Bölüm 1 Lipitlerin Kimyasal Yapısı. ODTÜ Geliştirme Vakfı, Yayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları, 220 s., Ankara.
- Keha, E., Küfrevioglu, Ö. İ., 2005. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Keleştemur, G., Özdemir, Y., 2011. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 4, 69-73.
- 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.
- Koca, N., Karadeniz, F., 2005. Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. Gıda, 229-236.
- Kogure, K., Goto, S., Nishimura, M., Yasumoto, M., Abe, K., Ohiwa, C., Sassa, H., Kusumi, T., Terada, H., 2002. Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. Biochimica et Biophysica Acta. 84-92.
- Köksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoğlu, F., Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of *melissa officinalis* leaves. Journal of Medicinal Plants Research, 217-222.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea L.*). Turk J Agric For , 65-78.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea L.*) Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 65-78. nine peppers. J. Funct. Foods , 331-338.
- Kurilich, A.C., G.J. Tsau, A. Brown, L. Howard, B.P. Klein, E.H. Jeffery, M. Kushad, M.A. Wallig, and J.A. Juvik. 1999. Carotene, tocopherol, and ascorbate contents in subspecies of brassica oleracea. Journal Agriculture Food Chemistry, 1576-1581.
- Kusano, C, Ferrari ,B.,2008. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. Haliç University J Cell Mol Biol, 7, 1-15.
- Küçükılınç, T., 2014. Organofosfat zehirlenmelerinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanılma olasılığı Turk J Biochem, 126-131.
- Küfrevioglu, Ö.İ., Keha, E., 2011. Biyokimya. Aktif yayınları, 138, Erzurum.
- Lane, T.W., Morel, F.M.M., 2000. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, *Plant Physio.*, 345-352.
- 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.
- 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.
- Leppilampi, M., 2006. "Functional and immunohistological studies on cancer associated carbonic anhydrase IX." Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University Of Oulu.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase .Pharmacol. Ther. , 1-20.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F., 2006b. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. J. Sci. Food Chem., Vol. 54, pp., 1256-1264.

- Lleó, A., Greenberg, S.M., Growdon, J.H., 2006. Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* ,513-33.
- Lui, J., Günther, A., Bilitewski, U., 1997. Detection of methamidophos in vegetables using a photometric flow injection system. *Environmental Monitoring and Assessment*,375-382.
- Maren, T.H.,1987. Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research, *Drug dev. Res.*, 10- 255.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 31-91.
- Materska, M., Perucka, I., 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum L.*). *J Agric FoodChem* 1750–6.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De Castro m.1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.*, 595–603.
- Mates, J.M., Sanchez-Jimenes ,F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci*, 339-345.
- Mavi, A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Dicle Tıp Fakültesi Dergisi*, 30-39.
- Meral, R., Doğan, İ.S., Kanberoğlu, G.S.,2012. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 45-50.
- 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.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. *Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York. 618-649.
- Moris, P., Alexandre, I., Roger, M., Remacle, J., 1995. Chemiluminescence assay of organophosphorus and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta* ,53–59.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W., 1996. Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. *Harper'ın Biyokimyası*, Yirmidördüncü baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. and Radwell, V.W., 1993. *Harper'ın Biyokimyası. Çevirenler: Prof. Dr. Gülriz Menten, Prof.Dr. Biltan Ersöz. Barış Kitabevi.*
- Nar, M., 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- 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.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids. In: Fennema O.R. (Ed.) *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York, 225–319.
- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., 2005. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical:

- Auseful method for quantitative analysis of peroxyradical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 714-716.
- Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2007. Carbonic anhydrase and matrix metalloproteinase inhibitors. inhibition of human tumor-associated isozymes IX and cytosolic isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2298.
- 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, 1031–1042. of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, 87, 393-400. of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, 393-400.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of ısgın (*Rheum ribes* L.). Asian Journal of Chemistry, 3047- 3055.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Ed. 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara
- Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., 2001. Bitki biyoteknolojisi II genetik mühendisliği ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları , Konya.
- Özgençli, İ., Temel ,Y., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi, M., 2005. Bazı pestisitlerin gökkuşuğu alabalığı karaciğerinden saflaştırılan mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enziminin aktivitesi üzerine in vitro etkilerinin incelenmesi . Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi , 109-117.
- Özkan, A. Fışkın, K. 2004. Serbest radikaller, karsinogenez ve antioksidan enzimler. Tr J Hematol-Oncol, , 52-60.
- Pang, Y.,P., Hong, F., Quiram, P., Jelacic, T., Brimijon, S., 1997. Synthesis of alkylene linked bis-THA and alkylene linked benzyl- THA as highly potent and selective inhibitors and molecular probes of acetylcholinesterase. J. Chem. Soc., Perkin Trans., 171-176.
- Percival, M., 1998. Antioxidants. Clinical nutrition insights; 1- 4.
- 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.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 1035-1042.
- Podda, M., Grundmann- Kollmann M., 2001. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. Clinical and experimental dermatology, 578-582.
- Pokorny, J., 1999. Antioxidants in food preservation'. In: Shafiur Rahman M (ed) Handbook of food preservation. Marcel Dekker, New York, 309–337.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., 2001. Antioxidants in food. Woodhead Publishing Ltd., 365 p., England.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics and Virtual Transition States, Chem. Rev., 955-79.
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S., 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends in Food Sciences and Technology , 75.
- Rayner, B.S., Hua, S., Sabaretnam, T, Witting, P.K., 2009. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. Biochem J. Sep 25, 423, 169-77.

- Reddy, A. Ch Pulla, and Belur R., Lokesh, 1994."Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and cellular biochemistry* 137, 1-8.
- Reyes-Escogido, M. L., Gonzalez-Mondragon, E. G., Vazquez-Tzompantzi, E.,2011. Chemical and Pharmacological Aspect of Capsaicin. *Molecules*, 1235-1270.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *FreeRad. Biol. Med.*, 933-956.
- Roberts, S., Lane, T.W., Morel, M.M., 1997. Carbonic anhydrase in the marine diatom
- Ryon, U.S., Whitney, P.L., Ryen, J.W.,1982. Localization of carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture, *J. Appl. Physiol.*, 914.
- S., Supuran, C.T., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors, inhibition of cytosolic isozymes 1 and 11 and transmembrane cancer-associated isozyme IX with lipophilic sulfonamides, *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.*, 184, 333.
- Saleh, M.M., Hashem, F.A.E., Glombitza, K.W., 1998. Study of *Citrus aitchensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated. *Food Chemistry*, 397-400.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, 213.
- Serafini, M., Del Rio, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report*, 145-152.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 67-103.
- Sherwin, E.R., 1990. In: Branen AL, Davidson PM, Salminen S (eds) *Food additives*, Marvel Dekker Inc., New York, 139–193.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* , 31–39.
- Sing, S., Asad, S.F., Ahmad, A., Khan, N. and Hadi, S.M. 2001. Oxidative DNA damage by capsaicin and dihydrocapsaicin in the presence of Cu(II). *Cancer Letters*, 139-146.
- Sly, W.S., ve Hu, P.Y.,1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 64, 375.
- Smirnoff, N., 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann Bot*,661-669.
- So, A.K.C., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., Cannon, G.C., 2004. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (e Class) is a component of the carboxysome shell, *J Bacteriol*, 623–630.
- Söğüt, O., Kaya, H., Gökdemir, M.T., Nimetoğlu, M.S., Solduk L.,2010. Kardiyotoksisite zayıflamak için biber hâpı kullanımını sonrasında gelişen iki olgu raporu. *Turk J EmergMed.* , 133-136.
- Stahl, W, Berg, H, Arthur J., et al.,2002. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med*;, 39–100.
- Stahl, W, Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 345–351.
- Stams, T., Chen, Y., Bariack Sjodin, P. A., Hurt J. D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D. W.,1998. *Protein Sci.*, 556.
- Sukrasno, N.; Yeoman, M. 1993. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry.*, 839-844.

- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators” Rev., 1-14.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A.,2000. Carbonic anhydrase inhibitors-Part 94.1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? European Journal of Medicinal Chemistry , 867.
- Supuran, C.T.,2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators Nat Rev Drug Discov,168-81.
- Surh, Y.-J., Lee, S. S., 1995. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. Life Sci., 56 ,1845-1855.
- Szolcsanyi, J., Bartho, L., 1981. Impaired defense mechanism to peptic ulcer in the capsaicin –Desensitized Rat. Chem. Abstr., 95.
- Şener, E., Şahin, S., 2010. Kapsaisin: Farmakokinetik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri.J. Hacettepe Üni., Fakültesi Pharm., 149-163.
- Şerbetçi, Tohma, H., Gülçin, İ., 2009. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). International Journal of Food Properties, 657-671.
- Taylan, Z.S., Özkoç, H.B., 2007. Potansiyel ağır metal kirliliğinin belirlenmesinde akuatik organizmaların biokullanılabilirliği. BAÜ FBE Dergisi, 17-33. *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae), *J Phycol.*, 845–850.
- Thomas, J.A., 1999. Including glutathione, a peptide for cellular defense against oxidative stres.
- Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H, Takino Y. 1985. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1725–1728.
- Topal, G., 2008. Nitrik oksit sentezinin L-Arjinin taşınması ve arjinazlar tarafından düzenlenmesi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD.
- Topal, M., Gocer, H., Topal, F., Kalin, P., Polat Köse, P., Gülçin, İ., Çakmak, K.C., Küçük, M., Durmaz, L., Gören, A.C., Alwasel, S.H. 2015. Antioxidant, antiradical and anticholinergic properties of cynarin purified from the illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, doi:10.3109/14756366.2015.1018244.
- Tuna, S., 2007. Orta anadolu süne, *Eurygaster maura* (heteroptera:scutellaridae) populasyonlarındaki esteraz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin elektroforetik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tunçtan, B., Abacıoğlu, N., 1998. Biyolojik örneklerde nitrik oksit ölçümü: diazotizasyon yöntemi. Fabad J. Pharm. Sci., 161-170.
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters, 649-652.
- Vareltzis, K., D. Koufidis, E. Gavriilidou, Ek.Papavergou and S. Vasiliadou, 1997. Effectiveness of a Natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. Zeitschrift fur Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung, , 93–96.

- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, DL., 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 294-296.
- Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2959-2962.
- Wichi, HP., 1988. Enhanced tumour development by butylatedhydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol*, 717-723.
- Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.,T., 2004. Sulfamates and their therapeutic potential, *Medicinal Research Reviews*, Wiley Periodicals, Inc.
- Wistrand, P.J., 1980. Solubilization and preliminary characterization of membrane bound carbonic anhydrase, *J. Med. Sci.*, 85, 75.
- Wistrand, P.J., 1981. The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO² by the human erythrocyte, *Acta Physiol. Scand.*, 343.
- Yanishlieva-maslarova, N. V., 2001. Inhibiting oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in foods*, 22-70. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 4083-4089.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* meissn extracts. *Journal of the science of food and agriculture*, 64-69.
- Yılmaz İ. 2010. Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi , 143-153.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumara, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita Y., Okuda, T., 1989. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1919-1921.
- Zhuang, Y., Chen, L., Sun, L., Cao, J., 2012. Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *J. Funct. Foods* 4, 331-338.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Yozgat'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kırıkkale'de tamamladı. 1996 yılında lisans eğitimine başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2000 yılında mezun oldu. 2010-2011 Eğitim-Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2001 yılından itibaren Çevre ve Şehircilik Bakanlığı bünyesinde Biyolog ünvanı ile görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.