

**SİNEFRİN ve FENİLEFRİN: ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ
(hCA I ve hCA II) ile ASETİLKOLİN ESTERAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hülya GÖÇER

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SİNEFRİN ve FENİLEFRİN: ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) İLE ASETİLKOLİNESTERAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hülya GÖÇER

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

SİNEFRİN ve FENİLEFRİN: ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) İLE ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Hülya GÖÇER tarafından hazırlanan bu çalışma ...22./...01.../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (5./5.) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

imza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:2011/350

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

ÖZET

Doktora Tezi

SİNEFRİN VE FENİLEFRİN: ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) ile ASETİLKOLİN ESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hülya GÖÇER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Çalışmamızda Sinefrin ve Fenilefrin'in insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi I ve II (hCA I ve hCA II) üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Öncelikle hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla Sepharose-4B-L-Tirozin afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim saflığını belirlemek için, SDS-PAGE yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Ardından IC₅₀ değerlerini bulmak için, hidrataz aktivitesi kullanılarak Sinefrin ve Fenilefrin'in hCA I ve hCA II üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Ayrıca Sinefrin ve Fenilefrin'in hCA I ve hCA II üzerine inhibisyon etkileri esteraz aktivite metodu ile araştırıldı ve her bir madde için IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Çalışmamızın devamında Sinefrin ve Fenilefrin'in antioksidan kapasitesini değerlendirmek için, Fe⁺³ indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu⁺²) indirgeme kapasitesi, FRAP metodu ile indirgeme kapasitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH·) giderme, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS⁺) giderme, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD⁺) giderme aktiviteleri, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) giderme, ferrozin ve bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe⁺²) şelatlama aktiviteleri ve son olarak ferrik tiyosiyanat metodu göre total antioksidan aktivitesi çalışıldı. Çalışmalar sırasında BHA, BHT, α-tokoferol, troloks standart antioksidan olarak kullanıldı ve kıyaslamalar bu dört standart madde ile karşılaştırılarak yapıldı. Çalışmamızın son kısmında ise Sinefrin ve Fenilefrin'in AChE'nin üzerine inhibisyon özelliği araştırıldı. İnhibisyon çalışmaları Ellman metoduna göre yapıldı. Her bir madde için IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Sırasıyla Sinefrin ve Fenilefrin için IC₅₀ değerleri 0.226, 0.302 µM iken, K_i değerleri 0.169, 0.088 µM olarak hesaplandı. İnhibisyon türü ise yarışmalı inhibisyon olarak belirlendi.

2014, 163 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Sinefrin, Fenilefrin, Karbonik anhidraz; Asetilkolinesteraz

ABSTRACT

PhD Thesis

SYNEPHRIN and PHENYLEPHRINE: DETERMINATION of THEIRS ANTIOXIDANT CAPACITY and INVESTIGATION of THEIR EFFECTS on HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA I and hCA II) AND ACETYLCHOLINE ESTERASE ENZYME

Hülya GÖÇER

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In our study, the *in vitro* effects of Synephrine and Phenylephrine on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and hCA II) were investigated. Firstly, hCA-I and hCA-II were purified by Sepharose-4B-L-Thyrosine affinity column chromatography. For determination of the enzyme purity, electrophoresis SDS-PAGE was performed and single band was observed for each isoenzymes. Then, for determination of IC₅₀ values, the inhibitory of Synephrine and Phenylephrine were investigated hCA I, and hCA II isozymes by using hydratase assay. For this purpose esterase activity was used and IC₅₀ and K_i values were calculated for each substance. In further work, antioxidant capacity of Synephrine and Phenylephrine was determined using the following methods; Fe⁺³-Fe⁺² reducing capacity, cupric ion (Cu⁺²) reduction capacity by 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[•]) scavenging and N,N-dimethyl-p-phenylenediamine radical (DMPD^{•+}) scavenging activities, superoxide anion radical (O₂^{•-}) scavenging, ferrous ions (Fe⁺²) chelating activities using by ferrozine and bipyridyl reagents and lastly total antioxidant activity by ferric thiocyanate method were performed separately and during study, BHA, BHT, α-tocopherol and Trolox were used as the reference antioxidant compounds. Comparisons were performed with the four standard substances. In the last part of this study, it was investigated the effects of Synephrine and Phenylephrine on AChE. The inhibition studies were performed according to by the Ellman method. IC₅₀ and K_i values for were calculated for both substances. IC₅₀ values were found 0.226, 0.302 μM while K_i values was found as 0.169, 0.088 μM for Synephrine and Phenylephrine, respectively. The inhibition type was determined as the competitive.

2014, 163 pages

Keywords: Antioxidant activity, Synephrine; Phenylephrine; Carbonic anhydrase; Acetylcholine esterase

TEŞEKKÜR

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

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakóltemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını esirgemeyen 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 KÜFREVIÖĐLU'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 Fakóltesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında alışma arkadaşlarım Sayın Leyla POLAT KÖSE'ye, Sayın Meryem TOPAL, Sayın Öđr. Gör. Fevzi TOPAL, Sayın Hatice HAN, Sayın Pınar KALIN başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarı alışan bütün arkadaşlarıma, yine her türlü yardımı esirgemeyen Organik Kimya Ana bilim Dalı'nda doktora öğrencisi olan Sayın Uzm. Akın AKINCIOĞLU ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme özellikle canım Anneciğim'e, yaptığım herşeyde eseri ve desteği olan dayanağım biricik Babacığım'a, can kardeşlerim, G. Benan GÖÇER, Hamza GÖÇER'e ve Dilnure HANAHEMETOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Bu alışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

Hülya GÖÇER

Ocak, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz.....	6
1.3. Esteraz Enzimi.....	15
1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi.....	16
1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri.....	22
1.6. Oksidatif Stres.....	24
1.7. Antioksidanlar.....	32
1.8. Sentetik Antioksidanlar.....	36
1.9. Doğal Antioksidanlar.....	37
1.10. Antioksidanların Etkisi.....	46
1.11. En Yaygın Kullanılan Antioksidan Metotlar.....	48
1.12. Fenolik Bileşikler.....	49
1.13. Sinefrin.....	51
1.14. Fenilefrin.....	53
1.15. Çalışmanın Amacı.....	54
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	56
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	62
3.1. Materyal.....	62
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	62
3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar.....	62
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	63

3.2. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve hCA II) Enziminin Saflaştırılması İçin	
Kullanılacak Kanın Temini	71
3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve hCA II) Enzim Saflaştırma Çalışmaları....	71
3.3.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması	71
3.3.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar	72
3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini	74
3.4.1. Hidrataz aktivitesi.....	74
3.4.2. Esteraz aktivitesi.....	75
3.5. Protein Tayini	77
3.5.1. Kalitatif protein tayini	77
3.5.2. Kantitatif protein tayini	77
3.6. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar	78
3.6.1. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	78
3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü	78
3.8. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in Etkilerinin	
Belirlenmesi	78
3.9. Antioksidan Çalışmaları	79
3.9.1. Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi (FRAP metodu).....	79
3.9.2. Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi	79
3.9.3. FRAP indirgeme aktivitesi	79
3.9.4. Ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi.....	80
3.9.5. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi	80
3.9.6. Süperoksit anyon radikali (O_2^-) giderme aktivitesi.....	81
3.9.7. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi....	81
3.9.8. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali	
giderme aktivitesi.....	81
3.9.9. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme	
aktivitesi	82
3.9.10. Total antioksidan aktivite tayini	82
3.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in Etkilerinin	
Belirlenmesi	83
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	85

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	85
4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	85
4.1.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	85
4.1.3. hCA I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları	86
4.1.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları.....	87
4.1.5. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları	88
4.1.6. hCA I ve hCA II izoenzimleri hidrataz aktiviteleri üzerine Sinefrin'in inhibisyon etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları	89
4.1.7. hCA I ve hCA II izoenzimleri hidrataz aktiviteleri üzerine Fenilefrin'in inhibisyon etkisinin belirlenmesiyle ilgili sonuçlar	92
4.1.8. hCA I ve hCA II izoenzimleri esteraz aktiviteleri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları	94
4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	99
4.2.1. Fe ⁺³ -Fe ⁺² indirgeme kuvveti bulguları	99
4.2.2. Cu ⁺² -Cu ⁺ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular.....	100
4.2.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları.....	102
4.2.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	102
4.2.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları.....	104
4.2.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları	105
4.2.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları.....	107
4.2.8. Ferröz iyonları (Fe ⁺²) şelatlama aktivitesi ile ilgili bulgular	108
4.2.9. Bipiridil metal şelatlama bulguları	108
4.2.10. Total antioksidan aktivite bulgular.....	109
4.3. Asetilkolin esteraz enziminin aktiviteleri üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları.....	111
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	113
KAYNAKLAR	147
ÖZGEÇMİŞ	164

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
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)
EÜ	Enzim Ünitesi
E.C.:	Enzim kod numarası
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
I ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrant konsntrasyonu
LOO•	Lipit peroksit radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
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-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş-uyum modeli.....	2
Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değistircisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- 'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır.....	6
Şekil 1.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri.....	7
Şekil 1.4. hCA II izoenzimi tarafından CO_2 'in hidratasyon mekanizması.....	12
Şekil 1.5. Sülfamid ve sülfonamid türevlerinin açık yapıları.....	13
Şekil 1.6. Temsili üç farklı Zn^{+2} 'nin bazı temsili anyonlarla koordinasyon geometrileri.....	15
Şekil 1.7. hCA II izoenziminin tiyookzalon türevleri ile olan kataliz mekanizması.....	15
Şekil 1.8. Asetilkolinesterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu.....	17
Şekil 1.9. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı.....	18
Şekil 1.10. ROS oluşum yolları, Lipid peroksidasyonu, Glutasyon ve diğer antioksidanların rolü.....	23
Şekil 1.11. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu.....	30
Şekil 1.12. Kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlar.....	36
Şekil 1.13. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması.....	38
Şekil 1.14. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması.....	40
Şekil 1.15. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması.....	43
Şekil 1.16. α - ve β -Karoten, Likopen, Lutein gibi karotenoitlerin açık kimyasal yapıları.....	45
Şekil 1.17. BHT'nın serbest radikal oluşturma mekanizması.....	47
Şekil 1.18. Sinefrin'in açık yapısı.....	52
Şekil 1.19. Fenilefrin'in açık molekül yapısı.....	54
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	73
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	75

Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	85
Şekil 4.2. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na ₂ HPO ₄ pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH ₃ COO / 0,5 M NaClO ₄ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği	86
Şekil 4.3. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	87
Şekil 4.4. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	88
Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı	89
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 6 farklı Sinefrin konsantrasyonunda I ₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği	90
Şekil 4.7. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda [Sinefrin] değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Sinefrin] grafiği	90
Şekil 4.8. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ⁺² iyonuna fenolik bir antioksidan olan Sinefrin'in bir inhibitör bağlanma modeli	91
Şekil 4.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda I ₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği	92
Şekil 4.10. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda [Fenilefrin] değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Fenilefrin] grafiği.....	93
Şekil 4.11. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ⁺² iyonuna fenolik bir antioksidan olan Fenilefrin'in bir inhibitör bağlanma modeli.....	94
Şekil 4.12. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği.....	95

Şekil 4.13. hCA I izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	95
Şekil 4.14. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği	96
Şekil 4.15. hCA I izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	96
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği	97
Şekil 4.17. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	98
Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği	98
Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) Sinefrin ve Fenilefrin'in ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..	100
Şekil 4.21. Sinefrin ve Fenilefrin'in farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..	101
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin'in FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	102
Şekil 4.23. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	103
Şekil 4.24. Sinefrin ve Fenilefrin'in farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	103
Şekil 4.25. ABTS ⁺⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS ⁺⁺ için hazırlanan standart grafik	104
Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin'in (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması	105
Şekil 4.27. DMPD ⁺⁺ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik	106

Şekil 4.28. Sinefrin ve Fenilefrin'in (10-30 µg/ml) konsantrasyonundaki DMPD ⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması	106
Şekil 4.29. Sinefrin ve Fenilefrin'in çözeltisinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması	107
Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) Sinefrin ve Fenilefrin'in ferröz iyonları (Fe ⁺²) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.	108
Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) Sinefrin ve Fenilefrin'in bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması .	109
Şekil 4.32. 10 µg/ml konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin'in total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.....	110
Şekil 4.33. Asetilkolin esteraz enziminin Asetilkolin esteraz yöntemiyle ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği	111
Şekil 4.34. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	111
Şekil 4.35. Asetilkolin esteraz enziminin beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği.....	112
Şekil 4.36. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	112
Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ⁺² iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli.	120
Şekil 5.2. L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe ⁺²) arasında öne sürülen metal şelatlama mekanizması.....	128
Şekil 5.3. Sinefrin'in ferröz iyonu (Fe ⁺²) ile oluşturduğu muhtemel kompleks	129
Şekil 5.4. Fenilefrin'in ferröz iyonu (Fe ⁺²) ile oluşturduğu muhtemel kompleks	129

Şekil 5.5. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalini giderilmesi.....	132
Şekil 5.6. Konjuge gruplara sahip askorbik asit'in DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon	133
Şekil 5.7. Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH· radikalini söndürmesi ve L- Adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu	134
Şekil 5.8. Mono fenoller için muhtemel DPPH· radikali giderme mekanizması.....	135
Şekil 5.9. Sinefrin ve Fenilefrin moleküllerinin DPPH· radikalini söndürmesi mekanizması.....	135
Şekil 5.10. ABTS'nin $K_2S_2O_8$ ile oksidasyonu sonucu ABTS radikalini ($ABTS^{\cdot+}$) oluşum mekanizması	136
Şekil 5.11. Kararlı bir radikal olan $DMPD^{\cdot+}$ 'nin oluşum ve giderilme mekanizması ..	137
Şekil 5.12. NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT^{+2} 'yi formazana yükseltmesi.....	139
Şekil 5.13. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT^{+2} 'yi formazana yükseltmesi	140
Şekil 5.14. Otoksidasyon sonucu α -linoleik asitin endoperoksite dönüşümü	141

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. CA katalizlediği reaksiyonlar.	9
Çizelge 1.2. CA izoenzimlerinin ilgili oldukları hastalıklar ve diğer izoenzimlerle ilişkisi	10
Çizelge 1.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri ve sülfonamidlere ilgisi	14
Çizelge 1.4. Doğal ve sentetik antioksidanların avantaj ve dezavantajları.....	33
Çizelge 1.5. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri	34
Çizelge 1.6. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri	35
Çizelge 1.7. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması	39
Çizelge 1.8. Flavonoidlerin molekül yapıları	41
Çizelge 1.9. Hidroksibenzoik ve Hidroksisünamik asit türevleri	50
Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği	84
Çizelge 4.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizattan ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları	87
Çizelge 4.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin'in %50 inhibisyona sebep olan Sinefrin konsantrasyonları IC ₅₀ değerleri	91
Çizelge 4.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin'in %50 inhibisyona sebep olan Fenilefrin konsantrasyonları IC ₅₀ değerleri	94
Çizelge 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K _i değeri ve inhibisyon türleri	97
Çizelge 4.5. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrinin K _i değerleri ve inhibisyon türleri.....	99
Çizelge 4.6. Sinefrin ve Fenilefrin'in 20 µg/ml konsantrasyonunda indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla mukayesesi.....	101
Çizelge 4.7. Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinin DPPH·, ABTS ⁺ , DMPD ⁺ ve O ₂ ⁻ radikali giderme ve (Fe ⁺²) metal şelatlama, bipiridil metal şelatlama	

aktivitelerinin IC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.	107
Çizelge 4.8. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in K _i değeri ve inhibisyon türleri.....	112
Çizelge 5.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları	116
Çizelge 5.2. hCA I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları IC ₅₀ değerleri	118
Çizelge 5.3. hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrinin ortalama K _i değerleri ve IC ₅₀ değerleri.....	119
Çizelge 5.4. Sinefrin ve Fenilefrin'in 20 µg/ml konsantrasyonunda indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla mukayesesi.....	125
Çizelge 5.5. Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanlara ait DPPH•, ABTS ^{•+} , DMPD ^{•+} , O ₂ ^{•-} giderme, ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili IC ₅₀ (µg/ml) değerleri.....	130
Çizelge 5.6. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in K _i değeri ve inhibisyon türleri.....	145

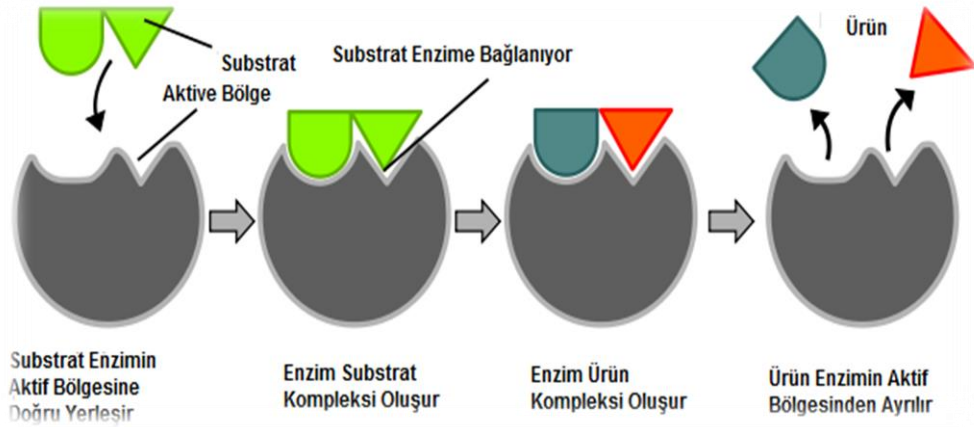
1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı metabolizmasında gerçekleşen reaksiyonları hızlandıran ve büyük bir kısmı protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Bazı katalitik RNA molekülleri hariç, enzimlerin tamamı protein yapısında olan maddelerdir. Kimyasal reaksiyonları hızlandıran bileşiklere katalizörler denir. Başka bir ifadeyle enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve metabolizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandırarak hiçbir yan ürün oluşturmadan %100'lük bir verim oluşmasını sağlarlar (Berg *et al.* 2014). Ayrıca düzenleyici pek çok özellikleri de bulunan enzimler, belirli şartlar altında ve yüksek seçiciliğe sahip reaksiyonların gerçekleşmesini de sağlarlar. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş gurubunu oluştururlar (Lehninger 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014)

Hücrelerde bileşenlerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması ve hücre solunumu gibi hayatsal faaliyetler metabolik reaksiyonların sonucunda meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin katalitik etki gösteren kısmı proteinin polipeptit zinciridir. Birçok enzim, katalitik etki gösterebilmesi için protein yapısında olmayan başka gruplara da ihtiyaç duyarlar. Bunlar metal iyonu, protein olmayan kompleks bir organik bileşik ya da her ikisi olabilir. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak "kofaktör" adı verilir. Kompleks organik bileşik, enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve ayrılmıyorsa "prostetik grup" çok sıkı bağ yapmamış ve ayrılabiliriyorsa "koenzim" adını alır. Koenzimi ile birleşik halde bulunan Apoenzim-Koenzim bütününe "holoenzim" adı verilir. Yani holoenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdadır. Koenzimlerin yapısında çoğunlukla vitaminlerin aktif formları bulunmaktadır. Vitaminler bu nedenle, koenzimlerin yapısına girdiği için metabolik olayların enzimler aracılığıyla kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için ve organizma açısından son derece önem arz etmektedirler (Lehninger 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014).

Enzim ile substratın birbirine bağlanması ile ilgili iki model ileri sürülmüştür. 1894'te Emil Fischer tarafından ileri sürülen anahtar- kilit modelinde, substrat enzimin aktif bölgesine bağlanırken yapısal olarak uygun şekilde anahtar kilit gibi birbirine bağlandığı kabul edilir. Daniel Koshland tarafından 1958'de ileri sürülen indüklenmiş-uyum modelinde ise; enzim substratı olmadığına serbest halde bulunur. Substrat varlığında, enzim substratını katalize uygun biçimde bağlayacak şekilde değişir. Enzimin bağlandığı substrat parçalandığında ve reaksiyon tamamlandığında enzim değişmeden tekrar ayrılır (Nelson and Cox 2004; Megep 2006).



Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş-uyum modeli

Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyonu aynı olan enzimlere “izoenzim” veya “izozim” denilmektedir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı alakaları farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında;

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

sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı bölgelerine de yerleşebilirler (Devlin 2002). Günümüze kadar karbonik anhidraz

enziminin 16 farklı izoenzimini (Çetinkaya *et al.* 2012; Akıncioğlu *et al.* 2013) ve beş farklı laktat dehidrogenaz enziminin bulunduğu tespit edilmiştir (Ishikawa *et al.* 1995).

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir pH aralığı vardır ve bu pH “optimum pH” olarak adlandırılmaktadır. Genellikle enzimler pH'nin 7 olduğu ortamlarda en iyi çalışırken, bazı enzimler bu durum farklılık gösterir. Örneğin, insanda bulunan proteolitik enzimlerden pepsin pH 2.0'de, tripsin pH 8.5'ta maksimum aktivite gösterirler. Ortamdaki substrat miktarı da reaksiyonun hızını etkiler eğer yeterli substrat varsa, enzim konsantrasyonu arttıkça tepkimenin hızı da artar, ancak tepkime hızı maksimum noktaya eriştikten sonra sabit kalır. Çünkü enzim substrata doymuştur. Bazı enzimler sadece bir tek substrata etki ederken, bazı enzimler ise bir grubu oluşturan substratlara etki ederler. Ayrıca bazı enzimler de stereo spesifiklik vardır. Bu enzimler substratlarının stereo izomerlerine etki etmezler. Proteolitik enzimlerin etki özgüllüğünü tayin eden özellik, substrat molekülündeki amin asitlerin özel konfigürasyonları ve diziliş durumlarıdır. Enzimlerin spesifiklik özelliği kataliz ettikleri belirli reaksiyonlar ile alakalı özellikleridir (Keha and Küfrevioğlu 2005). Enzimler için çeşitli spesifiklikler tanımlanmıştır;

Mutlak spesifiklik: Bu özellik enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalizler. Enzimlerin çoğu mutlak spesifiklik özelliğine sahiptirler.

Grup spesifikliğı: Grup spesifikliğı olan bir enzimin, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Örneğin glikozidazlar glikozidler üzerine, alkol dehidrogenaz ise alkol üzerine etkilidir.

Bağ spesifikliğı: Bir enzimin proteinlerin peptid bağı, karbohidratların glikozid bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir. Örneğin kimotripsin, peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli bir enzimdir.

Stereo spesifiklik: Bir enzimin yalnızca D veya L izomerleri gibi belli optik izomerlere etkili olması özelliğidir. Örneğin arginaz sadece L arginini hidroliz eder ancak D arginin izomerine etki etmez.

Hücre içindeki çeşitli metabolik aktiviteler hücrenin farklı organellerinde gerçekleşmektedir. Buna göre enzimlerin hücre içi dağılımları da farklılık gösterir. Örneğin glikoliz olayı, hücrenin sitoplazmasında meydana gelirken solunum zinciri ise mitokondrielerde gerçekleşir. Dolayısıyla glikolizdeki enzimler sitoplazmada, solunum zincirinde görevli enzimler ise mitokondride lokalize olmuşlardır (Keha and Küfrevioğlu 2005).

Hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere “Hücre Dışı Enzimler”, sentezlendikleri hücre içinde kalarak etkisini gösteren enzimlere ise “Hücre İçi Enzimler” denilmektedir. Genel olarak enzimler hücre içerisinde yapılırlar ve yapıldıktan sonra büyük çoğunluğu hücre içi metabolik olaylar için kullanılır. Ancak pepsin ve tripsin gibi bazı sindirim enzimleri, yapıldıkları hücre dışına salınırlar. Hücrede yapıldıktan sonra dışarı salınan proteolitik enzimleri, yapıldıkları hücreye zarar vermemeleri için “proenzim” veya “zimojen” denilen formlarda bulunurlar. Sonra zimojen aktifleşmesi ile aktif enzim haline dönüşürler. 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.

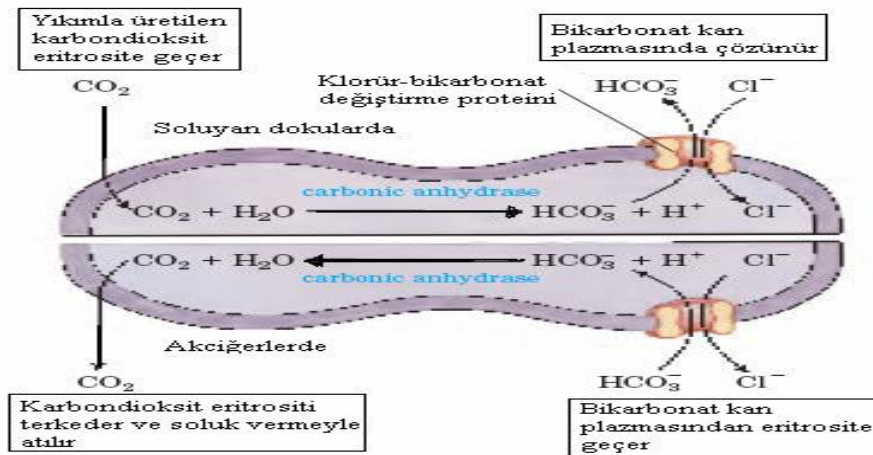
Enzimler ile ilgili en çok araştırma yapılan alanlardan biri de enzim inhibisyonudur. Enzim-substrat kompleksini sağlayan bölge enzimin belirli bir bölgesini içermektedir. Enzimler büyük, ancak bunun yanında substratlar küçük moleküllerdir. Bu durumda enzimlerde substratın bağlandığı enzim tarafından değişikliğe uğratıldığı ve başka bir bileşiğe dönüştürüldüğü bir bölge vardır. Bu bölgeye “aktif bölge” adı verilmektedir. Aktif bölgede en az bir aminoasit spesifik bir rol oynamaktadır (Keha and Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014).

Birçok enzimin aktiviteleri özgül moleküllerin, iyonların bağlanması ile inhibe edilir. Biyolojik sistemlerde enzimlerin inhibe edilmesi ise temel kontrol mekanizmalarıyla olur. Allosterik enzimlerin regülasyonu bunlara örnek verilebilir. Bunun yanında birçok ilaç, toksik ajan da enzimleri inhibe ederler. İnhibisyon olayı enzimin kataliz mekanizmasının açıklanmasında da kullanılır (Berg *et al.* 2014). Kısaca enzim-substrat kompleksinin oluşmasını engelleyerek, enzim aktivitesini azaltan maddelere “Enzim İnhibitörleri”, bu olaya ise “Enzim İnhibisyonu” denir. Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörler etki ederek katalizleme olayını olumlu ya da olumsuz etkileyebilirler. Enzimler protein yapısındadır ve bunun için ortamdaki sıcaklık değişmelerinden etkilenir. Enzimler belirli sıcaklıkta çalışırlar. Bir enzimin en iyi çalışabileceği sıcaklığa “Optimum Sıcaklık” denir. Daha düşük ve daha yüksek sıcaklık, enzimlerin çalışma hızını olumsuz etkiler. Enzimlerin yapısı yüksek sıcaklıkta tamamen bozulurken, düşük sıcaklıkta bozulmaz. Bundan dolayı dondurarak besin maddeleri saklanılabilmektedir (Keha and Küfrevioğlu 2005; Berg *et al.* 2014).

1.2. Karbonik Anhidraz

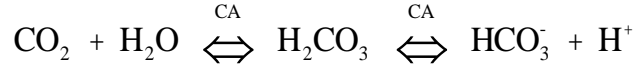
Karbonik dioksit (CO_2) aerobik metabolizmanın son ürünüdür. Memelilerde CO_2 kana salınarak akciğerlere taşınır ve solunum yoluyla uzaklaştırılır. Alyuvarlarda bulunduğu süre içerisinde H_2O ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonun ürünü orta derece kuvvetli asit olan ve proton kaybederek bikarbonat iyonuna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

CA (karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1), bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyon içeren bir metaloenzimdir. CA 1932 yılında keşfedilmesinin ardından 10 yıl içerisinde Zn iyonu içerdiği bulunmuştur. Enzimimlerin ihtiva ettikleri metal iyonları kimyasal aktiviteyi arttıran birçok özelliğe sahiptirler. Bunlar; pozitif yüklerinin olması, kinetik olarak stabil bağ oluşturabilme yeteneklerinin olması ve bazı durumlarda birden fazla yükseltgenme halinde kararlı kalabilme özelliğidir. İlk olarak, sığır eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 'in hidratasyonunu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2001; Göçer and Gülçin 2013; Akıncıoğlu *et al.* 2013).

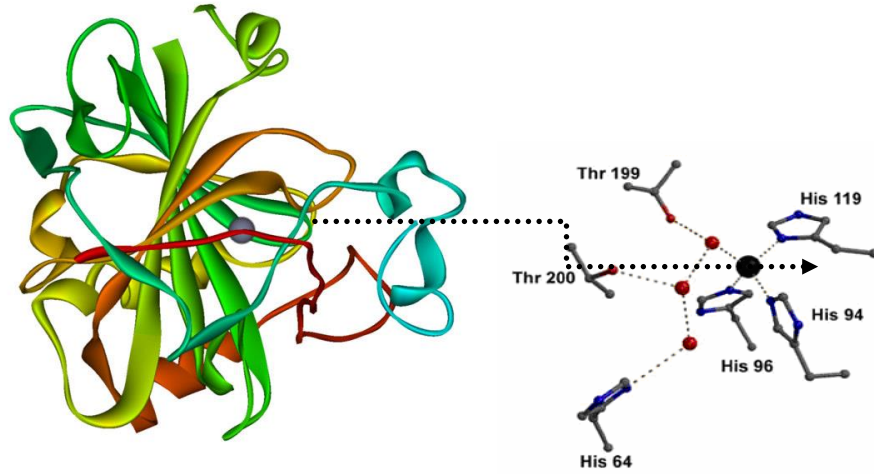


Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- 'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger 2005).

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



CA asıl olarak solunum sırasında oluşan CO_2 'in suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan atılmasını sağlamakla beraber, asit baz dengesini, iyon değişimini, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik olayda da rol alan çok önemli bir enzimdir. Karbonik anhidraz, CO_2 molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri ve ayrıca siyanatın (ROCN) karbamata (H_2NCO_2) veya ürenin ($\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$) siyanamite (CH_2N_2), aldehitin (RCHO) geminal diol ($\text{R}_2\text{C(OH)}_2$) hidratasyonu reaksiyonları da bu enzim tarafından katalizlenir.



Şekil 1.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96 ve His 119)

*Büyük küre Zn^{+2} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir

CA enzimi, genel olarak metabolik CO_2 'in transportunu sağladığı gibi, birçok dokuda da proton (H^+) ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokulara örnek olarak böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi verilebilir. Çalışmalar devam ettikçe sonraki

yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, kaslar, tükürük bezleri, prostat, sinir miyelin kılıfı, pankreas, beyin ve endometrium dokularından, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi yaklaşık 30 KDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

Şimdiye kadar CA enziminin 16 tane izoenzim tespit edilmiştir (Pastarekova *et al.* 2004; Beydemir and Gülçin 2004; Çetinkaya *et al.* 2012; Akıncıoğlu *et al.* 2013). Karbonik anhidraz izoenzimleri yapı, görev ve lokalizasyonlarına göre farklı sınıflara ayrılmıştır. Bu izoenzimlerden beş tanesi sitozolde (CA I, II, III, VII ve XIII), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), bir tanesi mitokondride (V), bir tanesi salgı enzimi (CA VI) ve 3 tanesinin de nonkatalitik (CA VIII, X ve XI) olduğu tespit edilmiştir (Tashian 1992; Dodgson 1991; Fujikawa *et al.* 1999; Supuran *et al.* 2003; Beydemir and Gülçin 2004; Çetinkaya *et al.* 2012; Akbaba *et al.* 2013a). Canlılarda yaygın olarak bulunan CA enzimi bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır (Göçer and Gülçin 2011). CA ayrıca bitkilerde fotosentez sırasında önemli görevleri vardır. CA, bitkilerde çoğunlukla kloroplastlarda bulunurken, az miktarda da sitozolde bulunur. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve elektron transport zincirine elektron vericisi olan bikarbonat (HCO_3^-) iyonlarını sağlamış olur.

Kloroplastlarda bulunan CA, tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde, bağlı CA olarak, stroma sıvısında ise çözülmüş CA olarak bulunmaktadır. Bitki CA enzimlerinin fonksiyonları lokalizasyonu ile yakından alakalıdır. En yaygın olan izoformları CA I ve II disülfid bağlarına ya da fosfat gruplarına sahip değildir ancak diğer bütün izoformları disülfid bağlarına ve fosfat gruplarına sahiptir. CA II en yaygın kullanılan oldukça ucuz bir enzimdir. CA II, diğer izoenzimlerine nispeten daha kolay saflaştırılır CA I ve II izoenzimleri üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak

bulunan enzimlerdir (Akincioglu *et al.* 2013). İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer hCA I'e oranla daha azdır. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. hCA II ve IV izoenzimleri ise göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda bol miktarda bulunmaktadır. Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmiş bunun sonucunda da izoenzimlerin varlığı zamanla tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO_2 'i, HCO_3^- 'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO_3^- 'ın CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Göçer and Gülçin 2011). hCA I izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001). CA'nın katalizlediği bazı reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Supuran and Scozzafava 2001).

Çizelge 1.1. CA katalizlediği reaksiyonlar (Supuran and Scozzafava 2001).

1	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
2	$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
3	$\text{NH}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
4	$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH}(\text{OH})_2$
5	$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
6	$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
7	$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}^*$
8	$\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
9	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}^{**}$

*Ar: 2,4-Dinitrofenil **R= Me veya Ph.

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

Çizelge 1.2. CA izoenzimlerinin ilgili oldukları hastalıklar ve diğer izoenzimlerle ilişkisi (Alterio *et al.* 2012).

İzoenzimler	İlgili olduğu hastalık	Diğer hCA izoenzimleriyle olan ilişkisi
CA I	Retinal ve beyin ödemi	Bilinmiyor
CA II	Glukoma	hCA I
	Ödem	Bilinmiyor
	Epilepsi	Bilinmiyor
	Mide bulantısı	Bilinmiyor
CA III	Oksidatif stres	Bilinmiyor
CA IV	Glukoma	hCA I
	Retinitis pigmentosa	Bilinmiyor
	Felç	Bilinmiyor
CA VA/VB	Obezite	hCA I ve II
CA VI	Karsinogenez	hCA II
CA VII	Epilepsi	Bilinmiyor
CA VIII	Nörodejenerasyonu	Bilinmiyor
	Kanser	Bilinmiyor
CA IX	Kanser	hCA I ve II
CA XII	Kanser	hCA I ve II
	Glukoma	Bilinmiyor
CA XIII	Kısırlık	Bilinmiyor
CA XIV	Epilepsi	Bilinmiyor
	Retinopati	Bilinmiyor

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

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır.

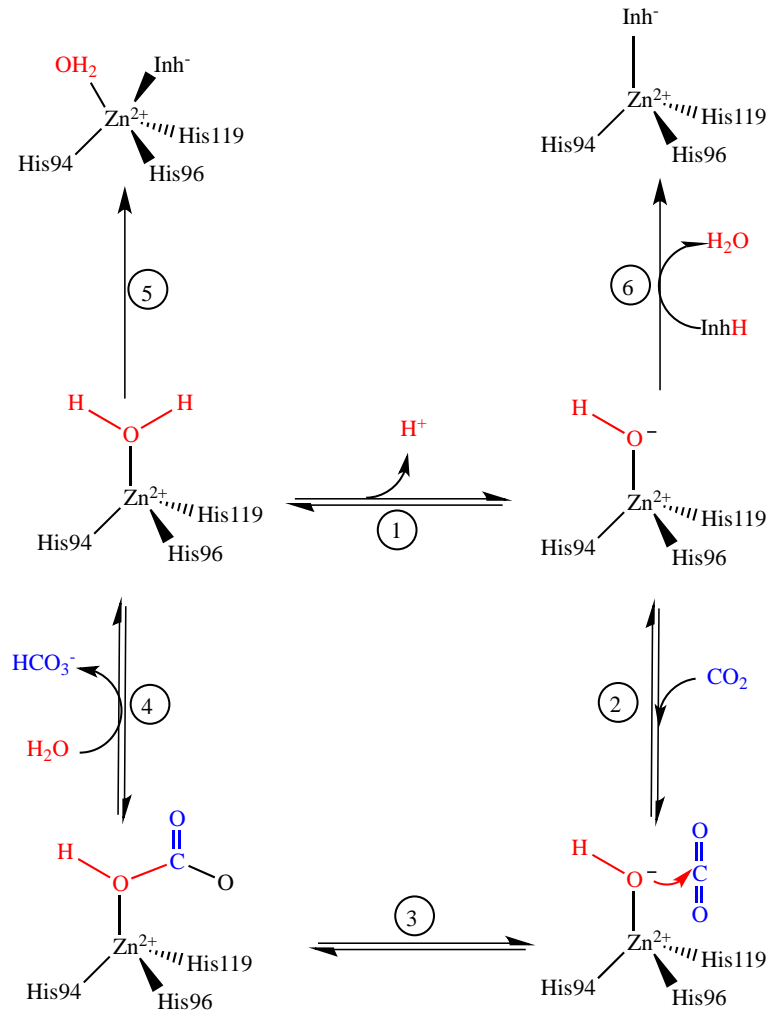
hCA V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Karbamoil Fosfat Sentetaz-I ve Piruvat Karboksilaz enzimlerine sıralı olarak HCO_3^- iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenezde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu izoenzim ayrıca lipogenez olayında da etkili olmaktadır (Hazen *et al.* 1996). Tükrük bezinde CA enzimi olarak CA VI ve VII izoenzimi vardır. Tükrüğün pH dengesini hCA VI izoenziminin sağladığına bildirilmiştir. hCA VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Lakkis *et al.* 1996).

CA enziminin hidrataz aktivitesi reaksiyonu katalizlemesinin yanında, elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidrasyonu, pirüvik, sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları da katalizlemektedir (Jabusch and Deutsch 1989; Lindskog 1997).

Karbonik anhidraz CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'sına göre HCO_3^- ve CO_3^{2-} iyonları arasında dönüşümlerini katalizlemektedir (Göçer and Gülçin 2013). Düzlemsel bir molekül olan CO_2 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır. CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn^{+2} iyonunun büyük etkisi vardır (Lindskog 1997).

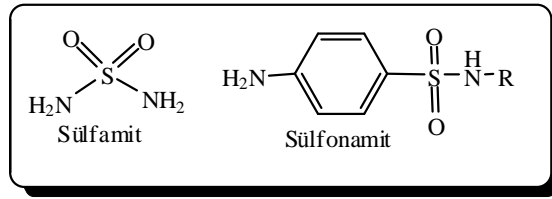
Yapılan X-ray kristalografi çalışmalarının sonuçları, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96 ve His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında yer aldığını göstermektedir. Çinko bağlı H_2O , Glu 106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr 199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilik karakterini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki CO_2 'e doğru hareket etmektedir (Arslan 1994; Akbaba *et al.* 2013). Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (1. Reaksiyon). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (2. Reaksiyon). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (3. Reaksiyon). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır (4. Reaksiyon) ve bu

durumda enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Lindskog 1997; Akbaba *et al.* 2013; Akincioğlu *et al.* 2013). Ana bileşik 1'in rejenerasyonu için aktif kısımdan çevreye bir proton transferi oluşur. Bu duruma ya çözeltinin aktif kısmındaki proton mekiği ya da ortamda mevcut tampon yardımcı olur (Scozzafava and Supuran 2002; Çetinkaya *et al.* 2012). CA enziminin CO_2^- hidrasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi Şekil 1.4'de verilmiştir (Lindskog 1997; Akincioglu *et al.* 2013). CA enzimi, biyofiziksel, biyoanalitik, biyoorganik ve özellikle ilaç dizaynı çalışmalarında elverişli bir enzimdir. CA izoenzimleri inhibisyon çalışmalarında ve protein-ligand bağlanmalarının incelendiği biyofiziksel çalışmalarda ve bunun gibi birçok sebep için önemlidir. CA, tek zincirli protein yapısına sahip olup, ortalama bir moleküler ağırlığına sahiptir (Akincioglu *et al.* 2013).



Şekil 1.4. hCA II izoenzimi tarafından CO_2 'in hidrasyon mekanizması

Bu enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu nedenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip His 64 aktivitede önemlidir (Sly and Hu 1995). İnhibisyon etkilerini ya CA'nın aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonuna bağlı su molekülü ile yer değiştirerek ya da Zn^{+2} iyonuna ilave bir ligand bağıyla bağlanarak gösteren bu inhibitörler, mononegatif anyonlar (Halojenürler, N_3^- , NCO^- , SCN^- ve CN^- gibi), ve sülfonamidler gibi bazı nötral organik bileşikler enzime sıkıca bağlanarak dönüşümlü inhibisyona neden olmaktadır. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı asetazolamittir. Farmakokinetik özelliklerinden dolayı glukom ve epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Akincioğlu *et al.* 2013).



Şekil 1.5. Sülfamid ve sülfonamid türevlerinin açık yapıları

Sülfonamid türevleri CA'nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir. Alkoller, organik solventler ve amit bileşikleri gibi diğer nötral inhibitörler ise enzime gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon meydana getirirler (Liang and Lipscom 1991).

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $R-SO_2NH_2$ kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grupları, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemleridir. hCA II için K_i sabitleri 10^{-5} ile 10^{-10} arasında değişmektedir. Sülfonamidlerin en belirgin özelliklerinden birisi, kolaylıkla iyonik yapı kazanmalarındır. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle $R-SO_2NH$ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci

olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur (Maren 1987; Arslan 2001).

Çizelge 1.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri ve sülfonamidlere ilgisi (Lindskog 1997; Scozzafava and Supuran 2002).

İzoenzimler	Katalitik Aktivite	Hücrelerdeki Yerleşimi	Sülfonamidlere İlgisi
CA I	Düşük	Sitozol	Orta
CA II	Yüksek	Sitozol	Çok Yüksek
CA III	Çok Düşük	Sitozol	Çok Düşük
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı	Yüksek
CA V	Orta-Yüksek ^a	Mitokandriyal	Yüksek
CA VII	Yüksek	Sitozol	Çok Yüksek
CARP VIII^b	Akatalitik	Muhtemelen Sitozol	*
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı	Yüksek
CARP X^b	Akatalitik	Bilinmiyor	*
CARP XI^b	Akatalitik	Bilinmiyor	*
CA XII	Aktif	Membrana bağlı	Bilinmiyor
CA XIII	Muhtemelen Yüksek	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı	Bilinmiyor

^a: pH 7,4'te orta aktivite gösterirken, pH 8,2 da yüksek aktivite gösterir.

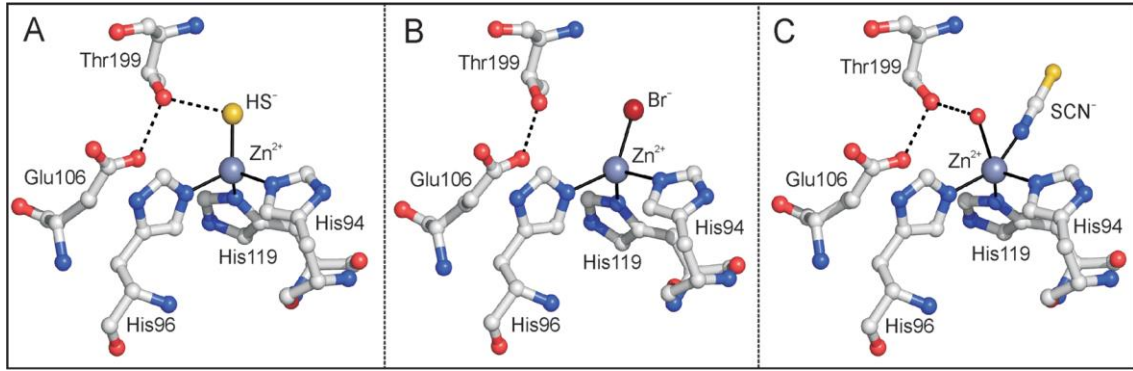
^b: CARP (Karbonik anhidraz ilgili protein)

*: CARP izoenzimleri Zn⁺² ihtiva etmediklerinden sülfonamidlere ilgisi tespit edilememiştir.

CA inhibitörleri, sistematik olarak verildiklerinde akut glokomların kısa süreli tedavisinde fayda sağlarlar bile, uzun süreli kullanımlarda genellikle ileri derecede görme kaybı riski taşıyan hastalar için potansiyel oluşturduğu bildirilmiştir. Miyotiklerle kombine edileceklerinde gayet iyi ilave etki oluştururlar (Orağlı 2001).

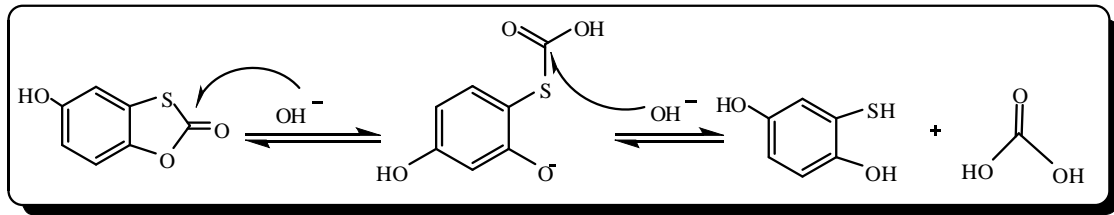
Sülfonamidlerin yanında son yıllarda hCA izoenzimleri için inhibitör arayışına girilmiş ve özellikle ilaç dizayn çalışmalarında kullanılmak üzere inhibitör sentezleme ve geliştirme ile ilgili çalışmalar artmıştır. Gülçin ve grubu yapılan bu çalışmalarda yapılmış literatürde olan ya da henüz yeni, daha önce sentezlenmemiş birçok inhibitör potansiyelli bileşikler bulunarak güçlü inhibitörler literatüre kazandırılmıştır (Akbaba *et*

al. 2013a; Akıncıoğlu *et al.* 2013; Çetinkaya *et al.* 2012). Yapısal olarak çinko bağlayıcı inhibitörler üreatlar ve hidrosamatlar, tiyol türevleri, sülfonamidler, sülfamat/sülfamid türevleri, sülfamid ve sülfamid içeren şeker türevleri olarak örneklendirilebilirler. Temsili üç farklı Zn^{+2} 'nin bazı temsili anyonlarla koordinasyon geometrileri, -SH, -Br, -SCN gruplarıyla olan ilişkileri aşağıda verilmiştir (Alterio *et al.* 2012).



Şekil 1.6. Temsili üç farklı Zn^{+2} 'nin bazı temsili anyonlarla koordinasyon geometrileri, -SH, -Br, -SCN gruplarıyla olan ilişkileri.

Ayrıca tiyookzalon türevlerinde kataliz mekanizması örnek olarak verilebilir (Alterio *et al.* 2012).



Şekil 1.7. hCA II izoenziminin tiyookzalon türevleri ile olan kataliz mekanizması

1.3. Esteraz Enzimi

Esteraz, esterleri bir su molekülü ile kimyasal tepkimeye sokarak onlardan asit ve alkol molekülü üreten, hidrolaz tipi bir enzimdir. Çeşitli esteraz tipleri vardır, bunların substrat spesifisiteleri, protein yapıları ve biyolojik işlevleri farklıdır (Oakeshott *et al.*

1993). Esteraz enzimleri vermiş oldukları reaksiyonlara göre dört ana grupta incelenebilirler bunlar;

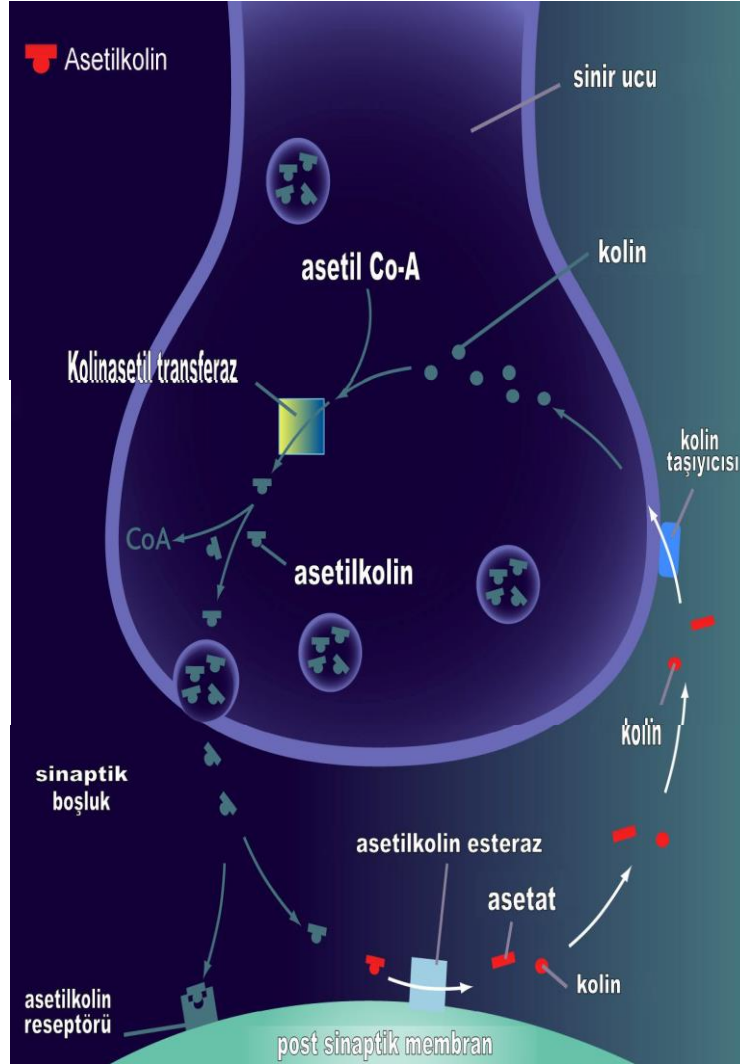
- **Asetil esterazlar:** Bu grup esterazlar genellikle Asetik asit gibi alifatik substratlar üzerine etkilidirler.
- **Aril esterazlar:** Bu grup esterazlar sülfidril grubu taşıyan inhibitörler tarafından inhibe edilirler ve genellikle aromatik substratlar üzerine etkilidirler.
- **Karboksil esterazlar:** Organofosfor'lar (OF) tarafından inhibe edilirler ve asetikasitten daha uzun olan alifatik gruplar üzerine etkilidirler
- **Kolin esterazlar:** OF ve esterin sülfat inhibitörleri tarafından inhibe edilirler. Alifatik esterlerin yanında birde kolin esterleri substrat olarak seçerler.

Esterazlara, asetil fonksiyonel gruplarını kesen Asetilesteraz (EC.:3.1.1.6), asetilkolin nörotransmitterini etkisizleştiren Asetilkolinesteraz (EC.:3.1.1.7), geniş substrat spesifitesine sahip olan, kan plazması ve karaciğerde bolca bulunan Kolinesteraz (EC.:3.1.1.8) ve meyve sularını berraklaştırılmasında kullanılan Pektinesteraz (EC.:3.1.1.11) gibi örnekler verilebilir

1.4. Asetilkolinesteraz Enzimi

Yaşamımızın her anında, sürekli olarak enzimlere ihtiyacımız olduğu bilinen bir gerçektir. Sadece bir adım atabilmek için dahi moleküler seviyede binlerce reaksiyon ve metabolik faaliyet gerçekleşmektedir. Buna sebep olan enzimlerdir ve her biri canlı için oldukça önemlidir. Asetilkolinesteraz (AChE; EC.:3.1.1.7) da bu enzimlerden biridir. Asetilkolinesteraz sinir ucu önünde biriken kimyasalları parçalayarak oradan uzaklaştırır. Yani bir anlamda ortalığı süpürür. Bu sayede, elektron taşıyıcıların önü

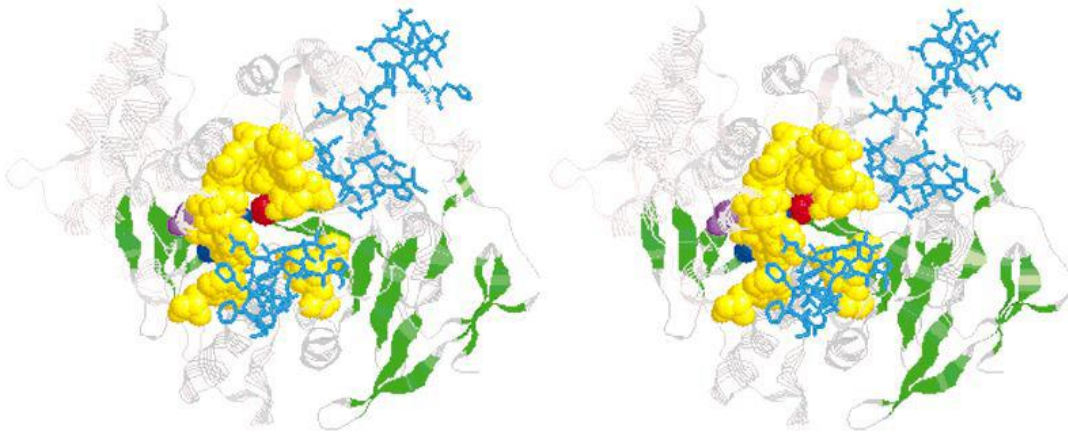
devamlı olarak açılarak sinir iletimde herhangi bir aksaklık meydana gelmez (Göçer *et al.* 2013).



Şekil 1.8. Asetilkolinesterazın sinir hücrelerindeki fonksiyonu (Başkurt 2010)

AChE metabolizmada ACh'yi (Asetilkolin) hidrolizleme işleminin katalizinde görev alan enzimdir ve oldukça önemlidir. ACh, nörotransmitter madde olmakla beraber, biyolojik açıdan oldukça önemlidir. Onun güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur (Nacmansohn 1952). ACh'nin görevi ilk olarak araştırmacılar tarafından sadece sinir uçlarından etkilediği organa ya da sinir ucundan diğer bir sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevi olduğu zannedilse de, son yıllarda yapılan çalışmalar bunun

böyle olmadığını ve ACh'nin ayrıca sinir hücreleri ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu bulunmuştur (Wilson and Nachmansohn 1954; Carlson 1992). Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik olan ve olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip olan enzimlerdir. Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesini ve farklılaşmasını bunula birlikte çeşitli etkenler sonucunda oluşan strese yanıt vermede rol oynarlar (Wilson and Nachmansohn 1954; Carlson 1992). Kolinesterazlar iki gruba ayrılırlar. İki grup substrat özgüllüğü, doygun substrat varlığındaki davranışları ve inhibitörlere karşı gösterdikleri özelliklere göre yapılmıştır. Bu iki tanımlama ise, gerçek kolinesteraz AChE (AChE: E.C.3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BuChE: E.C.3.1.1.8), spesifik olmayan kolinesteraz (psödokolinesteraz) olarak yapılmıştır (Neşe 2003). AChE; beyin, sinir hücrelerinde, kasta ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonda bulunur, BuChE ise; serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur özellikle enzim hayvanlar âleminde de oldukça yaygındır. (Wilson and Nachmansohn 1954; Allam *et al.* 2007).



Şekil 1.9. AChE enziminin literatürdeki üç boyutlu yapısı (Oakeshott *et al.* 1999)

AChE; aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından başka bir enzimde bulunmayan özelliklere sahiptir (Şekil 1.10). AChE enziminin üç boyutlu yapısı ilk kez Oakeshott ve arkadaşları tarafından detaylı bir şekilde aydınlatılmıştır (Oakeshott *et al.* 1999).

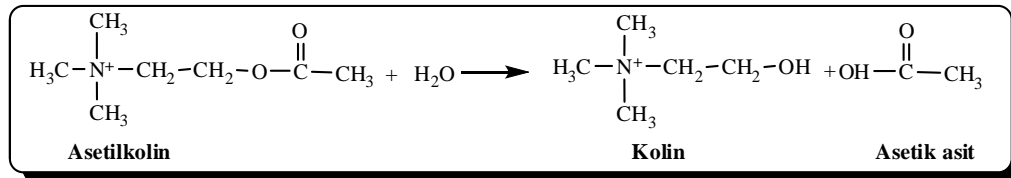
Enzim α -heliks ve β tabakalarından oluşur. Sarı renk ile gösterilmiş 14 aromatik rezidü aktif merkezin çevresinde sıralanmışlardır. Aktif merkezde bulunan Serin, Glutamat ve Histidin amino asitleri katalitik üçlüyü oluşturmaktadır. Şekil 1.10'de görüldüğü gibi molekülün yüzeyinde aktif merkezi çevreleyen substrat bağlanma bölgeleri mavi renk ile gösterilmiştir (Oakeshott *et al.* 1999).

İlk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından saflaştırılan bu enzim, diğer esterazlardan asetilkolini hidrolizemesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilerek saflaştırılmaktadır. Bu nedenle AChE olarak adlandırılır (Phillips 1996). Düşük konsantrasyonda ki substrat AChE'nin aktif bölgesindeki proteinin çok az bir miktarı ile dahi reaksiyona girer. Normal substratın makro molekül olduğu durumlarda bile substratın küçük bir kısmının enzimle reaksiyona girdiği görülür. AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil olarak rol oynar. İkinci basamakta ise; enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür (Demir and Turkoglu 2005). AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır. Diğer taraftan ACh ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BuChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir (David *et al.* 2004; Temel 2008).

AChE nörotransmitter bir madde olarak görev yapan ACh'nin kolin ve asetik asite hidrolizinden sorumludur (Vale 1998; Pope *et al.* 2005). AChE aktivitesinin engellenmesi durumunda parasempatik, sempatik motor sinirler ve merkezi sinir sistemi çalışmasında aksaklıklar oluşur (Lotti 1995).

AChE en önemli inhibitörleri OF'lu pestisidlerdir ve bu pestisidler enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsüne kovalent bağlanarak nörotransmitterin doğal katabolizmasını engeller ve bu durum inhibisyona sebep olur (Dailianis *et al.* 2003). Enzimin inhibe olduğu durumlarda ACh birikimi sonucu, sinapslar ve nöromuskular boşluklarda aktivasyon arttığı için, kolinerjik sistem uyarısı yoğunlaşır (Soreq and Zakut 1993; Hazarika *et al.* 2003; Tuovinen 2004).

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



Başka bir ifadeyle, hücreye giren Ca^{+2} sekonder haberci olarak görev yaparak veziküllerde birikmiş olan ACh presinaptik boşluğa ekzositoz yoluyla boşalmasını sağlar. Asetilkolin post sinaptik membranda bulunan reseptörüne bağlanır ve bu kanalın açılmasını sağlayarak uyarının post sinaptik hücreye geçişini sağlar. Uyarı iletildiğinde AChE ACh'yi asetat ve koline ayırır. Kolin tekrar kullanılmak üzere presinaptik hücreye geri döner (Nelson and Cox 2005).

Alzheimer hastalığı genel olarak son zamanlarda çok yaygın olan bir demans hastalığıdır ve nörodejenaratif bir rahatsızlıktır. Bu hastalık belleğin fonksiyon

bozukluğu olarak karakterize edilmiştir. Asetilkolin düzeyinin beyindeki azalması Alzheimer hastalığının biyokimyasal anlamdaki en büyük değişikliğidir (Akincioğlu *et al.* 2013). Alzheimer hastalığı bir tip demans hastalığıdır. Demans hastalığı; sosyal ve öğrenme işlevlerde azalmanın sonucu olarak bellekte, konuşma yetisinde, algılama ve yargılama kapasitesinde, soyut düşünme ve problem çözme gibi önemli işlevlerde bozukluk olmasıdır (Şahin ve Yazıcı 2007). Alzheimer hastalığının kesin tedavisi yoktur. Günümüzde kullanılan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Ortadan kaldıran tedavi uygulaması bulunmamaktadır. Bu amaca yönelik olarak Donepezil ve Rivastigmin gibi AChE inhibitörleri genel olarak kullanılmaktadır (Göçer *et al.* 2013). Ancak, rapor edilmiştir ki bu ilaçlar hepatotoksisite ve gastrointestinal bozuklukları gibi yan etkilere sebep olur. Bu nedenle, güvenli ve etkin özellikle doğal AChE inhibitörleri son zamanlarda daha fazla önem kazanmaktadır. Aminotetralin türevlerinin Dopaminerjik, seroenerjik, adrenerjik gibi biyolojik aktivite gösterdiği iyi bilinmektedir (Akincioğlu *et al.* 2013).

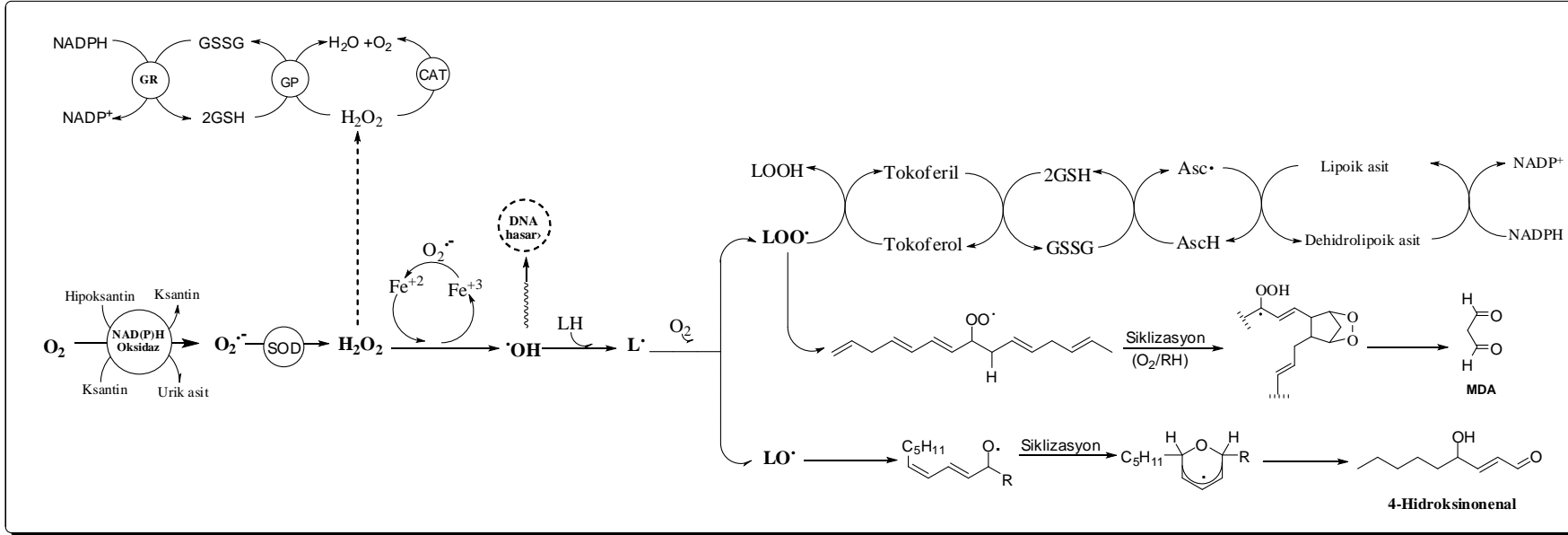
Genelde birçok herbisit ve pestisit AChE'nin inhibitörüdür. AChE, böceklerde, insanlarda ve hayvanlarda bulunan bir enzimdir. Sinir hücrelerinin işlev görebilmesi için bu enzimin ACh adlı nörotransmitteri asetat ve kolin olarak parçalanması gerekmektedir. Bu mekanizma nörotransmitter maddeler arasında nispeten enderdir, çünkü çoğu diğer nörotransmitter, serotonin, dopamin ve norepinefrin dâhil olmak üzere, parçalanmak yerine sinaptik boşluk tarafından absorbe edilirler. Hem tıpta ve hem tarımda çok sayıda AChE inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu inhibitörler canlı metabolizması açısından yan etkilere sebep olduğundan yeni doğal inhibitörlere yönelim gün geçtikçe artmaktadır (Akincioğlu *et al.* 2013). Karbamat pestisitleri de tersinir AChE inhibitörlerine örnektir. OF insektisitlerden olan Malatyon, Paratyon ve Klorpirifos tersinmez olarak AChE inhibe ederler. Glifosat herbisiti 3-fosfoşikimat 1-karboksiviniltransferaz'ın inhibitörüdür (Tan *et al.* 2006).

1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri

Atomlardaki elektronlar orbital denilen bölgelerde çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelir ve moleküler yapılar oluşur. Atomik ya da moleküler yapılarda ortaklanmamış elektron içeren yapılara "Serbest Radikal" denir. Kısacası serbest radikaller ortaklanmamış elektrona sahip atom, atom grubu veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "Oksidan Moleküller" veya "Reaktif Oksijen Türleri (ROS)" de denilmektedir (Halliwell 1991; Gülçin 2012). Organizmada farklı nedenlerle pek çok türde ROS oluşabilir. Serbest radikaller, protein, yağ ve karbohidratların oksijen ile tepkimeye girerek parçalandığı ve enerji kaynağı ATP'nin üretilme işlemi sırasında oluşur.

ROS aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri (ETS) ve aktif fagositoz gibi metabolik yollarda devamlı olarak oluşmaktadır (Lichtenthaler *et al.* 2003). Bu süreçlerde oluşan başlıca ROS'lar; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($HO\cdot$), hidroperoksil radikali ($HOO\cdot$), peroksili radikal ($ROO\cdot$), alkoksil radikal ($RO\cdot$) olarak örneklendirilirken, serbest radikal olmayan türler ise hipokloröz asit ($OHCl$), peroksinitrit ($ONOO^-$) singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) vs. şeklinde sayılabilir (Aruoma 1997; Schoneich 1999; Gülçin 2012).

Normal olarak ROS'lar spesifik enzim sistemleri (Süperoksit dismutaz ve Katalaz), suda ve lipitte çözünebilen bazı protein yapısında olmayan bileşikler (ürik asit ve tokoferol) tarafından engellenmektedir (Lichtenthaler *et al.* 2003). Sigara, alkol, çok yağlı besin tüketimi, çok fazla güneş ışığına maruz kalma, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallar gibi birçok dış etken serbest radikallerin gereğinden fazla üretimine sebep olmaktadır. Ayrıca yaşlanmada da serbest radikallerin verdiği hasar göz ardı edilmemelidir. Dahası kalp-damar hastalıkları, akciğer, karaciğer rahatsızlıkları ve kanser gibi, yaklaşık yüzden farklı hastalığın oluşmasında serbest radikallerin etkisi olduğu düşünülmektedir (Bjelaković *et al.* 2007; Herbert 1997; Gülçin 2002).



GR: Glutatyon Redüktaz
 GPx: Glutatyon Peroksidaz
 LO: Lipit Oksit Radikali
 LOO: Lipit Peroksid Radikali

Şekil 1.10. ROS oluşum yolları, Lipid peroksidasyonu, Glutatyon ve diğer antioksidanların rolü (Defeng and Cederbaum 2003).

Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal değildirler. Ancak serbest radikal oluşumunda rol oynarlar. Serbest radikaller katyon, anyon veya nötral halde bulunabilirler.

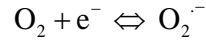
Moleküler oksijen, ROS oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri hücreye zarar verir. Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümlerine sebep olur. Oksijenin yükseltgeyici özelliğinden anaerobiklerin yanı sıra aerobikler de zarar görmektedirler. %40'luk oksijen konsantrasyonunda protein agregatları birikimi, proteaz aktivitesi artışı ve yaşlanmada hızlanma görülmüştür (Davies 2000).

1.6. Oksidatif Stres

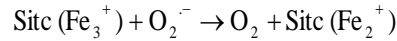
Canlı sistemlerde meydana gelen bütün fizyolojik olaylar; enzim, hormon ve iz elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme işlemidir. Yükseltgenme potansiyeli yüksek olan madde yükseltgenirken diğer madde indirgenir. İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipitler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir. Bu durum intrasellüler reaktif türlerinin konsantrasyonunun artmasıyla karakterize olan ve antioksidan savunma sisteminin düşmesiyle eşleştirilen oksidatif stres olarak ifade edilir (Gülçin 2012; Çetinkaya *et al.* 2012). Canlı sistemlerde bulunan redoks dengesindeki herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve dolayısıyla dokuların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur ve bu durum zamanla ölümlerle sonuçlanabilir. Reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan temel faktörlerdendir. Başlıca reaktif türleri şunlardır (Gülçin 2012).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur. *In vivo* olarak adrenalın, flavin nükleotidleri, tiyol içeren bileşikler, glukoz ile demir ve bakır gibi geçiş

metallerinin oksijene etki etmesiyle oluşmaktadır. Mitokondrilerdeki ETS, karaciğerde Sitokrom P₄₅₀, adrenal medullada hormonal sentez, damar endotelinde nitrik oksitlerin yok edilmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşması sırasında meydana gelmektedir (Becker 1999).



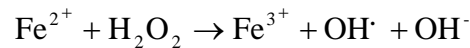
Süperoksit radikali hem yükseltgeyici ve hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin Ferrisitokrom-C ya da Nitroblue Tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur (Altınışik 2000).



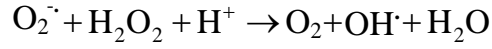
Süperoksit radikali adrenalin oksidasyonunda oksidan gibi görev yapar ve bir elektron alarak hidrojen perokside (H₂O₂) indirgenir.

Hidroksil radikali (OH[·]), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları: Moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelmektedir. Serbest radikallerin en zararlısı OH[·] radikalidir. H₂O₂ ve O₂^{·-} bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da başka etkilerle OH[·] radikalini oluştururlar. Bunların bazıları aşağıda verilmiştir (Lloyd *et al.* 1997).

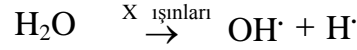
➤ **Fenton reaksiyonu:** H₂O₂, Fe⁺² ve diğer geçiş metalleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH[·] radikali oluşturur.



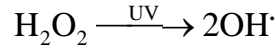
➤ **Haber-Weiss reaksiyonu:** H₂O₂, O₂^{·-} ile reaksiyona girerek (Fe⁺² ve Cu⁺² katalizi ile) hidroksil radikalini oluşturur.



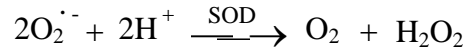
Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalmasıyla da OH \cdot oluşur.



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



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



Bunların yanında bağışıklık sistemine ait fagositik özellikli nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla O₂^{·-}'nin dismutasyonu ile oluşan H₂O₂'i, klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'ye dönüştürürler. Oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönden olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi; süperoksit radikalinin nitrik oksit ile reaksiyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (Wright *et al.* 2002).

Alkil radikali, organik radikaller hidroksil radikali; yağ asitleri, nükleik asitler, karbohidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkarıp karbon merkezli organik radikallerin oluşmasına neden olur (Mugnaini and Lucarini 2007).

Hidroksiperoksil radikali ($\text{HOO}\cdot$) süperoksit radikalinin düşük pH'da (pKa 4.8) protonlanmasıyla oluşur ve daha kuvvetli bir oksidandır (Sharp *et al.* 2008).

Alkoksil radikali ($\text{LO}\cdot$) Fe^{+2} gibi geçiş metallere lipit hidroperoksid indirgemesi ile oluşur, okside LDL oluşturarak hücre ölümüne yol açar (Coffey *et al.* 1995). Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif azot türlerinin en önemlisi nitrik oksittir ($\text{NO}\cdot$). Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan $\text{NO}\cdot$ ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit ($\text{NO}_2\cdot$) ve nitrat ($\text{NO}_3\cdot$) oluşturmak üzere metabolize olur. Damar endotellerinde $\text{NO}\cdot$ 'i nötralize etmek için sürekli olarak süperoksit oluşumu gerçekleşmektedir (Massie 1993; Payzın 2000).

Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerinin bir başka kaynağıdır. Dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksigenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına sebep olurlar.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Peroksizomlardaki oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda H_2O_2 üretirler. H_2O_2 'nin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi çok yüksektir. Bundan dolayı peroksizomlardan sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir.

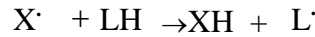
Metal iyonlarının serbest radikalik reaksiyonlarındaki asıl önemi lipit peroksidasyonundaki etkileriyle bilinir. $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{OH}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ gibi radikaller lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Demir iyonlarının lipit peroksidasyonunda önemi oldukça büyüktür (Kneepkens 1994; Loeckie 1999). Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunda lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalizlemektedirler.

Serbest radikallerin hücrelerde lipit, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi önemli bileşiklere önemli etkileri bulunmaktadır. $\text{O}_2\cdot^-$ ve $\text{OH}\cdot$ sitoplazma, mitokondri, nükleus

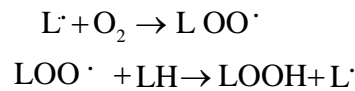
ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatır (Gülçin *et al.* 2004a, 2010, Gülçin 2011). Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki çiftli bağlardan bir hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla lipit peroksidasyonu başlar.

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır.

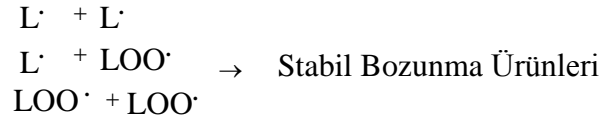
Lipid oksidasyonu; aşağıda gösterildiği şekilde, başlangıç, ilerleme ve sonuç aşamalarından oluşmaktadır. Oksidasyonun başlangıç aşamasında, başlatıcı bir radikal ($X\cdot$) ile yağ asidi (LH) substratının reaksiyonu sonucu H atomu transferi yoluyla bir lipid radikali ($L\cdot$) oluşmaktadır.



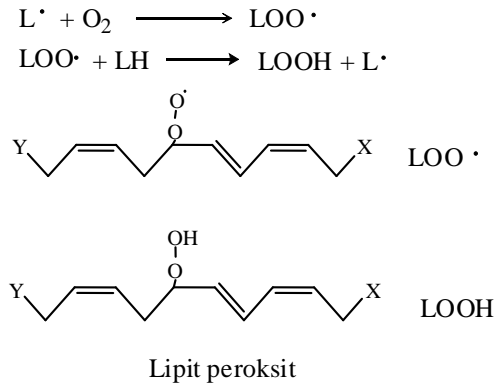
İlerleme aşamasında, oluşan $L\cdot$ radikaline oksijen eklenmesiyle peroksi radikali ($LOO\cdot$) meydana gelmekte ve bu peroksi radikali diğer bir yağ asidi (LH) molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroperoksitlere ve yeni lipid radikallerine dönüşmektedir.



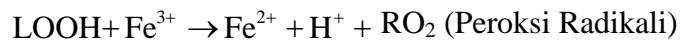
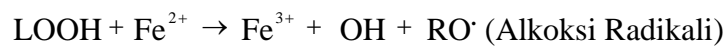
Sonuç aşamasında ise oluşan radikaller birbiriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi stabil bozunma ürünlerine dönüşmektedir (Annakkaya 2012).



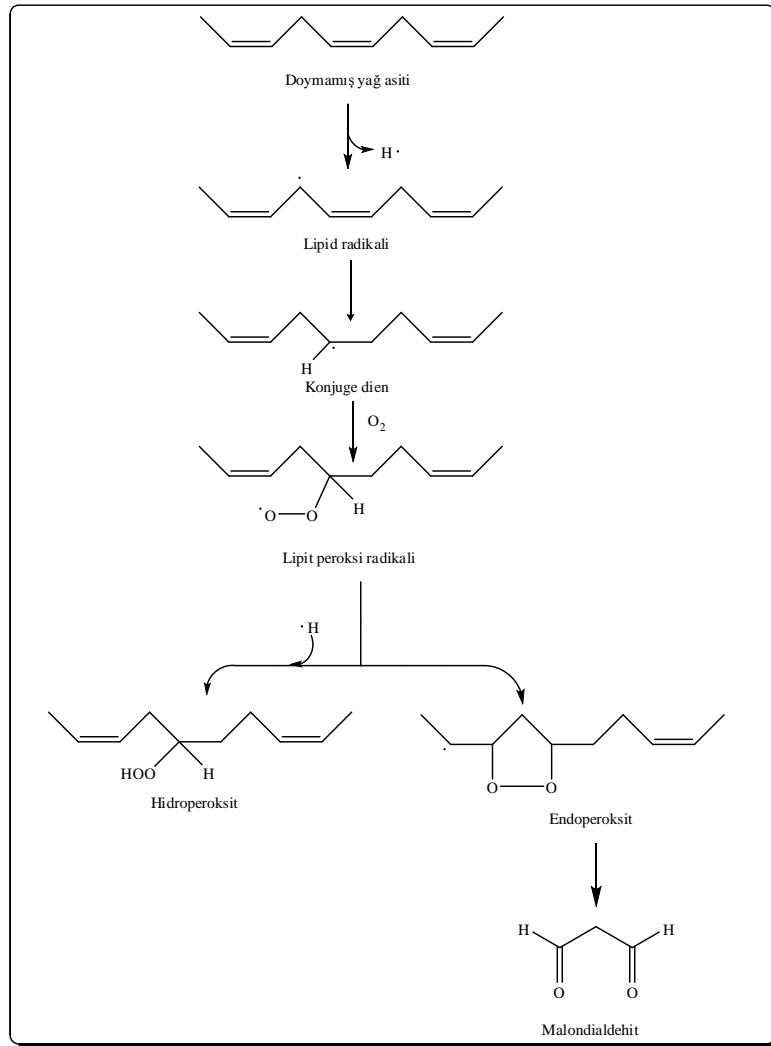
Diğer bir ifadeyle lipit peroksit radikalleri ($LOO\cdot$), membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine ($LOOH$) dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.



Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin ($LOOH$) yıkılımı ortamda bulunan demir ve bakır tuzları gibi geçiş metalleri iyonları gerçekleştirir ve oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri peroksidasyonu uyarırlar (Kneepkens 1994; Loeckie 1999).



Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar veya oluştuğu andan itibaren diğer hücrelerde hasara yol açacak etkilere neden olurlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.



Şekil 1.11. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu sonucu başta aldehitler olmak üzere alkan, alkol, hidroksi yağ asitleri gibi pek çok ürün oluşur. Oluşan bu aldehitler oksidatif zararı artırmaktadır. MDA, lipit peroksidasyonunda peroksit seviyelerinin belirlenmesinde indikatör olarak kullanılır. Genel olarak kanda ve idrarda ortaya çıktığı için varlığı önemlidir. Bunun

yanı sıra membran stabilitesinin bozulmasına ve fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına ve Ca^{+2} iyonlarının membran geçişlerinin artmasına neden olmaktadır (Canoruç *et al.* 2001).

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH.) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Pürin ve pirimidin bazlarına etki ederek modifikasyonlara neden olur ki bu modifikasyonların olması protein sentezinin aksaması, inhibisyona uğraması demektir (Dizdaroğlu 1991).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) ise membranlardan kolayca geçerek DNA hasarına sebep olurlar. Karbohidratlar serbest radikallere karşı yağ asitleri kadar hassas değildirler ancak serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar bazı rahatsızlıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynarlar. Diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, romatizma, Behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Gülçin *et al.* 2006a, Gülçin 2012).

Proteinler ise serbest radikallerden etkilenmesi amino asit dizimlerine bağlı olarak değişir. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^-) veya H_2O_2 reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur. Aynı zamanda serbest radikaller proteinlerin peptit bağlarını koparıp hücrelerdeki proteinlerin yıkımına neden olurlar. Protein yapısındaki enzimlerin fonksiyonlarını bozabilirler (Altınışik 2000).

1.7. Antioksidanlar

19. yüzyılda araştımacılar metallerin oksidasyonunu yani paslanmasını ve kimyasal aşınmalarını engelleyebilecek özel bir madde arayışına girmişler ve aradıkları özellikteki maddeyi keşfetmişlerdir. Keşfettikleri bu maddeleride “Antioksidan” olarak adlandırmışlardır. 20. yüzyılın ortalarında ise gıdaların ömrünü uzatmak için çalışan araştırmacılar, antioksidanları besinlere ilave ettiklerinde doymamış yağların parçalanması sonucu ortaya çıkan kötü koku ve tadın engellendiği yani gıdaların bozulmadığını ortaya koydular. Oksidasyona bağlı olarak gerçekteşen kötü tat ve kokunun oluşmasının engellenmesinde antioksidanların rolü büyüktür. Ancak antioksidanlar oksidan ürünleri ortadan kaldırmaz ya da oksidasyonu tamamen engelleyemezler. Bu maddeler gıdalara ilave edilerek oksidasyon olayını geciktirir ya da kısmen engeller. Bu gelişmeler olurken, diğer taraftan devam eden araştırmalarda, insanların günlük besinlerle aldıkları vitaminlerin bazılarının antioksidan olarak sınıflandırılabilceği anlaşılmıştır.

Daha sonra antioksidanların insan sağlığına olan faydaları, yaşam süresini uzatması ve yaşlanmayı yavaşlatması gibi etkileri araştırılmaya ve tartışılmaya başlandı. Yaşamımız için vazgeçilmez olan oksijen aslında bize garip gelse de belli koşullarda vücudumuza zarar vermektedir. Oksijenin bu olabilecek zararının nedeni, vücudumuzda oksijen kullanılarak gerçekteşen metabolik tepkimelerin sonucunda kimyasal tepkimeye girmeye yatkın yani reaktif oksijen türlerinin oluşmasıdır.

Endüstriyel işlemlerde gıdaların korunma süresini uzatmak için sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak pek çok araştırıcı uzun süredir besinlerin işlenmesinde kullanılan butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyer butil hidroksikinin (TBHQ) ve propil galat (PG) gibi sentetik antioksidanların canlı organizmada karsinojenik ve teratojenik etki gösterdiğine dikkat çekmektedir (Gülçin *et al.* 2003; 2004a; Gülçin 2012).

Tüketiciler genelde doğal antioksidanları sentetik antioksidanlara tercih etmektedir. Bitkilerin yapılarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Sherwin 1990; Wanasundara and Shahidi 1998; Fernandez Lopez 2005; Gülçin *et al.* 2005a; 2006a). Bu nedenle uzun süreden beri, gıdaların koku ve tat gibi özelliklerini artırmak için katkı olarak besinlere katılan baharatlar, doğal aromatik bitkiler ve bitkisel kaynaklı antioksidanlar giderek önem kazanmıştır. Çizelge 1.4’te sentetik ve doğal antioksidanların bazı özellikleri mukayese edilmiştir.

Çizelge 1.4. Doğal ve sentetik antioksidanların avantaj ve dezavantajları (Gülçin 2012).

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

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “Antioksidan” adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Ou *et al.* 2002a; 2002b). Ayrıca antioksidanları genel olarak vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlar olmak üzere ikiye ayırmak da mümkündür (Ak and Gülçin 2006; 2008).

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. SOD'ın yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, β -karoten ve α -1 antitripsin sorumludur (Halliwell 1991). Vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşın serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998).

Çizelge 1.5. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998)

Oksidan	Antioksidan savunma
• Sigara dumanı	• Süperoksit dismutaz
• Egzersiz	• Katalaz
• Çevre kirleticiler	• Glutatyon peroksidaz
• Ateşli hastalıklar	• Glutatyon
• Radyasyon	• Ubikinon
• Çoklu doymamış yağ asitleri	• Selenyum
• İskemi	• Ürik asit
• Karsinojenler	• A, C ve E vitaminileri

Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman hastalıklar oluşur. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve oksidatif stres oluşmasına neden olmaktadır.

Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; E vitamini, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan vitaminleri ve esansiyel iz mineralleri içeren gıdaların yeterince alınmasına bağlıdır (Duthie *et al.* 1996). E vitamini (tokoferoller), yağda çözünebilir başlıca

antioksidanlardan olup tüm hücre membranlarında bulunmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı korumaktadır (Diplock 1998). E vitamininin yüksek dozlarda diyete ilavesinin LDL düzeylerini önemli ölçüde artırdığı ve oksidatif strese karşı oldukça koruyucu olduğu bildirilmektedir (Reaven *et al.* 1993; Gülçin 2012).

Askorbik asit de vücudun ekstraselüler sıvılarında bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Vücutta sentezlenemediği için gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir. Askorbik asidin indirgen bir ajan olmasının yanısıra E vitaminini rejenere etme özelliğine de sahiptir (Diplock 1998; Gülçin 2012). Karotenoidler ise; antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak zararlı hidrojen peroksitlerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler. Diyetteki önemli karotenoidlerinden β -Karoten; sarı ve turuncu sebze ve meyvelerde, yeşil sebzelerde, likopen; domateste ve lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır (Diplock 1998; Gülçin 2012).

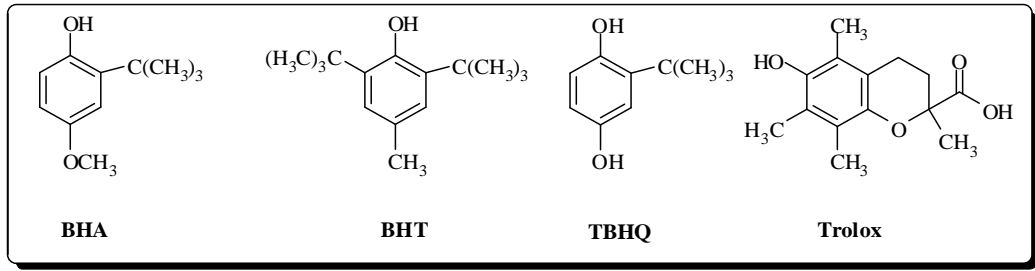
Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler de indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı ve metal şelatör olmaları nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır (Rice-Evans *et al.* 1995). Selenyum, bakır, manganez ve çinko gibi mineraller de antioksidan enzimlerin yapıları ve katalitik aktiviteleri için gereklidir (Diplock 1998).

Çizelge 1.6. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998)

Antioksidan	Antioksidan İçeren Besinlerden Bazıları
• C vitamini (askorbik asit)	• Maydanoz, yeşil biber, ıspanak, asma yaprağı, brokoli ve benzeri yeşil sebzeler
• E vitamini (tokoferol)	• Bitkisel yağlar, sebzeler, yağlı tohumlar, tahıl taneleri, kuru baklagiller
• Polifenolik antioksidanlar	• Soğan, patates, lahana, brokoli, ıspanak, erik, siyah üzüm, turunçgiller, yeşil çay
• Karotenoidler	• Havuç, domates, portakal, ıspanak, brokoli, lahana ve benzeri yeşil ve sarı sebze ve meyveler, balık, süt, yumurta
• Selenyum	• Tahıl ürünleri, baklagiller, et ve balık

1.8. Sentetik Antioksidanlar

Günümüzde kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlara birer fenolik bileşik olan BHA, BHT, TBHQ ve Troloks'tur (Gülçin 2012).



Şekil 1.12. Kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlar

Yukarıda molekül yapıları verilen referans antioksidanlar, gıda ve farmakolojik uygulamalarda çok yaygın olarak kullanılır. Sentetik antioksidanlar katı ve sıvı yağların bozunmasını azaltmak için her zaman tercih edilmiştir (Hudson 1990). Fakat BHA ve BHT'nin toksik ve kanserojen etkisi hakkında şüpheler olduğu için yasal olarak kullanımları yasaklanmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu nedenle, son zamanlarda gıda uygulamaları için doğal ve güvenli antioksidanlara artan büyük bir ilgi söz konusudur. Bununla birlikte doğal antioksidanlara tüketiciler tarafından da eğilimin artması doğal antioksidan kaynaklarını keşfetme girişimlerine hız vererek, kayde değer önemli gelişmeler bu hususta literatüre kazandırılmıştır (Gülçin 2006b, 2007).

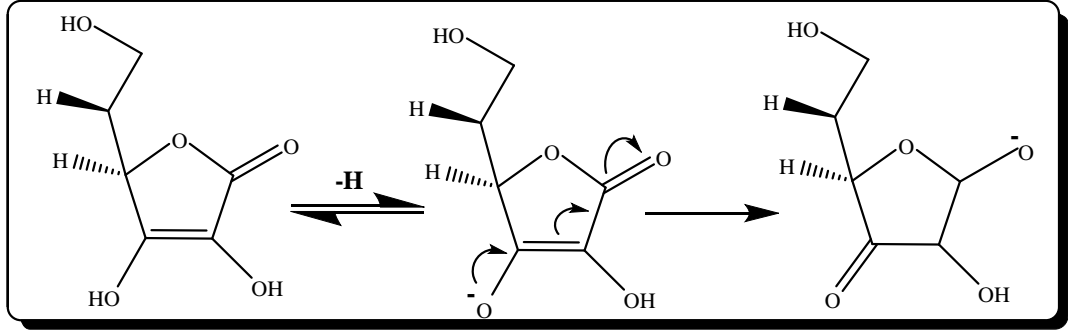
Kullanılan dört büyük antioksidanın kullanımı gıda ve yağlarda %0,02 olacak şekilde sınırlandırılmıştır (Simic 1981). Bitkisel yağlar için en uygun antioksidan TBHQ'dır. BHA ve BHT kızarmış yağ ve gıda ürünlerinde kullanılır. BHT ve BHA gibi bazı sentetik antioksidan birlikte kullanıldığında sinerjik etkiye neden olduğu da bildirilmiştir. (Sherwin 1972; Omura 1995). Sinerjik etkiyle beraber antioksidan kapasiteleri daha da artar (St Angelo 1996). BHA aynı zamanda PG ile de sinerjik etkiye sahiptir. Sentetik antioksidanların toksikolojik davranışları büyük ölçüde test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda uzun süre kullanımları zararlı etkilerinden dolayı

tavsiye edilmemektedir. Bu bağlamda, doğal kaynaklı antioksidanlar, sentetik antioksidanlara göre daha sağlıklı ve güvenli görünmektedir (Valenzuela and Nieto 1996). 1980'den bu yana doğal antioksidanlar artık sentetik antioksidanlara alternatif olarak kullanılmaya başlanmış ve daha da önem kazanmıştır.

1.9. Doğal Antioksidanlar

İnsan diyetinde geniş bir antioksidan spektrumuna sahiptir. Bu bileşiklerin antioksidan kapasitesine sahip olmalarının yanı sıra, aynı zamanda yapısal özelliklerinden dolayı ROS temizleme kapasitesine de sahip oldukları bilinmektedir. Diyette bulunan antioksidanların en önemli temsilcileri C vitamini, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler olduğu söylenebilir. C vitaminin dışında her bir grupta yapısal olarak farklı bir dizi bileşik bulunur. Örneğin karotenoid grubunda 600'den fazla farklı yapı bulunmaktadır ve şu ana kadar sadece %50'si tanımlanabilmiştir (Sies and Stahl 1995; Rice-Evans and Miller 1996; Gülçin 2012). Diyet sırasında diyette bulunan farklı bileşikler arasında sinerjik etki meydana gelebilir. Ancak bu durumda bunların tespit ve değerlendirilmesi çok zordur. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi diyette bulunan bileşikler tek tek bir araya gelip sinerjik etki oldukları düşünülmektedir (Diplock *et al.* 1998; Gülçin 2012).

Askorbik asit (C vitamini) en az tehlikeli doğal antioksidanlardan biri olarak kabul edilir (Bendich *et al.* 1986; Weber *et al.* 1996). Askorbik asit suda çözünen bir bileşiktir. Birçok gıda ve bitki de yüksek konsantrasyonlar da bulunur. Tipik olarak, Askorbik asit bir oksidan ile reaksiyona girer, C vitamini elektron transferi ile radikal zincir reaksiyonlarını sona erdirir. Askorbik asit, etkili bir indirgeyici ajandır. Bu durumda konjuge bir sistem oluşur ve bu nedenle güçlü bir antioksidan gibi davranma kabiliyetine sahip olur. Bunu özetleyen reaksiyon Şekil 1.14'te verilmiştir (Gülçin 2012).

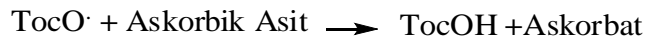
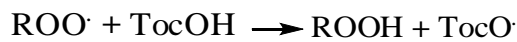


Şekil 1.13. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması

İnsan kan plazması 60 μmol askorbat içerir. Askorbat ROS ile etkileştiğinde dihidroaskorbik asit bileşiği askorbik asite oluşur. Dihidroaskorbatta dihidroaskorbat redüktaz enzimi tarafından geri dönüşümlü olarak askorbik asitte çevrilir. Bu nedenle, sadece dihidroaskorbat ile askorbat düzeyleri karşılaştırıldığında Dihidroaskorbat çok düşük seviyede bulunur. Şekil 1.13’de mekanizması verilmiştir.

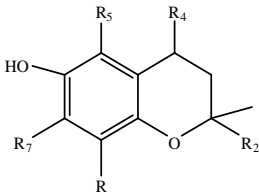
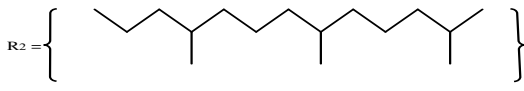
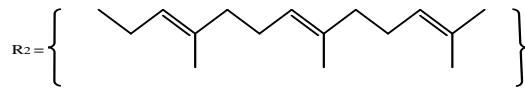
Askorbik asit ROS giderici olarak, O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , $^1\text{O}_2$ karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Sulu çözeltilerde askorbik asit aynı zamanda reaktif azot türlerini de giderme özelliğine sahiptir. Askorbik asidin diyetdeki en önemli kaynakları narenciye, kivi, kiraz, kavun, domates iken ve brokoli, karnabahar, brüksel lahanası ve beyaz lahana gibi sebzeler ve meyvelerdir.

Son zamanlarda, Bursal ve Gülçin tarafından (2011) yapılan bir çalışmada liyofilize edilmiş kivi meyvesinin (*Actinida deliciosa*) 100 g su ekstraktında 105 mg C vitamini olduğu belirlenmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, C vitamini tokoferoksil radikalini rejenere ederek tokoferole dönüştürme olduğunu göstermiştir (Niki *et al.* 1982, 1985; Gülçin 2012).

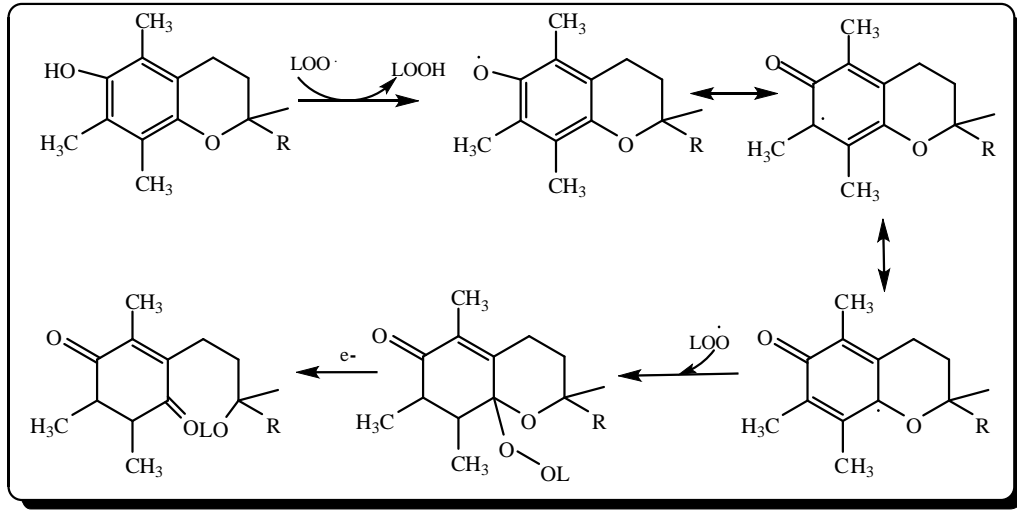


Tokoferoller, E vitamini olarak bilinir (Gülçin *et al.* 2005a; Gülçin 2012). Tokoferoller en yaygın olarak kullanılan antioksidanlar olduğu belirtilmiştir (Pokorny 1988). Tokoferoller, Tokoferol ve tokotrienol olarak iki grup halinde sınıflandırılır. Tokoferollerin dört izomeri vardır (α , β , γ ve δ) ayrı iki grup olarak düşünüldüğünde toplamda sekiz izomeri oluşur.

Çizelge 1.7. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması

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

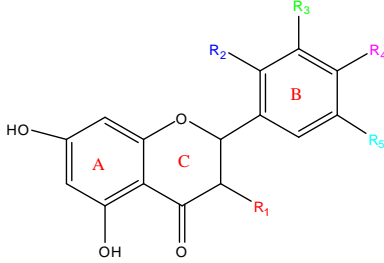
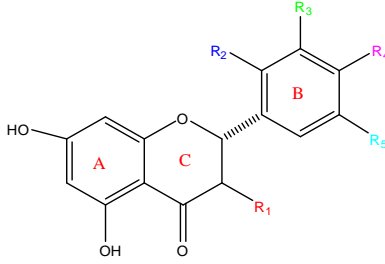
Tokoferoller iz miktarda da olsa bütün gıdalarda bulunur. Bitkisel yağlar, fındık ve kepekli tahıllar, tohumlar gibi gıda kaynakları yüksek konsantrasyonda E Vitamini içerir. En önemli Tokoferol grubu α -Tokoferoldür. Diğer Tokoferol grupları yenilebilir yağlarda daha düşük antioksidan kapasiteye sahiptir. α -Tokoferol yağda çözünebilir bir antioksidan bileşiktir. Buna ek olarak hücre içi etki göstererek lipid peroksidasyonunu azaltırlar. α -Tokoferol yağda çözünebilir hücre içinde ve hücre dışında bulunan bir vitamindir ve hücre membranını oksidasyondan korur (Godbout *et al.* 2004). α -Tokoferol'ün ana kaynağı Avrupa diyetiyken, γ -Tokoferol'ün en yaygın olduğu diyet Amerika diyetidir (Jiang *et al.* 2001). α -Tokoferol yaygın olarak gıda ürünlerine koruyucu olarak ilave edilir. Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması Şekil 1.14'de verilmiştir.



Şekil 1.14. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması

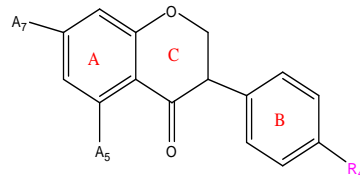
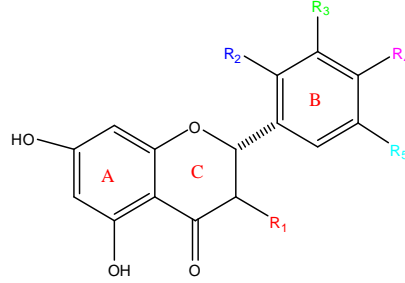
Doğal antioksidanlar mikroorganizmalar, mantarlar ve hayvan dokularında hemen hemen hepsinde bulunur. Fenolik bileşikler ikincil bitki metabolitlerdir ve doğal olarak, hemen hemen tüm bitkilerin içinde bitkisel kökenli gıda ürünleri de dahil olmak üzere mevcuttur. Bu bileşiklerin hem hayvanlar hemde insanların ayrılmaz bir parçası oldukları düşünülmektedir (Gülçin 2006b, 2012). Doğal antioksidanlar fenolik bileşiklerdir, bunların en önemli grupları tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Gülçin 2012). Flavonoidler bitkilerde bulunan ortak bir bileşendir, çeşitli bitki türlerinin yaprak, kök, gövde, tohumlarından izole edilmiş 4000'den fazla flavonoid olmakla beraber toplamda 8000 polifenolik bileşik vardır ki bunların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Harborne *et al.* 1999). Flavonoidler bitkilerde birer aromatik amino asit olan fenilalanin ve tirozinden ayrıca malonattanda oluşmaktadır (Harborne 1986). Genel olarak bahsettiğimiz flavonoidler aslında bir flavan çekirdeğidir ve bu flavan yapısı üç halkalı yapıdan düzenlenmiş 15 karbon içermektedir. Çizelge 1.8'de A, B ve C olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 1.8. Flavonoidlerin molekül yapıları (Gülçin 2012)

		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
						
Flavonlar	Apigenin	H	H	H	OH	H
	Cyrsin	H	H	H	H	H
	Luteolin	H	H	OH	OH	H
Flavanoller	Datisctin	OH	H	OH	OH	H
	Quercetin	OH	H	OH	OH	H
	Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
	Morin	OH	OH	H	OH	H
	Kaempferol	OH	H	H	OH	H
						
		R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Flavanonlar	Hesperetin	H	H	OH	OCH ₃	H
	Naringenin	H	H	H	OH	H

Çizelge 1.8 (devam)

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavanonol	Taksifolin	OH	H	OH	OH	H

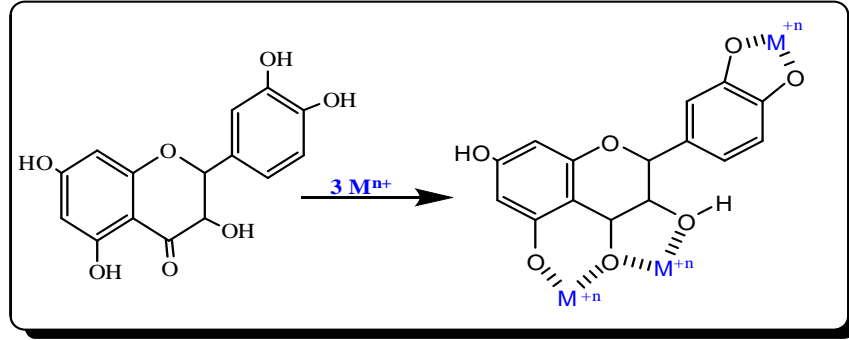


İzoflavonlar	A ₅	A ₇	R ₄
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	Oglc	OH
Daidzein	H	OH	OH
Daidzin	H	Oglc	OH
Biochanin A	OH	OH	OCH ₃
Formononetin	H	OH	OCH ₃

* Oglc: O-Glikozid

Flavonoidler çok etkili antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir ve LDH oksidasyonunu azaltarak birçok kardiyovasküler hastalıklara karşı korumaktadır. Bu özelliklerinden dolayı beslenmemiz için önemli antioksidanlardan biridir. Günlük alım miktarı flavonoidler için 100 mg'ın üzerindedir (Dragsted *et al.* 1997). Flavonoidlerin en önemli yararı oksidatif hasara karşı koruması ve bazı çeşitli enzimlerle spesifik etkileşerek aktivitesini arttırmasıdır (Rice Evans and van Acker 1996; Middleton and Kandaswami 1992; Williams *et al.* 2004). Flavonoidler antioksidan kapasitesine sahiptir

bunu da özellikle metal şelatlayarak, radikal gidererek yapmaktadır. Şekil 1.15'te metal şelatlama mekanizması verilmiştir (Gülçin 2012).



Şekil 1.15. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması verilmiştir

Son yıllarda yapılan çalışmalarda doğal antioksidanları içeren gıdaların kanser, katarakt ve kardiovasküler hastalıkların oluşma riskini önlediği bildirilmektedir. Bu koruyucu etkileri nedeniyle özellikle meyve ve sebzelerin yapılarında bulunan antioksidanlara olan ilgi daha da artmıştır (Baysal ve Ersus 1999; Göçer and Gülçin 2011).

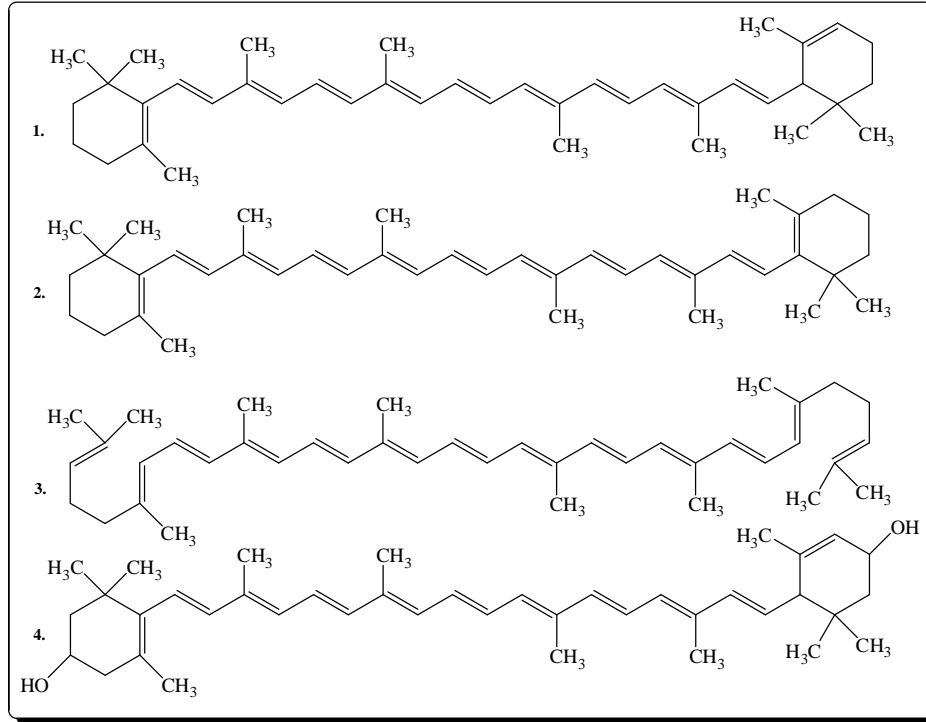
Karotenoidler sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilen, 700'ün üzerinde yağda çözünebilir ayrıca karotenoidler pigment kaynağı olarak bilinen maddelerdir. Genel olarak havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur (Frel 1994). Bitki kaynaklı gıdalarda α -karoten havuçta, kapsantin kırmızıbiberde, lutein yeşil yapraklı sebzelerde ve biksin anotto tohumunda yüksek miktarda bulunur. Triplet molekülleri ve singlet oksijeni gidererek, serbest radikalleri inhibe eder ve hücreyi oksidatif strese korur (Tee 1992).

Karotenoidler anti-kanserojen ve anti-oksidasyon etkiye sahiptirler. β -Karoten önemli bir antioksidan madde olup doymamış yağların oksidasyonunu önleyerek serbest radikallerin oluşumunu baskılar. Serbest radikaller dokular ve hücre zarlarındaki enzimler, proteinler ve lipitlerin dejenerasyonunda oldukça etkili bir role sahiptir (Canfield and Valenzuela 1993). Karotenoidler içerisinde doğada en fazla olanın

Lutein'dir. Karotenoidler yapısal olarak hidrokarbon karotenler ve oksijen içeren ksantofiller olmak üzere iki grupta toplanır. Hidroksillenmiş karotenoidlerin yağ asidi esterleri doğada yaygın olarak bulunur (Paiva and Russell 1999).

Karotenoidler doğada bol bulunmaları, hem hidrofobik hem de hidrofilik grupları içermeleri, provitamin A aktivitesine sahip olması ve anti-kanserojen özellikleri ile gıda endüstrisinde büyük öneme sahiptir. Günümüzde sentetik gıda renk maddeleri üzerindeki sınırlamalar doğal karotenoidlere yönelimi hızlandırmıştır (Gülçin 2012)

Şimdiye kadar üzerinde en fazla durulan ve araştırma yapılan karotenoid, β -karotendir (Gülçin 2012). β -karoten bağırsak epitel hücrelerinde A vitamini dönüşmekte ve karaciğerde palmitat esteri olarak depolanmaktadır. Kimyasal olarak karotenoid yapısında ve terpenoidler içerisinde yer alan β -karoten genellikle havuç ve yeşil yapraklı bitkilerde bulunmaktadır. Fotosentez sırasında zararlı ışığa karşı fotokoruma, antioksidan, kansere karşı koruma, immün cevabı artırma, tümör gelişimini inhibe etme, kardiovasküler hastalıkların oluşma riskini önleme gibi özelliklere de sahip olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle β -karoten besin ve ilaç endüstrisinde önem taşımaktadır. Bazı önemli karotenoidler sırasıyla α -karoten, β -karoten, Likopen ve Lutein olmak üzere açık kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir (Gülçin 2012).



Şekil 1.16. α - ve β -Karoten, Likopen, Lutein gibi karotenoidlerin açık kimyasal yapıları

Karotenoidler grubundan olan likopen de karoten gibi antioksidan özellik göstermektedirler. Likopen sekiz izopren biriminden oluşan kırmızı karotenoid pigmentidir. Domates, karpuz, üzüm ve meyvelerde bol miktarda bulunur. Bitkilerde yaygın olarak bulunan diğer karotenoidler ise zeaksantin, violaksantin, neoksantin ve β -kriptoksantin'dir. Bitkilerin karotenoid içerikleri değişik faktörlerden etkilenir. Olgunlaşma seviyesi bu faktörlerden biridir. Domateste likopen miktarının olgunlaşmayla hızla artışı ve hasat sonrası da bu artışın devamı dikkat çeken bir örnektir. Likopenin sağlık üzerine etkileri son zamanlarda en çok araştırılan konulardan biridir. Klinik araştırmalarda likopenin prostat kanseri, solunum ve sindirim yolu kanseri, rahim kanseri, akciğer kanseri gibi kanser türlerini farklı oranlarda önlediği belirlenmiştir (Gülçin 2012; Fennema 1996).

Doğal antioksidanlar besinlerde en az iki kimyasal formda bulunuyor. Örneğin besinler C vitamininin hem dehidroaskorbik asit denen indirgenmiş formunu hem de askorbik asit denen yükseltgenmiş formunu içermektedir. C vitamininin sadece

indirgenmiş formunu içeren antioksidanların vücutta depolanmış demir kanalıyla serbest radikallerin oluşumunu tetikleyici etkisi olduğu ve besinlerdeki antioksidanların gösterdiği etkiyi gösteremeyecekleri belirtilmektedir (Bjelaković *et al.* 2007; Herbert 1997).

1.10. Antioksidanların Etkisi

Metabolizmada koruma görevi yapan bu kimyasal bileşikler, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri etkisiz hale getirirken bu sırada serbest radikal haline gelmemektedirler (Prior and Cao 2000; Çetinkaya *et al.* 2012). Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için temel bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging gibi birçok biyolojik fonksiyonun bu antioksidanlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Cook 1996).

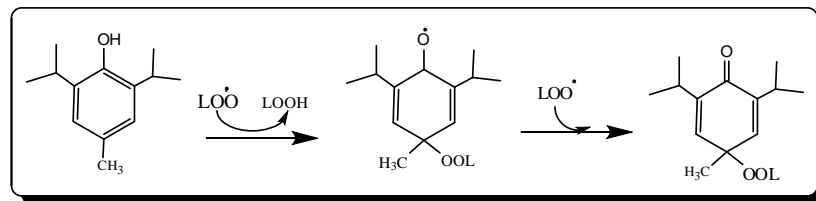
Antioksidan aktivite sergileyen bütün maddelerin etki mekanizması dört şekilde olur.

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

Son yıllarda, antioksidanların organizmaları, dokuları veya cansız sistemleri oksidatif strese karşı koruduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmalar fizyoloji, farmakoloji, beslenme hatta gıda işleme dahil olmak üzere birçok alanda yapılarak bu görüş desteklenmiştir (Magalhaes *et al.* 2009). Gıda açısından antioksidanlar acılaşmayı önleyen, tazeliği koruyan ya da gıdanın oksitlenmesini engelleyen maddeler olarak

tanımlanır. Antioksidan gıdalar ya da takviyeler besinlerin indüksiyon sürelerini uzatarak acılaşmayı önler ya da geciktirir (Gülçin 2012).

Antioksidanlar genelde serbest radikalleri gidererek oksidasyonu inhibe ederler veya geciktirirler. Bazen de antioksidanlar indirek bir mekanizmayla radikali giderir. Böyle antioksidanlar birincil antioksidan diye tanımlanır. Birincil antioksidanlara α -Tokoferol gibi fenolik bileşikler örnek verilebilirler. Bu antioksidanlar indüksiyon dönemi sırasında tüketilirler. İkincil antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile serbest oksijen radikallerini giderme ve metal şelatlama dahil olmak üzere radikal olmayan oksijen türlerini hidroperoksitlere dönüştürme özelliklerine sahiptir (Gülçin 2012). Antioksidan maddelerin antioksidan kapasiteleri üzerine sadece yapısal özellikleri ve girdiği reaksiyonlar değil aynı zamanda konsantrasyon, sıcaklık, ışık seviyesi, sistemin yüzey özellikleri, fiziksel durum oksidan olarak hareket eden çok sayıda mikro parçalar ve sinerjistler gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Gülçin 2012). Bazı antioksidanlar iyi bir şekilde antioksidan aktivite gösterirken, yüksek sıcaklık ve UV ışınlarının bulunduğu bazı şartlarda zincir reaksiyonları sırasında oksidan etki gösteren serbest radikal oluşturabilmektedir. Şekil 1.17’de BHT’nin lipit peroksidasyonunu önleme mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 1.17. BHT’nin serbest radikal oluşturma mekanizması (Gülçin 2012)

Bilindiği kadarıyla insan vücudunda metabolitik aktiviteler ve mekanizmalar sonucunda O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 ve azot radikalleri gibi ROS ve RNS’ler diye adlandırılan serbest radikaller oluşmaktadır. Çalışmalar gösteriyorki bu radikaller günümüzde bulunan kanser başta olmak üzere, Alzheimer, Parkinson gibi çeşitli kronik hastalıkların sebebidir (Davies 2000; Finkel and Holbrook 2000; Gülçin 2012). Bu etkiler nedeniyle yukarıda da bahsedildiği gibi antioksidan sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Zaten

metabolizmada oksidan- antioksidan gibi dengeli bir sistem mevcuttur. Ancak bu dengede bozulma meydana geldiğinde oksidatif stres oluşumuyla tehlikeler oluşmaya başlar ve bu nedenle dışarıdan antioksidan takviyesi almak son zamanlarda giderek artmıştır.

Sınıflandırma yaparak antioksidanları sentetik antioksidanlar ve doğal antioksidanlar olarak sınıflandırmıştık. Rağbetin artması ilk önceleri daha çok sentetik antioksidanlara olsa da sonra zararlı olabilecekleri düşüncesi insanları daha çok α -tokoferol, A, C ve E vitaminleri, karotenoidler, flavanoidler gibi doğal antioksidanlara yönlendirmiştir (Gülçin 2012). Bu antioksidanların kapasitelerinin araştırılması çalışmalarında *in vivo* olmasının yanı sıra *in vitro* da devam etmekte ve önemli sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan önemli *in vitro* antioksidan kapasitesi belirleme metodları, linoleik asit lipid peroksidasyonu, toplam radikal yakalama antioksidan metodu (TRAP), oksijen radikali absorblama kapasitesi metodu (ORAC), Fe^{+3} indirgeme metodu, Cu^{+2} indirgeme metodu (KUPRAK), DPPH \cdot radikal giderme metodu, ABTS radikal giderme metodu, DMPD radikal giderme metodu, $O_2^{\cdot-}$ giderme metodu ve metal şelatlama metodu örnek olarak gösterilebilir. Bir antioksidanın antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için en az metotta değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir.

1.11. En Yaygın Kullanılan Antioksidan Metotlar

Antioksidan aktivitenin ilkesi, serbest radikali nötralize edecek bir elektronun varlığına dayanmaktadır. Ayrıca antioksidan aktivite aromatik halkadaki hidroksilasyon düzeni doğası ve sayısı ile ilişkilidir. Hidrojen verici olarak davranması ve oksidasyonu inhibe etmesi, fenol halkasındaki OH \cdot gruplarının sayısının artmasıyla alakalıdır ve hidroksil gruplarının sayısı artıkça bu durum artar. Fenolik bileşikler, meyve, sebze, çay, zeytinyağı ve bunun gibi bitkilerde yaygın olarak bulunan fitokimyasalların bir grubudur. Son zamanlarda antioksidan özellik sergileyen maddelere ilgi, insan sağlığına yararları, gıda koruma açısından önemi nedeniyle artmaktadır.

Sonuç olarak antioksidanlar sadece sağlık için değil gıda koruma teknolojisinin de vazgeçilmezleri arasındadır. Son yıllarda antioksidan maddeler artmakta olan ilgi beraberinde bilim adamlarını daha çok araştırma ve çalışma yapmaya yönlendirmiştir. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan antioksidan metotlar Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, O_2^- giderme, $ABTS^{+}$ giderme, $DPPH^{\cdot}$ giderme, $DMPD^{+}$ giderme aktiviteleri, ferrozin ve bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktiviteleri ve ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini metotlarıdır.

1.12. Fenolik Bileşikler

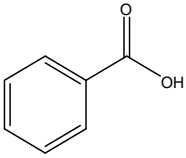
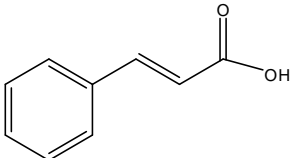
Fenolik bileşikler, oksijenli aromatik bileşiklerden olup, bir veya daha fazla OH grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik yapıdaki maddelerdir. Renksizdirler ancak hava ile temas ettiklerinde kırmızı renk gösterirler. Suda çözünmelerinin yanında, alkol, eter gibi organik çözücülerde çok iyi çözünürler. Seyreltik çözeltileri dezenfektan olarak kullanılır. Polifenoller, flavonoidler gibi birden çok polimerin çıkış maddesidir.

Fenolik bileşikler son 30 yıl içinde üzerinde oldukça fazla çalışılmış ve yapıları daha iyi aydınlatılmıştır. Fenolik bileşikler temel yapılarında benzen halkası içeren maddelerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan sekonder metabolitlerdir. Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Anonymous 1984). Fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Fenolik bileşikler bitkiler âleminde o kadar yaygındır ki hemen her meyve ve sebze az ya da çok miktarda bulunmaktadır (Shahidi and Wanasundara 1992; Moure *et al.* 2001). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı

tanımlanmıştır (Kafkas *et al.* 2006). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir.

Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve Gülyüz 2004). Fenolik bileşiklere, beslenme açısından olumlu etkilerinin olması nedeniyle "biyo flavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı 2007; Cemeroğlu 2004). Ayrıca gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmaları gibi nedenlerle de önem taşımaktadırlar (Saldamlı 2007, Anonim 2006). Fenolik asitlerin antioksidan kapasiteleri molekül yapılarıyla ilişkilidir. Benzen halkasına bağlı OH gruplarının ya da diğer grupların pozisyonları son derece önemlidir. Tablo 1.9'da verildiği gibi fenolik asitleri hidroksisınamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki ana grupta toplamak mümkündür.

Çizelge 1.9. Hidroksibenzoik ve Hidroksisınamik asit türevleri

	
Benzoik Asit	Sınamik Asit
Gallik asit	Kafeik asit
p-Hidrobenzoik asit	p-Kumarik asit
3,4-Dihidrobenzoik asit	Rosmarinik asit
Vanilik asit	Ferulik asit
Sirinjik asit	Sinapik asit
Protoketoik asit	Klorogenik asit

Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde eser miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit

asitlerdir. Hidroksibenzoik asitler gıdaların yapısında genellikle eser miktarlarda (10 μ M kadar) bulunur veya hiç bulunmayabilirler. Hidroksibenzoik asitler, hidroksisünamik asitlerden yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile analog olan bir reaksiyon zinciri sonucunda oluşmaktadır (Gülçin 2012).

Hidroksisünamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir. Hidroksisünamik asitler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar ve fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösterirler. Hidroksisünamik asitler ancak çok az miktarlarda serbest halde bulunurlar, çoğunlukla asit türevleri halindedirler. Hidroksisünamik asitin esterleri de gıdalarda çok yaygındır. Hidroksisünamik asit glikozidleri ve amidleri de birçok bitkide bulunmaktadır (Gülçin 2012).

Fenolik asitler, p-hidroksibenzoik, 3,4-dihidroksibenzoik, vanillik, sirinjik, p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, klorojenik ve rosmarinik asit gibi fenolik asitlere bitkiler âleminde sıklıkla rastlanmaktadır. Organik asit esterleri veya glikozitler olarak bulunmaktadır. Hidroksil grubunun varlığı ve pozisyonu antioksidan aktivitede oldukça önemlidir. Ancak fenolik bileşiklerin aşırı alınmasının sakıncalı olabileceği ve bu durumda toksik etki gösterdiği ve gırtlak kanserine neden olduğu da öne sürülmektedir. Ancak düzenli olarak alındığında vücudun koruma mekanizmasını geliştirerek kanser riskini azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca fenolik antioksidanlar, Ca⁺² homeostasisi üzerindeki etkileriyle, koroner kalp yetmezliğinde de önleyici role sahiptirler (Shahidi and Nacz 1995).

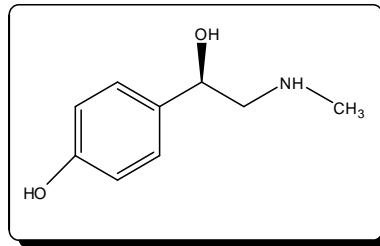
1.13. Sinefrin

Turunçgillerin insan diyetindeki yeri dikkate alındığında özellikle C vitamini açısından oldukça zengin bir kaynak olduğu bilinmektedir (Cemeroğlu *et al.* 2001). Turunç meyvesi 45-90 mg/100 g C vitamini içeriği ile oldukça önemli bir kaynaktır. Ayrıca

turunç meyvesinin 100 g yenilebilir kısmının 290 µg A vitamini (karotenoit formunda), 100 µg tiamin (B1 vitamini), 40 µg riboflavin ve 0,3 mg niasin içerdiği bildirilmiştir (Mortensen and Skibsted 1997).

Turunçgiller, son yıllarda sağlıklı beslenmedeki önemleri daha fazla anlaşılan ve lif bakımından da oldukça zengin, sağlıklı beslenme açısından da bir o kadar önemli bir kaynaktır. Diğer meyvelerdeki gibi turunçgillerde de diyet lifler özellikle meyve kabuğunda meyve etine göre daha fazladır (Gorinstein *et al.* 2001). Bu durum turunçgil kabuklarından yapılan kabuk reçeli gibi ürünlerin lif açısından zengin bir kaynak olduğunu düşündürmektedir. Turunçgiller özellikle sağlıklı beslenme açısından önemli olan fenolik bileşiklerce de zengindir.

Turunç meyvesinin içeriğinde çok fazla fenolik bileşik olduğu ve bunlardan biri olan Sinefrin'in yapılan araştırmalarda özellikle üzerinde durulmuştur. Sinefrinin kimyasal yapısı Efedrin ile benzerlik göstermektedir. Sinefrin alkaloid yapısında bir bileşiktir, m-Sinefrin (Fenilefrin) ve p-Sinefrin gibi farklı izomerleri vardır (Santana *et al.* 2008). Turunç meyvesinde Sinefrin bileşiğine ilave olarak Oktopamin, Tiramin, N-Metiltiramin ve Hordenin alkaloidleri de bulunmaktadır (Pellati and Benvenuti 2002; Putzbach *et al.* 2007). Yukarıda da bahsettiğimiz gibi bu içeriklere rağmen araştırmalarda özellikle Sinefrin üzerinde durulmuştur. Sinefrin suda çözünür olup hava ve ışıktaki stabildir. Penzak ve arkadaşları ise taze sıkılmış turunç suyunda 56,9 µg/ml Sinefrin bulunduğunu tespit etmişlerdir (Penzak *et al.* 2001). Çoğunlukla turunç meyvesinin aktif bileşeni Sinefrin olarak bilinmektedir. Turunç meyvesi içermiş olduğu Sinefrin maddesinin kilo vermeye yardımcı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.18. Sinefrin'in açık yapısı

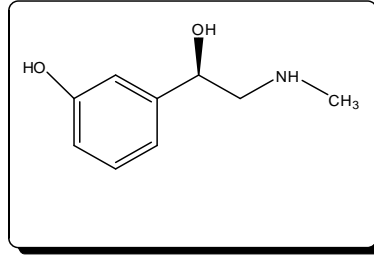
Sinefrin hem enerji tüketimini hızlandırırken aynı zamanda iştahı keserek gıda ve dolayısıyla enerji alımını azaltır. Bu şekilde kilo vermeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Sinefrinin β -adrenerjik uyarı yoluyla adipoz dokularındaki yağların yakılmasına yardımcı olduğu da belirtilmektedir (Haaz *et al.* 2006).

Amfetaminler, kokain ve efedrin gibi sempatomimetik aminler, uyarıcılar sınıfındadır. Sempatomimetik aminler böbreküstü bezinden salgılanan adrenalın ve noradrenalın hormonlarının etkilerine benzer etki gösteren maddelerdir. Uyarıcı etki göstermektedirler. Uyarıcılar ise oksijen tüketiminde artışa, solunum yolları ve barsaktaki düz kaslarda gevşemeye, solunumsal uyarımda artışa, tükürük salgısında azalmaya, ve gözbebeğinde genişlemeye neden olurlar. Uyarıcılar merkezi sinir sistemi üzerine doğrudan etkiyle uyarım yapan maddelerdir. Metabolizma hızına, beyin, omurilik ve kalp üzerine uyarıcı etkileri vardır. Uyarıcılar vücutta, uyanıklık, toplam uyku süresinde azalma, yorgunluğu geciktirme, reflekslerde, kan basıncında, kalp atım hızında ve metabolik hızda artış gibi etkilerde bulunur. Efedrinin doping olarak ve zayıflama ilacı olarak kullanımı artmıştır. Son yıllarda Efedrin bu etkilerinden dolayı yasaklanmıştır. Bunun bir sonucu olarak araştırmacılar yeni arayışlara girmiş ve Efedrine benzerliğiyle dikkat çeken Sinefrin'in önemi daha çok artmış ve özellikle iştah kesici yönünden yola çıkarak çalışmalar bu açıdan yoğun bir şekilde devam etmektedir.

1.14. Fenilefrin

Fenilefrin sentetik yapıda sempatomimetik bir amindir. Katekol türevi değildir ancak katekolaminlerden daha etkilidir. Farmakolojik bakımdan daha eski bir ilaç olan Metoksamine benzer. α 1-adrenerjik reseptörlerini direkt olarak ve güçlü bir şekilde etkiler (Doğan 2011). Fenilefrin sistemik dekonjestan olarak oral yoldan çoğu zaman diğer ilaçlarla kombine halde alınır ve nazal tedavi için intranazal olarak da uygulanır. Göze topikal olarak uygulandığında midriyazis oluşturur. Bu nedenle oftalmolojide sıklıkla diyagnostik amaçla kullanılır. Fenilefrin damar yoluyla verildiğinde güçlü vazokonstriktör (kan damarlarını büzücü) özelliklere sahip olduğu belirtilen sentetik, seçici, sempatomimetik bir ajandır. Fenilefrin'nin kalbin beta alıcıları üzerinde az etkiye

sahip olduğu belirtilmiştir. Güçlü bir vazokonstriktör olduğundan, enjekte edilebilir. Fenilefrin preparatları, atardamarları ve kılcal damarları daraltarak kan basıncını arttıran kimyasal madde olarak kullanılabilir.



Şekil 1.19. Fenilefrin'in açık molekül yapısı

Fenilefrin hem direk hem indirek semptomimetik etki gösterir. Kardiyovasküler etkilerinin ortaya çıkması için parenteral yoldan verilmesi gerekir. α 1-adrenerjik reseptörler üzerinde direkt etkisiyle güçlü stimulan etki yapar. Bu direk agonist etki ilacın baskın etkisidir. Fenilefrin terapötik dozlarda kalpteki β 1-adrenerjik reseptörler üzerinde önemli sayılabilecek bir etki oluşturmamasına rağmen, yüksek dozlarda verildiğinde kalpteki bu reseptörleri uyarabilir. Damar yoluyla verildiğinde, kalp hızını yavaşlatır fakat atış gücünü artırır. Böylece sistolik ve diyastolik basınçlarında bir artışa neden olur. Fenilefrin adrenerjik sinirlerin terminal depolanma yerlerinden noradrenalin salıverilmesine de yol açar. Dekonjestan olarak kullanılacağına koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon gibi sorunları olan veya beta bloker ilaçlar kullanan kişilerde kullanılmamalıdır. Metabolitleri halinde idrarla atılır (Doğan 2011).

1.15. Çalışmanın Amacı

Reaktif oksijen türleri antioksidanlar gibi hücre bileşenleri tarafından giderilmezlerse birçok hastalığa sebep olurlar. Doğal antioksidanların kullanımının profilaktik etki göstererek bu hastalıkların oluşma riskini azaltır. Bundan dolayı araştırmacılar doğal kaynaklı potansiyel antioksidan etkili maddelerin bulunmasına yönelik çalışmaları yoğunlaştırmışlardır. Alternatif olarak doğal ve gıda kaynaklı antioksidan kaynaklarına özellikle de bitki orjinli olanlarını teşhis etmeye ihtiyaç duyulduğundan son yıllarda

bunlara olan ilgi oldukça artmıştır (Prieto *et al.* 1999; Gülçin *et al.* 2009 , 2006b, 2007 a;b). Ayrıca bazı fenolik maddelerin besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları da bilinmektedir (Harborne 1994; Shahidi and Nacz 1995; Gülçin 2006b; Moure *et al.* 2001). Bitkisel organizmalarda meydana gelen fenolik yapılu bileşiklerin ve fenolik bir bileşik olan Sinefrin ve Fenilefrinin kimyasal yapılarından dolayı potansiyel antioksidan aktiviteye sahip oldukları düşünülmektedir.

Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda bir mono fenolik olan Sinefrin ve Fenilefrin'in antioksidan özellikleri araştırıldı. Ayrıca yukarıda açık formülleri verilen ve anlatılan, fenolik yapıya sahip her iki bileşiğin çalışmamız kapsamında antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra taze insan kanından saflaştırılacak olan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) üzerinde inhibisyon etkileri ve AChE üzerine inhibisyon etkileri de araştırıldı. Bu iki enzim metabolizmada oldukça önem arz etmektedir.

Fizyolojik şartlarda insan eritrositlerindeki hCA enzimlerinin oldukça değiştiği görülmüştür. hCA aktivitesindeki değişiklikler diyabet, şeker hastalığı ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarla ilgilidir (Gülçin *et al.* 2004f). Öte yandan AChE enzimi başlıca beyinde, sinir hücrelerinde, kasta ve eritrositlerde bulunur (Wilson and Nachmansohn 1954). AChE nörotransmitter bir madde olarak görev yapan asetilkolinin (ACh) kolin ve asetik asite hidrolizinden sorumludur (Vale 1998; Göçer *et al.* 2013). AChE aktivitesinin engellenmesi durumunda sempatik ve parasempatik motor sinirler ve merkezi sinir sistemi çalışmasında değişiklikler oluşur (Lotti 1995). Alzheimer hastalığının tedavi sürecinde AChE inhibitörleri kullanılmaktadır, sentetik inhibitörleri inhibisyonun yanında farklı yan etkilere sebep olduğundan, doğal inhibitör kaynaklarına yönelim olmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin'in inhibisyon özelliklerinin çalışılmasının yanında antioksidan özellikleri de araştırılacağından elde edilen sonuçların tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

CA enziminin saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları daha çok hayvan dokularından yapılmıştır. Bitkilerde ise bu konuda son yıllarda çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bitki CA enzimleri ile hayvan CA enzimleri arasında çeşitli farklılıkların olduğu çalışmalar ile tespit edilmiştir (Atkins *et al.* 1972). CA sığır eritrositlerinden saflaştırması ise 1930'lu yılların sonlarında ancak gerçekleştirebilmiştir. Daha sonraları Keilin and Martin (1944) hCA aktivitesi ile Zn içeriği arasında bağlantı olduğunu belirterek Zn'nun katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Bu şekilde hCA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçti. Daha sonra hCA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda tespit edilmeye başlandı (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006). Enzim göz, ciğer ve merkezi sinir sistemi gibi çoğu dokuda da dağılmıştır (Beydemir and Gülçin 2004). Enzimin bitkilerdeki molekül kütlesi 160-260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu ve memelilerde ise molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002). Maydanoz bitkisi CA enziminin hegzamerik yapıda olduğu ve molekül ağırlığının 180 kDa olduğu bu yönüyle de hayvan CA enziminden farklı olduğu belirlenmiştir (Tobin 1970).

Yapılan diğer bir araştırmada ise hava soluyan balıklardan olan *Amia calva*'larda solungaç ve hava kesesi CA izoenzimlerinin karakterizasyonu ve hücre içindeki dağılımlarını incelemişlerdir. Solungaçlardan elde edilen CA enziminin, diferansiyel santrifüj ile belirlenen hücre içi fraksiyonları dağılımının büyük bir çoğunluğunu sitoplazmik orjinli olduğu bildirilmiştir. Çeşitli denemeler sonucunda, solungaçlarda bir tek CA izoenziminin olduğu ve CA II'ye benzediği belirlenmiştir. Solungaçlarda gözlenen durumun aksine hava kesesinde bulunan CA'nın membrana bağlı mikrozomal orjinli olduğu bulunmuştur (Gervais and Tufts 1999)

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamit ($C_4H_6N_4O_3S_2$), Dorzolamit

(C₁₀H₁₆N₂O₄S₃) ve Brinzolamit (C₁₂H₂₁N₃O₅S₃) gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler. Örneğin CA inhibitörleri insanlarda glukom hastalığı, ödem ve epilepsi tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Bülbül *et al.* 2003; Akincioğlu *et al.* 2013) Bununla birlikte birçok kimyasal ve atık madde de bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Lionetto ve grubunun yapmış olduğu çalışmada, bir kemikli balık olan yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, hem solungaç hem de barsak CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisini araştırmış, solungaç ve barsak homojenatlarında CA aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğu gözlenmiştir.

Daha önceden de belirtildiği gibi katekinler, flavonlar, flavonoller ve fenolik asitlerdir en çok bilinen polifenolik bileşiklerdir (Shahidi and Naczki 1995; Gülçin 2012). Polifenolik bileşiklerin en çok bulunduğu kaynak ise bitkisel kaynaklı meyve ve sebzelerdir. Günümüze kadar bu konularda binlerce çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda farklı kaynaklardan saflaştırılan veya saf maddelerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri yoğun bir şekilde araştırılmıştır ve araştırılmaya da devam edilmektedir. Bu bağlamda propofol (Gülçin *et al.* 2005a), bazı dimerik fenol bileşikleri (Gülçin and Daştan 2007), dantrolen (Büyükkuroğlu *et al.* 2001), melatonin (Gülçin *et al.* 2002; 2003b; Gülçin 2008), serotonin (Gülçin 2008), morfin (Gülçin *et al.* 2004a), kafeik asit (Gülçin 2006a), L-karnitin (Gülçin 2006b), L-Adrenalin (Gülçin 2009), L-Tirozin ve L-Dopa (Gülçin 2007), kurkumin (Ak and Gülçin 2008) ve rezveratrol (Gülçin 2010) gibi saf ve biyolojik açıdan önem arz eden moleküllerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri çalışılmış ve bu maddelerin bazıları için muhtemel mekanizmalar öne sürülmüştür. Belirlenen aktiviteler birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile mukayeseleri yapılmıştır.

Bunlara ek olarak farklı kaynaklardan saflaştırılan maddelerin veya saf maddelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Son zamanlarda *Perilla panchinensis* bitkisinden total olarak saflaştırılan antosiyaninler (Gülçin *et al.* 2005b), sarmaşık bitkisinden α -hederin, hederasaponin-C, hederakolşizit-E ve -F saponinleri (Gülçin *et al.* 2004d), *Chionanthus virginicus* bitkisinden Oleoropin

ve Ligustrozit gibi sekoiridoidler saflaştırılmış (Gülçin *et al.* 2009) antioksidan ve antiradikal aktiviteleri incelenmiştir. *Vinca herbacea* bitkisinden ise majdin ve izomajdin maddeleri saflaştırılmış ve bu maddelerin apoptotik, antioksidan ve antiradikal özellikleri incelenmiştir (Gülçin *et al.* 2012b). Serotonin (Gülçin 2008), rezveratrol (Gülçin 2010), propofol (Gülçin *et al.* 2005a), eugenol (Gülçin 2011), kafeik asit fenetil esteri (Göçer and Gülçin 2011), *Pistacia terebinthus* L. (Göçer 2013), gibi maddelerin de son zamanlarda antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve standart antioksidan olan α -Tokoferol ve troloks ile mukayeseleri yapılmış ve muhtemel mekanizmalar ileri sürülmüştür.

Bunların dışında kivi (Dawes and Keene 1999), nane (Elmastas *et al.* 2005), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), çilek (Abuja *et al.* 1998), lavanta (Gülçin *et al.* 2004d), karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), kiraz sapı (*Cerasus avium* L.) (Bursal *et al.* 2013), ışgın (Oktay *et al.* 2007), turunçgiller (Saleh *et al.* 1998), brokoli (Gülçin *et al.* 2004b), kızılıçık (Gülçin *et al.* 2005c), defne (Elmastas *et al.* 2006a), mantar (Elmastas *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a), madımak (*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2001), evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısırğan (Gülçin 2002), su mercimeği (Gülçin *et al.* 2009b), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Şerbetçi and Gülçin 2009), zencefil (Stoilova *et al.* 2007), ökse otu (Uçar *et al.* 2006), oğulotu (Köksal *et al.* 2011), tarçın (Chua *et al.* 2007, 2008 mi) ve kuru erik (Donavan 1998) gibi birçok meyve ve sebze ile zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) ve karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012) gibi bitkisel yağların ve propolisin (Gülçin *et al.* 2010) antioksidan aktivite araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998) ve meyve sularında (Wen *et al.* 1999) da yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir. Ayrıca patates (Friedman 1997), soğan (Ewald *et al.* 1999), fasulye (Ewald *et al.* 1999) ve ıspanak (Gil *et al.* 1999) gibi çeşitli sebzelerin de antioksidan aktiviteleri olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca diğer doğal antioksidan kaynakları arasında baharatlar, şifalı bitkiler, çaylar, uçucu yağlar, tohumlar, tahıllar, hububatlar, meyveler, sebzeler, enzimler ve proteinler de sayılabilir (Gökçalp 2006). Antioksidanların kanser dâhil birçok kronik hastalığı

engellediği ve tedavi etme özellikleri yaygın şekilde incelenmiştir (Shahidi and Naczk 1995).

Antioksidanlar sağlık alanının dışında birçok endüstriyel alanda da kullanılmaktadır. Antioksidanların bilinen en eski kullanım alanlarının başında gıda ve kozmetik ürünlerinin bozulmasının engellenmesinde kullanılmasıdır. Kozmetik ürünlerinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan antioksidanlar aynı zamanda yakıtlara, kauçuğa ve petrole bozunumlarını ve polimerizasyonlarını önlemek için dengeleyici olarak ilave edilmekte ve kullanılmaktadır.

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC) tanımında antioksidanlar “gıdada yağın acılaşmasını ve renk değişimleri gibi oksidasyon tepkimeleri sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar yağların oksidatif bozulmalarını diğer bir deyişle renk, koku, tat, görünüş ve gıda değer gibi önemli özelliklerinin kaybolmasını önleyerek gıda kalitesini korumakta ve aynı zamanda bakteri ve küflerin neden olduğu bozulmalara karşı da iyi bir koruyucu olarak görev yapmaktadır. Askorbik asit (AA, E300) ve E vitamini (E306) doğal antioksidanlar arasında sayılabilirken BHA (E320) ve BHT (E321) ve TBHQ (E319) ise petrol kökenli sentetik antioksidanlar olarak nitelendirilmiştir (Bjelakovic 2007; Herbert 1997).

Bunun yanında, genel olarak bahsedildiği gibi Asetilkolin gibi nörotransmitter miktarındaki azalma ya da artmalar çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin asetilkolin'nin çok fazla hirolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı meydana gelmekte ve bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan ilaçlar aranmakta ve çalışılmaktadır. Bu ilaçların ancak çok büyük yan etkileri olduğu için doğal kaynaklı inhibitörler daha dikkat çekmektedir. AChE inhibitörleri olarak karbamat türevleri ve organo fosforlu bileşikler üzerinde durulmuştur. Özellikle balıklar üzerinde karbamat türevi ilaçlar ya da organo fosforlu ilaçlar inhibitör inhisyon özellikleri açısından çalışılmıştır. Fernandez- Vega ve grubu *Anguilla anguilla*'da (Fernandez-Vega *et al.* 2002), beyin, solungaç ve kas dokusunda, Ferrari ve grubu *Carassius auratus*'un

(Ferrari *et al.* 2004) beyin dokusunda karbamat türevlerinin ve organofosforlu bileşiklerin etkisini araştırmış ve total AChE aktivitesinin azaldığını bulmuşlardır. *Carassius auratus*'nın beyin dokusunda organofosforlu bileşiklerin AChE'yi yüksek miktarda inhibe ettiği bulunmuştur (Ferrari *et al.* 2004). Buna benzer diğer bir çalışmada Dembele ve arkadaşları ise Organofosforlu chlorfenvinphos ve karbamat carbofuran etkisinde *Cyprinus carpio*'nın beyin dokusunda çalışmış ve AChE'nin inhibe olduğunu bulmuşlardır. Karbofuranın etkisinden sonra aktivite geri kazanımının yakın zamanda olduğu, fakat chlorfenvinphos etkisinden sonra aktivitenin tamamen geri kazanımı için zaman gerektirdiği ayrıca belirtilmiştir (Dembele *et al.* 1999). Bir su ürünü olan *Danio rerio* üzerinde yapılan bir çalışmada ise 250 gün boyunca çeşitli konsantasyonlarda Organo fosforlu parathion etkisiyle konsantrasyona bağlı olarak AChE'nin inhibe olduğu bildirilmiştir (Roex *et al.* 2003).

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

Farklı ksenobiyotiklerle çalışılarak AChE inhibisyonu çeşitli türlerde gösterilmiştir (Pan and Dutta 1998). Ayrıca akuatik kirlenmede AChE aktivitesi biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Dembele *et al.* 1999).

AChE'nin inhibitörü olarak bilinen ve çalışmalarla desteklenen karbamatlar, fenol ve türevlerinden üretilen sentetik maddelerdir. Temas halinde ve ağız yoluyla alınması halinde toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yağ dokularında birikmezler ve kısa zamanda toksisitelerini kaybederler. Asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek enzim faaliyetlerini engellerler. Propoksür, pirolan ve aldikarb bu gruba örnek olarak verilebilir (Şanlı 1988).

II. Dünya Savaşı sırasında sinir gazı olarak kullanılan organofosfatlar, II. Dünya Savaşı sonrasında organofosfatların insektisit etkisinin bulunmasıyla zararlı böcek popülasyonlarına karşı kullanılmaya başlanmıştır. Organofosfatlar, sinir sisteminde bulunan AChE enzimini inhibe ederek asetilkolinin asetat ve koline parçalanmasını engeller. Sinir iletiminin sürekliliği motor kaslarının durmadan çalışmasına sebep olur ve organizmanın ölümüne yol açar. Bu grubun temsilcileri arasında Diklorvos, Malaokzon ve Paraokzon yer almaktadır (Ünal ve Gürkan 2001).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	: Sanyo, Japan
pH metre	: Thermo
Hassas terazi	: Denver Instrument
İnkübatör	: Wiseven
Otomatik pipetler	: Eppendorf ve Socorex
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350

Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Jeio Tech
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

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

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

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

13. Stok fenolik maddelerin çözeltilerinin hazırlanması: 1 mg Fenilefrin, Sinefrin çözeltileri 1 ml çözücülerinde çözüldü.

- 10 mg Fenilefrin üzerine 6 ml saf su eklendi. Son olarak hacim 10 ml'ye saf suyla tamamlandı.

- 10 mg Sinefrin 6 ml etanol eklendi. Son olarak hacim 10 ml'ye etanolla tamamlandı.

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

1. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH:6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan 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. Akrlamid-Bisakrlamid çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrlamid karışımı 100 ml suda çözüldü.

5. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS, 90 g saf suda çözüldü.

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

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

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

c) Fe^{+3} - Fe^{+2} indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na_2HPO_4 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 $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g $K_3Fe(CN)_6$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 ml'ye destile su ile tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.

4. %0,1'lik $FeCl_3$ çözeltisinin hazırlanması: 85 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

d) Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,01 M'lık $CuCl_2$ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

2. $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

3. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH: 6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 80 ml saf suda çözüldü, pH metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı

e) DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH· çözeltisinin hazırlanması: 40 mg DPPH· 100 ml etanolde tamamen çözününceye kadar bir gece etanolde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

f) ABTS⁺ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 2,84 g Na_2HPO_4 180 ml destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

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

3. 2,5 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 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.

g) 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 çözülerek hazırlandı.
3. 0,001 M'lık DMPD⁺ çözeltilisinin hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltilisinden 1 ml alındı 100 ml'lik ve 0,1 M'lık (pH 5,25) 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 çözülerek hazırlandı.

h) Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,05 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,8): 1,42 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 7,8'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 200 ml olacak şekilde tamamlandı.
2. $1,33 \times 10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltilisinin hazırlanması: 12 mg riboflavin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
3. $4,46 \times 10^{-5}$ M'lık metiyonin çözeltilisinin hazırlanması: 0,665 mg metiyonin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
4. $8,15 \times 10^{-8}$ M'lık NBT çözeltilisinin hazırlanması: 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 ml'ye fosfat tamponuyla (pH 7.4, 0.1 M) tamamlandı.

i) Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 2 mM'lık FeCl_2 çözeltilisinin hazırlanması: 0,014 g $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 50 ml etanolda çözüldü.
2. 5 mM'lık ferrozin çözeltilisinin hazırlanması: 12 mg ferrozin 50 ml saf etanolda tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

j) 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 Çözeltilisinin Hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 ml alınarak 100 ml'ye destile suyla 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 Çözeltilisinin Hazırlanması: 15 g NH_4SCN destile suda çözüldü, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

k) 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 20 mM'lık $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden oluşur.

l) Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık 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'lık 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'lık HCl çözeltisinde çözüldü.

4. 2 mM'lık FeSO_4 Çözeltisinin Hazırlanması: 0,028 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

m) Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30,27 g Tris alındı ve 5 mM'lık 0,370 g EDTA 200 ml destile suda çözüldü pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı.

2. 10mM'lık Asetilkolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması: 0.145 g Asetilkolin iyodat alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması: 0.01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat alındı 50 ml destile suda çözüldü.

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

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

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

3.3.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması

Alınan taze insan eritrositleri hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için $+4^\circ\text{C}$ 'de 10.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklı dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

3.3.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

a). Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, 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:

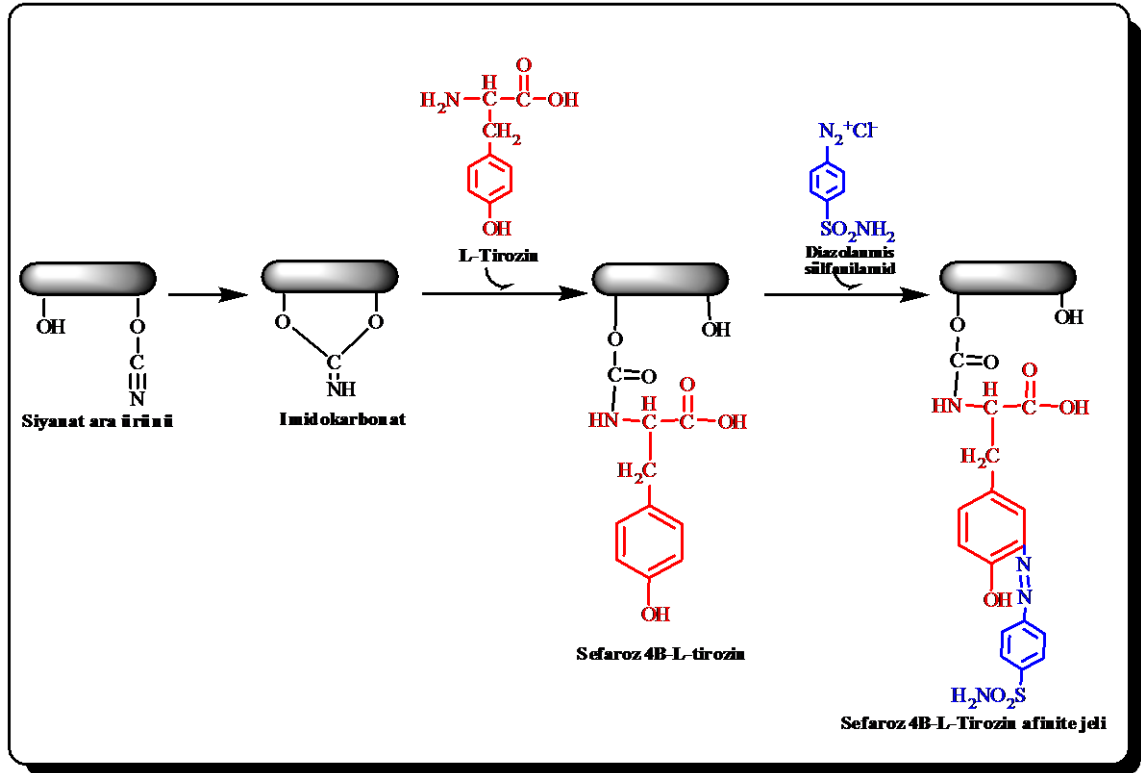
b) CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve 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 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH: 8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

c) Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05

M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1’de gösterildi (Öztürk Sarıkaya 2009).



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

d) Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspansiyonu olarak 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 eluat ile tamponun 280 nm’de absorbanlarının ve pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

e) Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

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

3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini

3.4.1. Hidrataz aktivitesi

Bu amaçla öncelikle hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Rickli *et al.* 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 1ml veronal tamponu (pH:8.2, 0.025 M), 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 ediledive yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre (t_c) bir kronometre vasıtasıyla belirlendi.

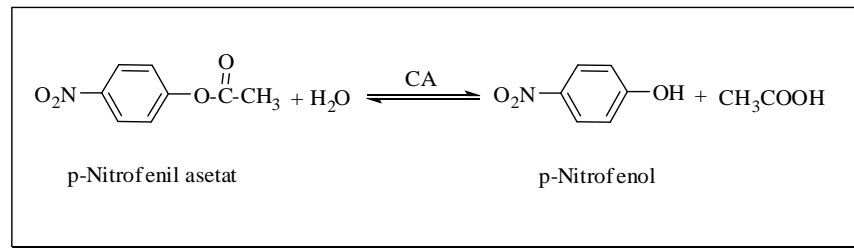
Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzim olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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

3.4.2. Esteraz aktivitesi

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



Şekil 3.2. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorpsiyon göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967; Göçer and Gülçin 2013). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 3 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri

için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

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	300

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

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

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sifıra ayarlandı. Yapılan deneylerde kullanılan *p*-

nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Kalitatif protein tayini

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

3.5.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim 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 absorbans 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 absorbans değerleri okundu.

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

3.6. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

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

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

3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü

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-merkaptolanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin %20 ayırma jelinde elektrofrezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban *et al.* 2008).

3.8. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in Etkilerinin Belirlenmesi

Sinefrin ve Fenilefrin'in, saflaştırılacak olan CA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hem hidrataz hem de esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

3.9. Antioksidan Çalışmaları

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

İndirgeme kuvveti tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmiş şekline göre yapıldı (Gülçin 2009). Bunun için öncelikle 1mg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözülden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere aktarıldı, hacim destile suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml fosfat tamponu (0,2 M, pH:6,6) ve 2,5 ml %1'lik 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 alındı ve bunun üzerine 2,5 ml destile su ve 0,5 ml FeCl₃ (%0,1) ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

3.9.2. Cu⁺²-Cu⁺ indirgeme kapasitesi

Fenolik yapıdaki bileşiklerin Cu⁺² indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif bir modifikasyonu ile yapıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşik tüplerine 0,25 ml CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M) ve 0,25 ml CH₃COONH₄ tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

3.9.3. FRAP indirgeme aktivitesi

Total antioksidan için hazırlanan stok çözelti bu deneyde de kullanılır. Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde Sinefrin ve Fenilefrin maddeleri ve standart çözeltiler aktarılır. Hacimleri 0,5 ml'ye tampon çözelti ile tamamlanır. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µl, 20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi ve 2250 µl FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 ml'ye tamamlanır. Deney

tüpleri Vortex'de karıştırılır ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbansları kaydedilir. Kör olarak asetat tamponu kullanılır

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

Fenolik yapıya sahip bileşiklerin metal şelatlama aktiviteleri Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (Dinis *et al.* 1994). Bu işlem için 2 mM'lik ve 0,05 ml $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve 0,35 ml saf su içeren çözelti, değişik konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde değişik miktarlarda fenolik bileşik ihtiva eden 0,2 ml'lik çözeltiliye ilave edildi. Son hacim 4 ml olacak şekilde destile etanol ilave edildi. Reaksiyon 0,2 ml ve 5 mM'lik ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı.

Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak da fenolik bileşikli numune hariç geriye kalan çözelti kullanıldı.

3.9.5. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi

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

3.9.6. Süperoksit anyon radikali (O_2^-) giderme aktivitesi

Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikalleri giderme etkisi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Bu amaçla Zhishen ve arkadaşlarının kullandığı metod hafif bir modifikasyonla kullanıldı (Zhishen *et al.* 1999). Daha önce hazırlanan stok çözelti bu amaç için de kullanıldı. Bunun için numune ve standartların farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lık ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazırlandı. Numune içeren tampon çözeltiye riboflavin, metiyonin ve NBT'den $1,33 \times 10^{-5}$, $4,46 \times 10^{-5}$ ve $8,15 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonlarına denk gelen miktarları sırasıyla ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 40 dakika boyunca 20 W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Absorbans, sudan oluşan köre karşı 560 nm'de kaydedildi.

3.9.7. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (Blois 1958). Serbest radikal olarak DPPH'nin 10^{-3} M'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıya 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir nümune tüpüne stok DPPH' çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH' çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH' çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

3.9.8. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlendi (Re *et al.* 1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45

nM'luk persulfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretilildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbanı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan fenolik asitlerin farklı konsantrasyonlarına (10-30 µg/ml) birer ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanlar kaydedildi.

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

N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Fogliona 1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon ($DMPD^{++}$) elde edildi. Bunun için 100 ml'lik DMPD çözeltisinin (pH: 5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 ml $FeCl_3$ ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 ml'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı. $DMPD^{++}$ radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik dansitesi 0,1 M'luk ve pH'ı 5,3 olan fosfat tamponu ile $0,900 \pm 0,100$ nm'ye ayarlandı. Günlük taze olarak hazırlanan $DMPD^{++}$ çözeltisinin absorbanı 12 saate kadar sabittir.

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

3.9.10. Total antioksidan aktivite tayini

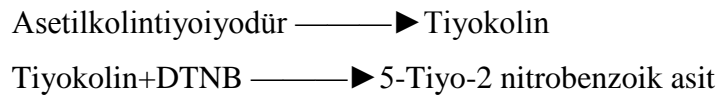
Sinefrin ve Fenilefrin'in antioksidan aktiviteleri tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Yen and Chen 1995). Bu amaçla daha önce hazırlanan Sinefrin ve Fenilefrin'in stok çözeltisi hazırlandı. İstenilen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözelti vezin kaplarına otomatik pipetlerle aktarıldı ve toplam hacim tampon çözelti (0,01M'luk 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°C'de ve karanlıkta gerçekleştirildi. Her 12 saatte bir vezin kaplarından 100'er µl alınarak içerisinde 4,7 ml etanol bulunan deney tüplerine aktarıldı ve sırasıyla 100 µl Fe⁺² çözeltisi ve 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. Kör numune ise 4,8 ml etanola 100 µl Fe⁺² çözeltisi ve 100 µl SCN⁻ çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları köre karşı okundu. İnkübasyon işlemine kontrolün maksimum absorbansa ulaşınca kadar devam edildi.

3.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in Etkilerinin Belirlenmesi

Sinefrin ve Fenilefrin'in, Asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Asetilkolinesteraz yöntemiyle yapıldı. Daha sonra I₅₀ ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin 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, 0. ve 5. dakikadaki absorbansları ölçülür.



Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın küvet içeriği

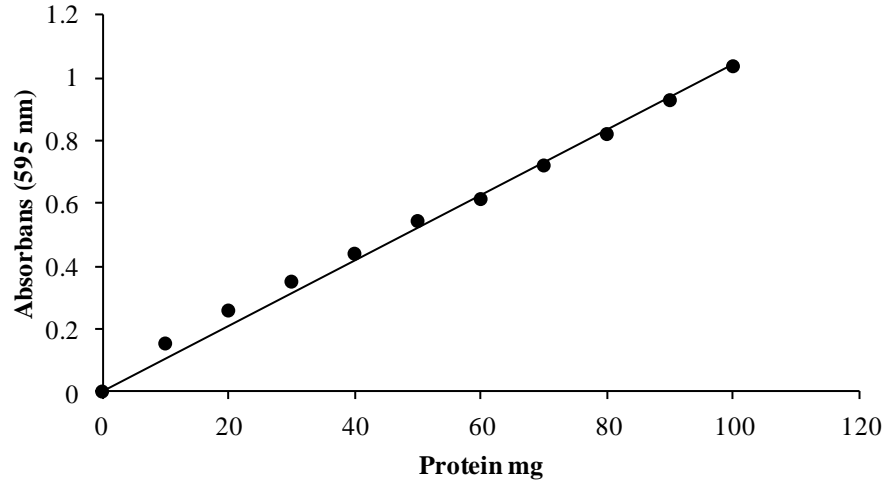
Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Çalkalanır ve 30°C’de 5 dakika inkübe edilir.		
Asetilkolintiyoiyodür	50	50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'ten elde edilen denklemden hesaplandı (r^2 : 0,9928).

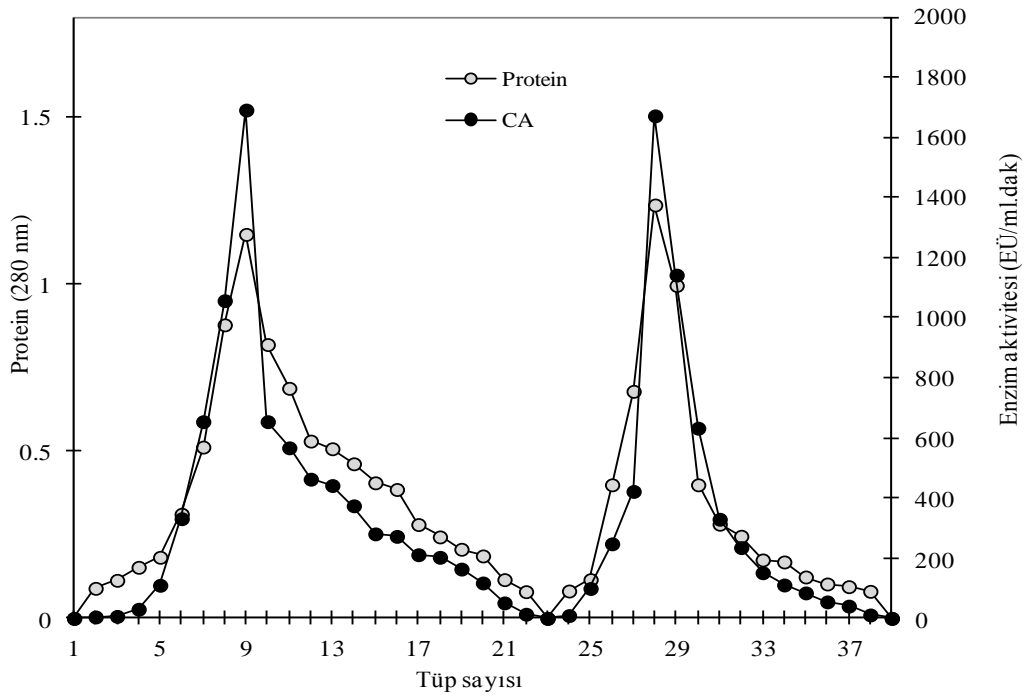


Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik

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

İnsan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı. Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona yüklendi. Kolondan önce 1

M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) tamponu geçirilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterildi.



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

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

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

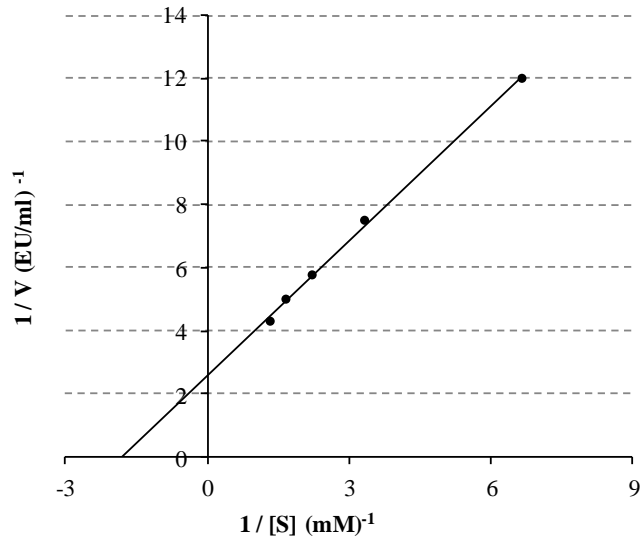
Çizelge 4.1. Afinite kolonundan insan eritrositlerinden elde edilen hemolizatın ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin saflaştırma sonuçları

Numune Türü		Aktive (EÜ/ml)	Toplam hacim(ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		1202,03	26,50	41,25	1093,13	31853,80	29,14	100	1
Sepharose-4B- L-tirozin- sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	CA- I	1213,45	10,50	0,19	1,99	12741,23	6402,63	40,00	219,72
	CA-II	2468,80	6,00	0,13	0,78	14812,80	18990,77	46,50	651,71

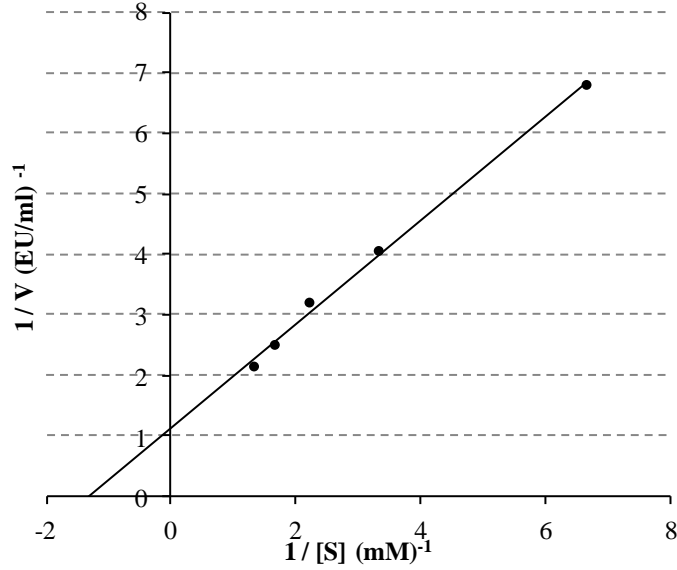
4.1.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları

a) Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmaların sonuçları

İnsan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az beş farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ve bu grafiklerden K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.3 ve 4.4).



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

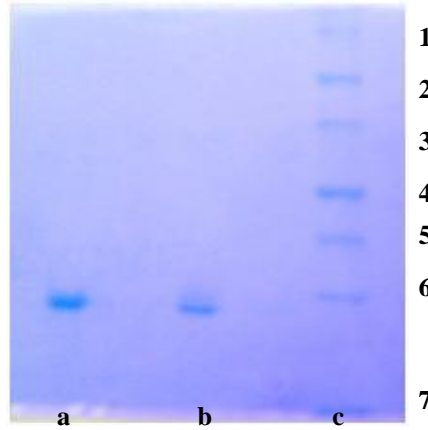


Şekil 4.4. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak bulundu. hCA I izoenzimi için K_m 0,552 mM, V_{max} 0,338 ise EU/ml.dak olarak hesaplandı. hCA II izoenzimi için K_m 0,762 mM, V_{max} 0,888 ise EU/ml.dak olarak hesaplandı.

4.1.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

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



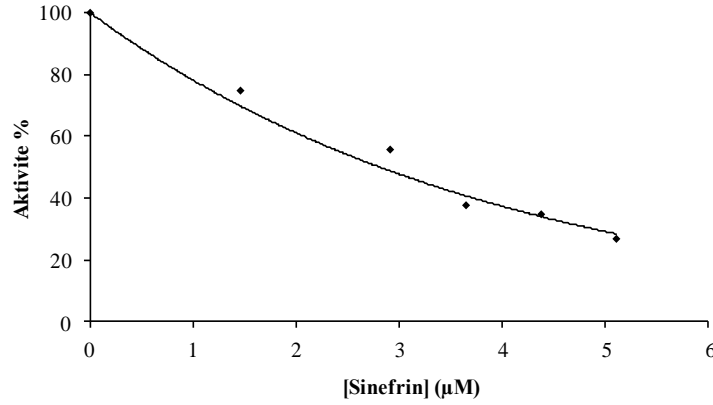
Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı

* a: hCA II, b: hCA I, c: Standart proteinler (1: 250 kDa 2: 150 kDa 3: 100 kDa, 4: 70 kDa 5: 50 kDa 6: 30 kDa 7: 15kDa)

4.1.6. hCA I ve hCA II izoenzimleri hidrataz aktiviteleri üzerine Sinefrin'in inhibisyon etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

a) hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ile ilgili sonuçları

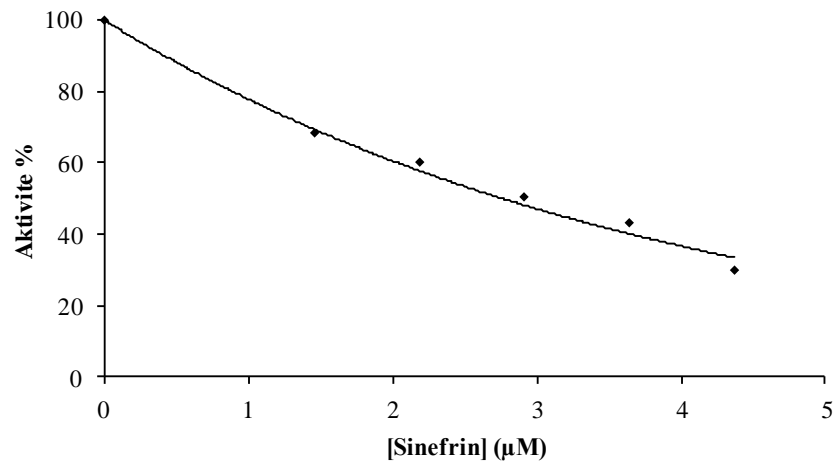
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA I izoenzimi için Sinefrin'in, saflaştırılacak olan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Sinefrin için Aktivite (%) - [I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Sinefrin konsantrasyonu (I_{50} değerleri) hesaplandı. Şekil 4.6'den elde edilen $y:100e^{-0,247x}$ denkleminde Sinefrin için I_{50} değerinin nasıl bulunduğunu hesaplandı.



Şekil 4.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 6 farklı Sinefrin konsantrasyonunda I_{50} değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği

b) hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA II izoenzimi için Sinefrin'in, saflaştırılacak olan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Sinefrin için aktivite(%)-[I] grafiği çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Sinefrin konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı.



Şekil 4.7. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda [Sinefrin] değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Sinefrin] grafiği

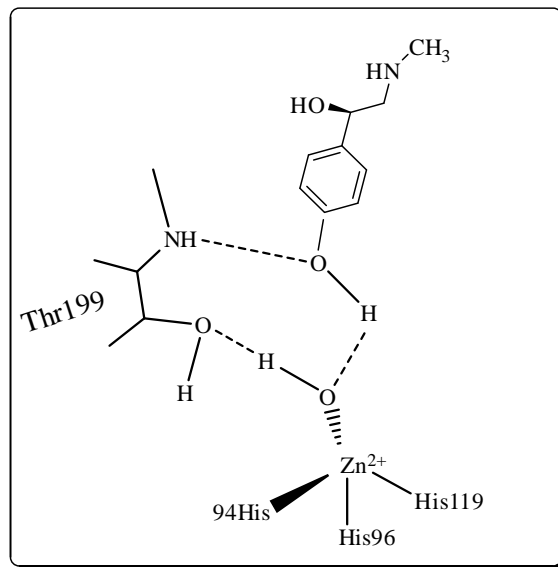
c) hCA I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin'in [IC₅₀] değeri sonuçları

Aktivite(%)-[Sinefrin] grafikği çizilen Sinefrin'in daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Sinefrin konsantrasyonları [Sinefrin] değerleri hesaplandı. Tüm verilerin daha iyi görülebilmesi için bu değerler bir tablo halinde gösterildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin'in %50 inhibisyona sebep olan Sinefrin konsantrasyonları IC₅₀ değerleri

İzoenzimler	[IC ₅₀] (μM)
hCA I	2,805
hCA II	2,760

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² iyonuna hidroksil ve metoksi gruplarının iyonik etkileşimle veya direk bağlanarak inhibisyon gösterdiği sanılmaktadır. Sinefrin'in bağlanma modeli aşağıdaki gibi önerilmiştir.



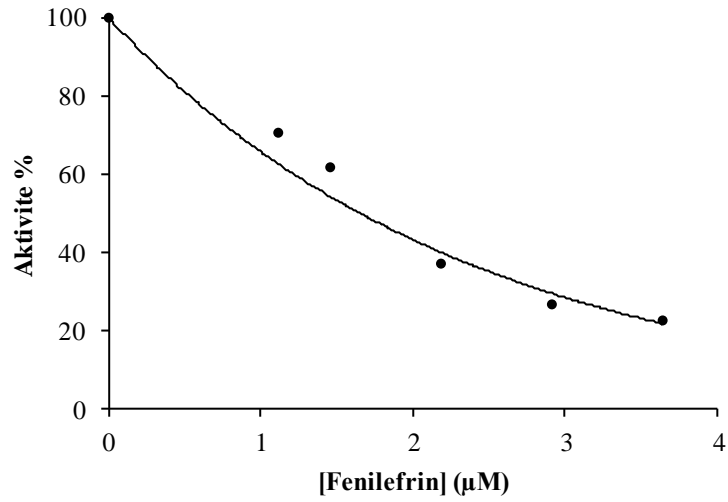
Şekil 4.8. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² iyonuna fenolik bir antioksidan olan Sinefrin'in bir inhibitör bağlanma modeli

4.1.7. hCA I ve hCA II izoenzimleri hidrataz aktiviteleri üzerine Fenilefrin'in inhibisyon etkisinin belirlenmesiyle ilgili sonuçlar

a) hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA I izoenzimi için Fenilefrin'in, saflaştırılacak olan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin için Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Fenilefrin konsantrasyonu (IC₅₀ değerleri) hesaplandı.

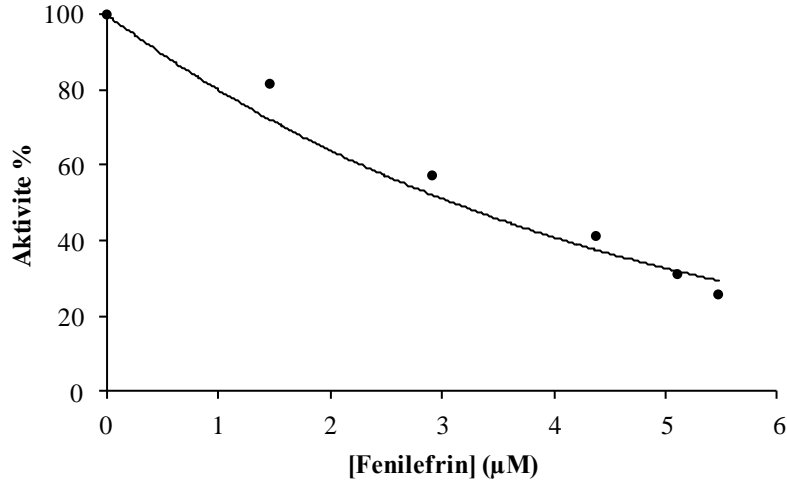
Şekil 4.9'dan elde edilen $y:100e^{-0,42x}$ denkleminde Fenilefrin için I₅₀ değerinin nasıl bulunduğunu hesaplandı.



Şekil 4.9. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda I₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği

b) hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA II izoenzimi için Fenilefrin'in saflaştırılacak olan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin için Aktivite(%)-[Fenilefrin] grafikği çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Fenilefrin konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı.



Şekil 4.10. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda [Fenilefrin] değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Fenilefrin] grafiği

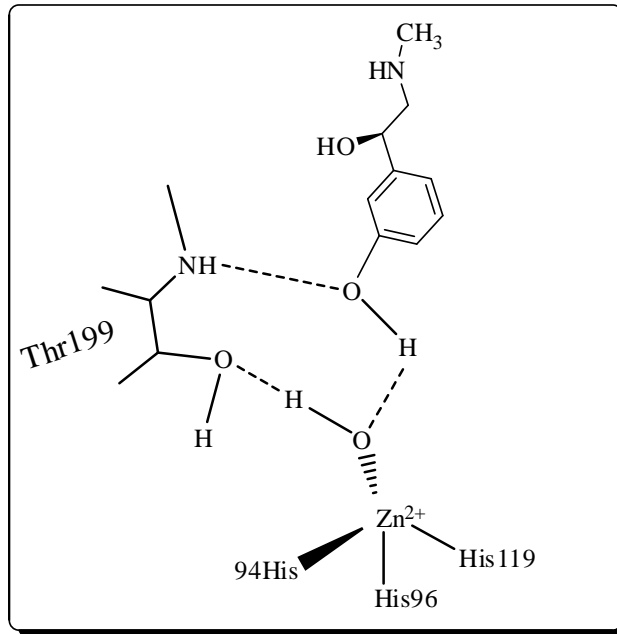
c) hCA I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin'in [IC_{50}] değeri sonuçları

Aktivite(%)-[Fenilefrin] grafikği çizilen Fenilefrin'in daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Fenilefrin konsantrasyon değerleri hesaplandı. Ve tüm verilerin daha iyi görülebilmesi için bu değerler bir tablo halinde gösterildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Fenilefrin'in %50 inhibisyona sebep olan Fenilefrin konsantrasyonları IC₅₀ değerleri

İzoenzimler	[IC ₅₀] (µM)
hCA I	1,640
hCA II	3,093

Fenilefrin'nin bağlanma modeli aşağıdaki gibi önerilmiştir.

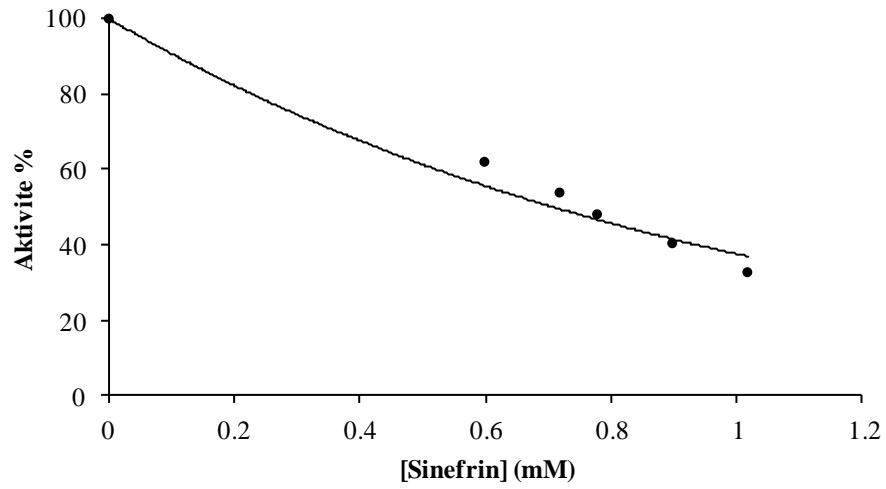


Şekil 4.11. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² iyonuna fenolik bir antioksidan olan Fenilefrin'in bir inhibitör bağlanma modeli

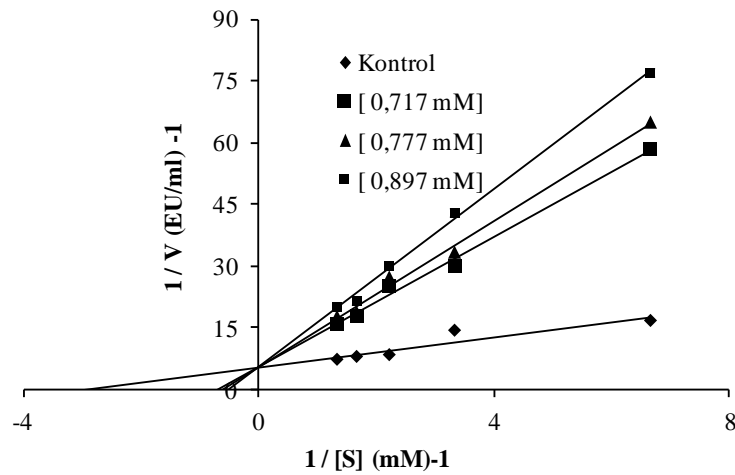
4.1.8. hCA I ve hCA II izoenzimleri esteraz aktiviteleri üzerine bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

a) hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin bileşikleriyle ilgili sonuçları

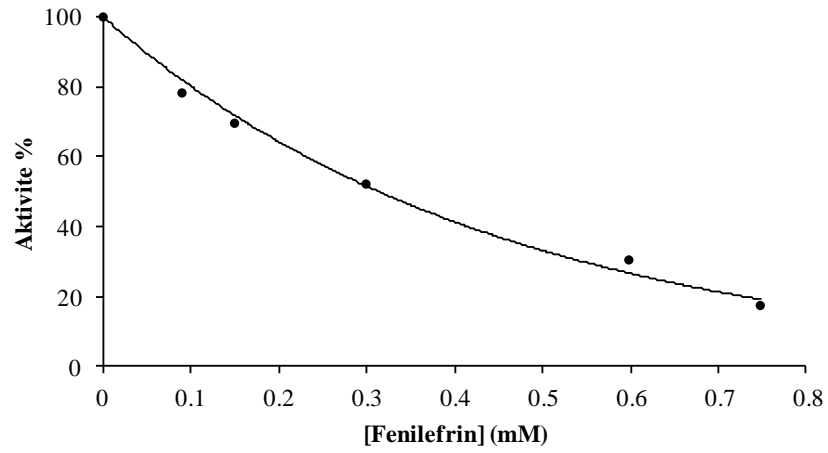
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA I izoenzimi için Sinefrin ve Fenilefrinin, saflaştırılan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi.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



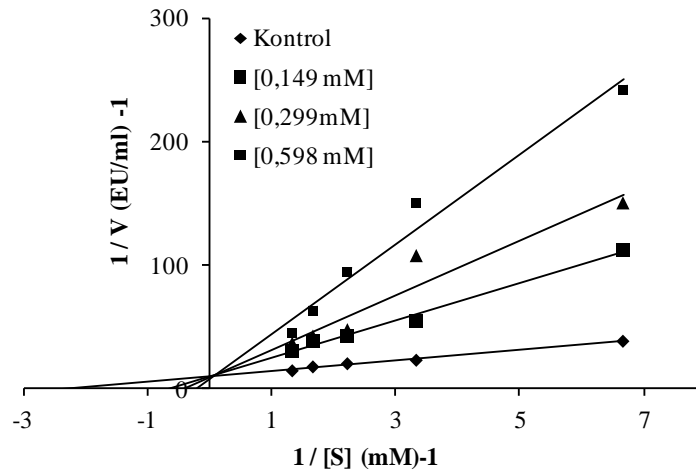
Şekil 4.12. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği



Şekil 4.13. hCA I izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.14. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği



Şekil 4.15. hCA I izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

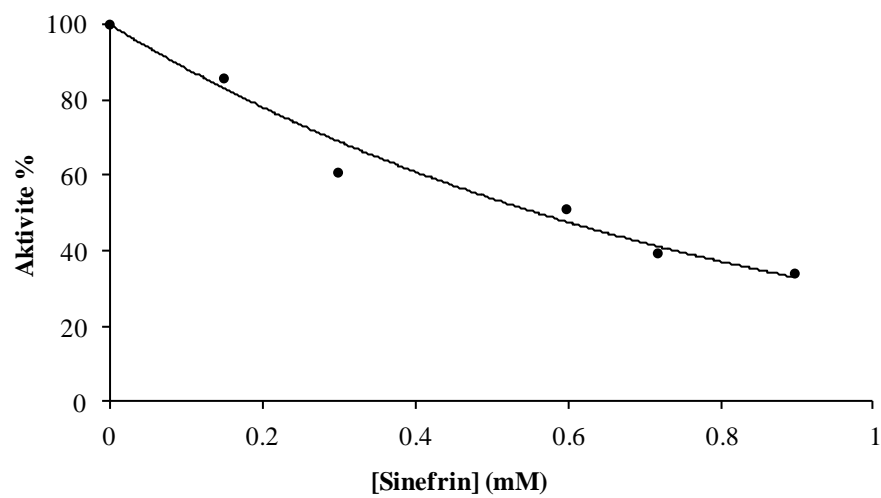
Çizelge 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50} (mM)	K_i Ortalama (mM)	R^2	İnhibisyon türü
Sinefrin	0,707	0,199	0.953	Yarışmalı
Fenilefrin	0,313	0,065	0.986	Yarışmalı

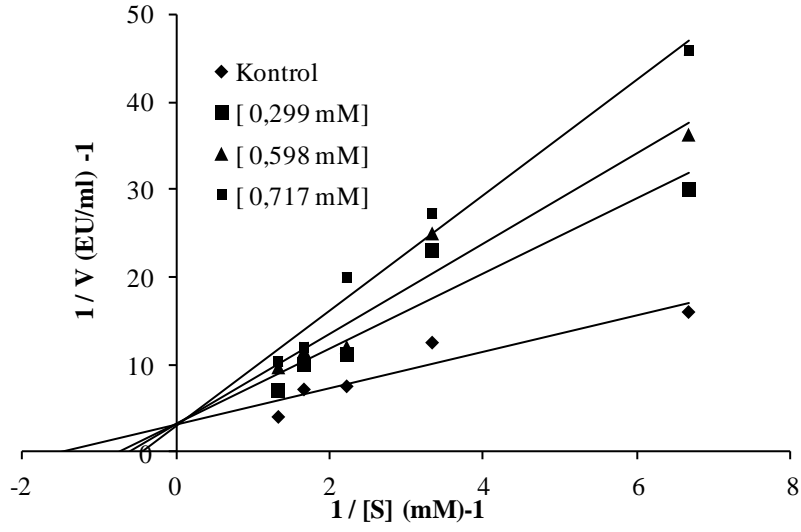
b) hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA II izoenzimi için Sinefrin ve Fenilefrinin, saflaştırılan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

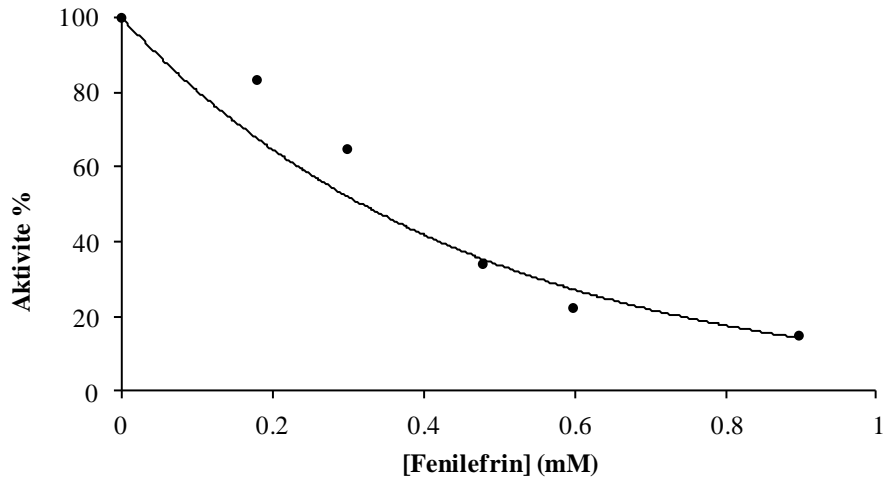
Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her iki madde için aktivite (%) - [I] ve K_i grafikleri çizildi. Ve çizilen grafiklerden her bir madde için K_i değerleri hesaplandı.



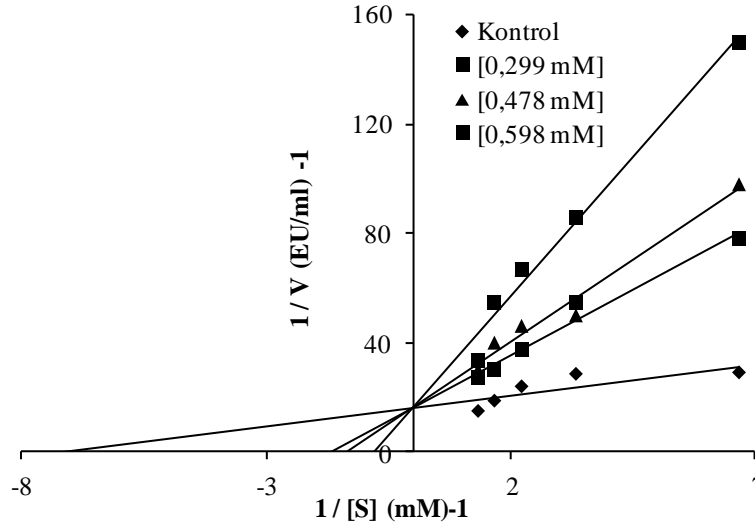
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Sinefrin] grafiği



Şekil 4.17. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği



Şekil 4.19. hCA II izoenzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.5. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrinin K_i değerleri ve inhibisyon türleri

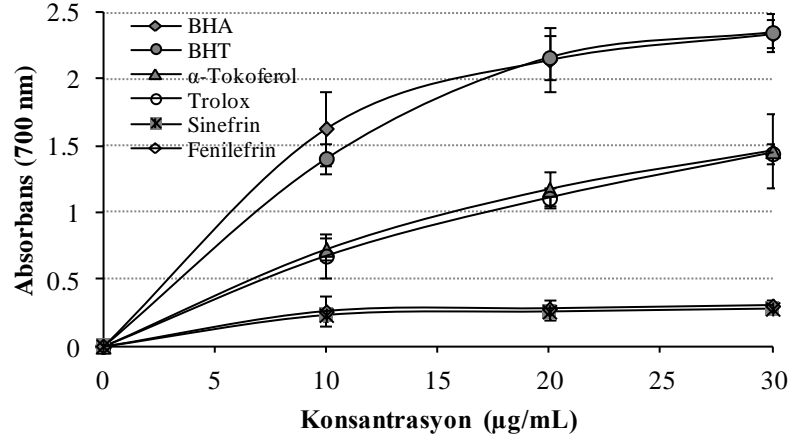
İnhibitör	IC ₅₀ (mM)	K _i Ortalama (mM)	R ²	İnhibisyon türü
Sinefrin	0,559	0,336	0,972	Yarışmalı
Fenilefrin	0,318	0,092	0,954	Yarışmalı

4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.2.1. Fe⁺³-Fe⁺² indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlarda yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006a). Çalışmada kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin'in indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Sinefrin ve Fenilefrin'in indirgeme potansiyel farklı

konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbanları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.20).



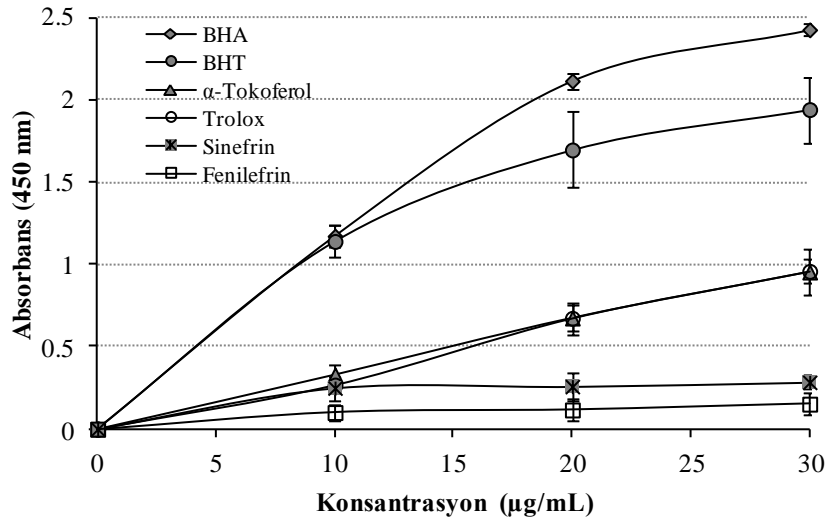
Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) Sinefrin ve Fenilefrin'in ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Sinefrin ve Fenilefrin'in ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.20.) her bir standart antioksidan ve Sinefrin ve Fenilefrin için 20 µg/ml'ye karşılık gelen absorban değerleri Çizelge 4.6'de verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları $BHT > BHA > \alpha$ -Tokoferol $>$ Troloks $>$ Fenilefrin $>$ Sinefrin şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.6'da gösterilen yüksek absorban değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

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

Sinefrin ve Fenilefrin'in kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Sinefrin ve Fenilefrin'in kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 µg/ml) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbanları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.21). Sinefrin, Fenilefrin ve standart

antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.21) her bir standart antioksidan, Sinefrin ve Fenilefrin için 20 $\mu\text{g/ml}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.6'da verilerek birbirleriyle mukayese edildi.



Şekil 4.21. Sinefrin ve Fenilefrin'in farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/ml}$) kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında BHA > BHT > Troloks = α -Tokoferol > Sinefrin > Fenilefrin şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi.

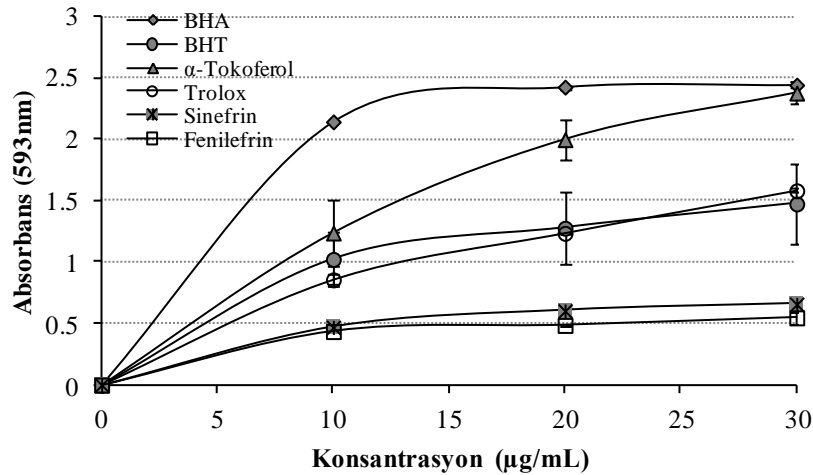
Çizelge 4.6. Sinefrin ve Fenilefrin'in 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla mukayesesi

Antioksidanlar	Fe^{+3} İndirgeme Metodu	Kuprak Metodu	FRAP Metodu
BHA	2,145	2,115	2,426
BHT	2,163	1,696	1,277
α-Tokoferol	1,176	0,674	1,998
Troloks	1,109	0,673	1,235
Sinefrin	0,258	0,258	0,603

Fenilefrin	0,278	0,116	0,485
-------------------	-------	-------	-------

4.2.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

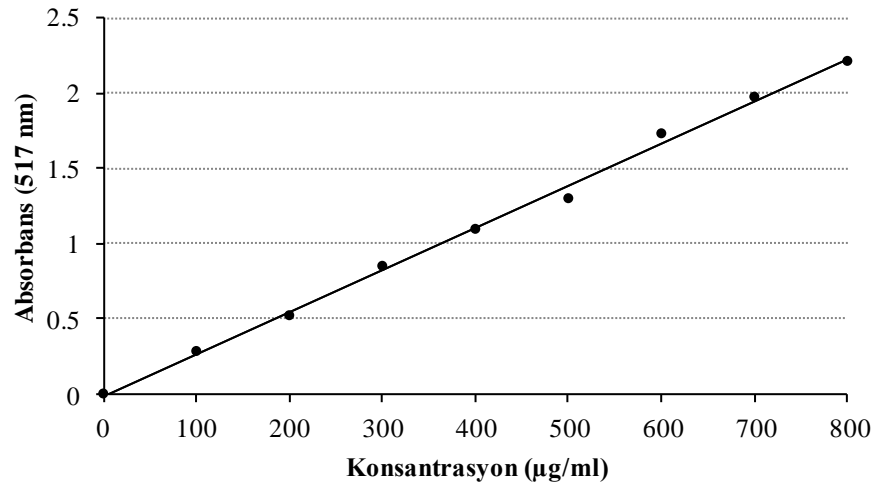
FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottur. Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{+2}) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluştur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm’de maksimum absorbands gösterir. Sinefrin ve Fenilefrin’in FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.22). Ayrıca Sinefrin ve Fenilefrin’in standart antioksidanlarla mukayesesi yapıldı ve BHA > α -Tokoferol > BHT > Trolox > Sinefrin > Fenilefrin şeklinde bir sıralama gözlemlendi. Çizelge 4.6’da ise 20 μ g/ml’deki absorbandslarının mukayese edildi.



Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin’in FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

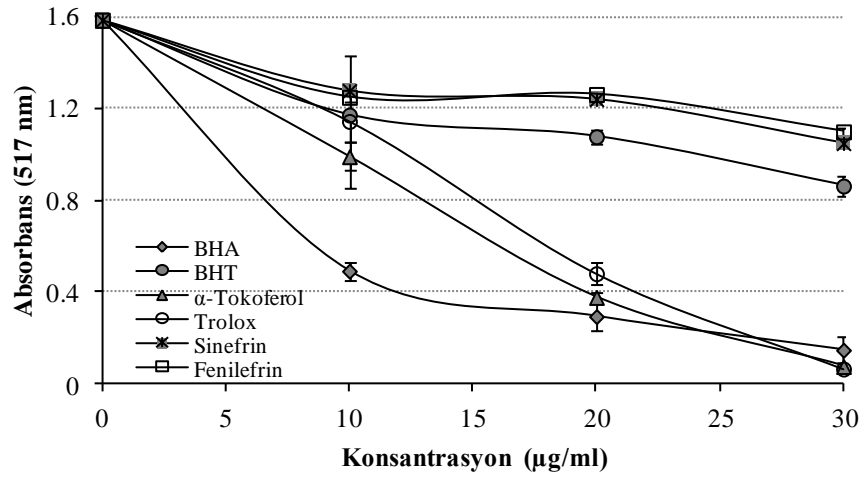
4.2.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Sinefrin, Fenilefrin ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9969) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.24'de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



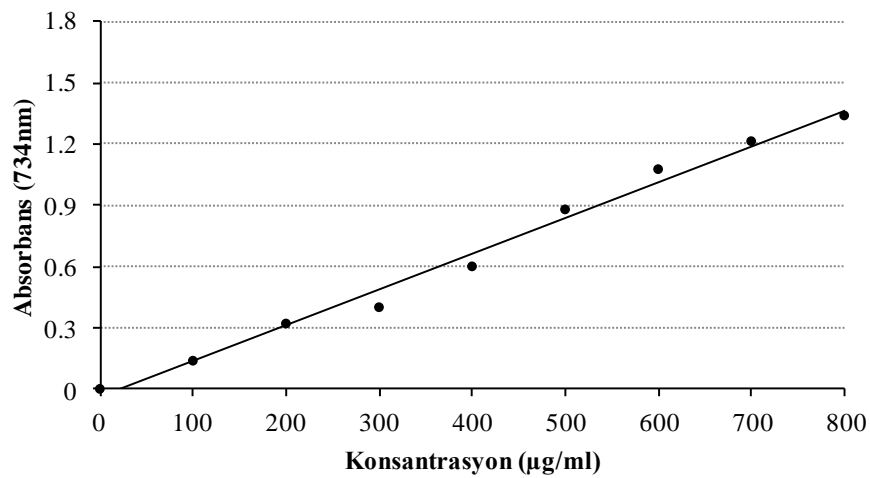
Şekil 4.24. Sinefrin ve Fenilefrin'in farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve trolox ile karşılaştırması

Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.24) her bir standart, Sinefrin ve Fenilefrin'in için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri

hesaplandı (Çizelge 4.7) Sinefrin, Fenilefrin'in ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler: α -Tokoferol > Troloks > BHA > BHT > Sinefrin > Fenilefrin şeklindedir.

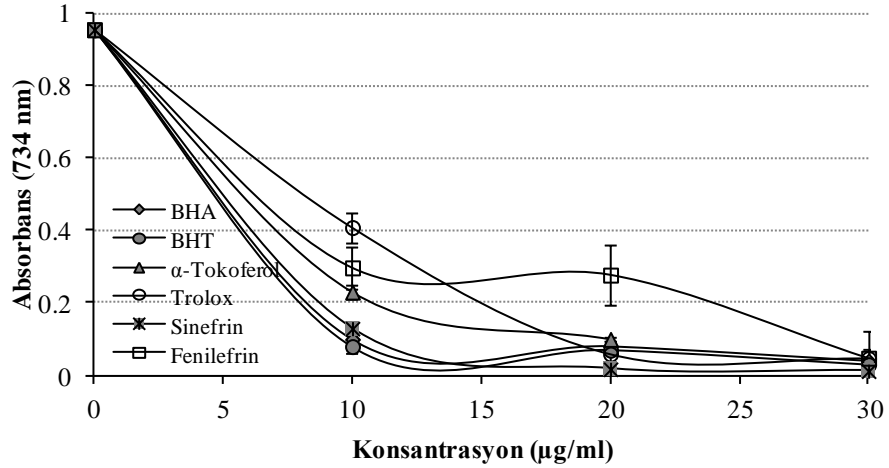
4.2.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS⁺ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstraların veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller 1996; Gülçin *et al.* 2007b). Bunun için öncelikle ABTS'den ABTS⁺'nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 4.25'de görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiliye 2,45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbans değeri 0.750±0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi. Bu aşamadan sonra Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinde çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS⁺ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 :0,9916) (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS⁺ için hazırlanan standart grafik

Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks kullanıldı (Şekil 4.26).

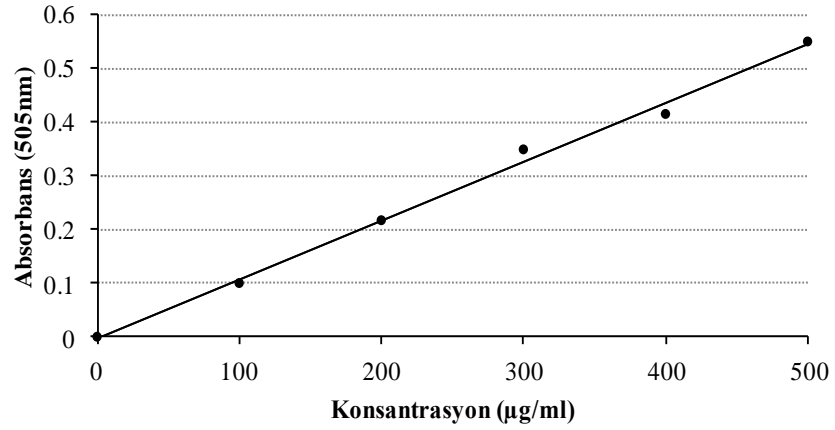


Şekil 4.26. Farklı konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin'in (10-30 $\mu\text{g/ml}$) ABTS^{+} giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinin ABTS^{+} radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.26) her standart ve Sinefrin ve Fenilefrin için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7). Sinefrin, Fenilefrin'in ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS^{+} giderme aktivitesi sergilediler: Sinefrin > BHA > BHT > α -Tokoferol > Troloks > Fenilefrin şeklindedir

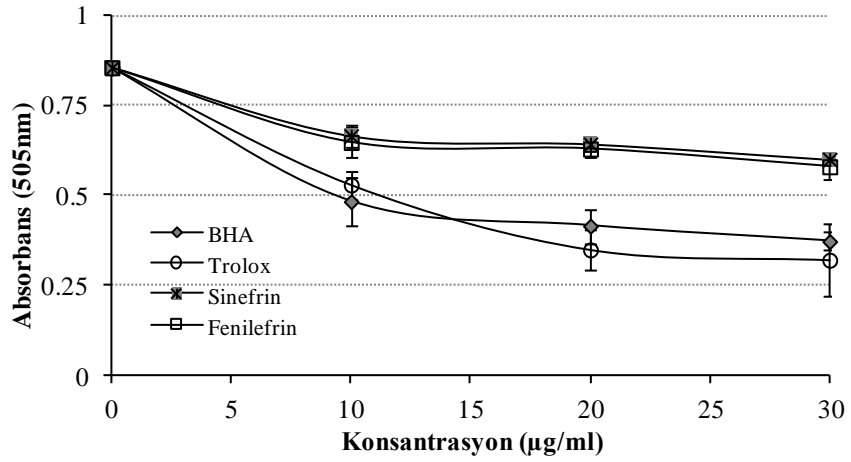
4.2.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin çözeltileri, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DMPD^{+} giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (Şekil 4.27). DMPD^{+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD^{+} miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.



Şekil 4.27. DMPD⁺ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

Pozitif kontrol olarak BHA ve Troloks kullanıldı (Şekil 4.28).

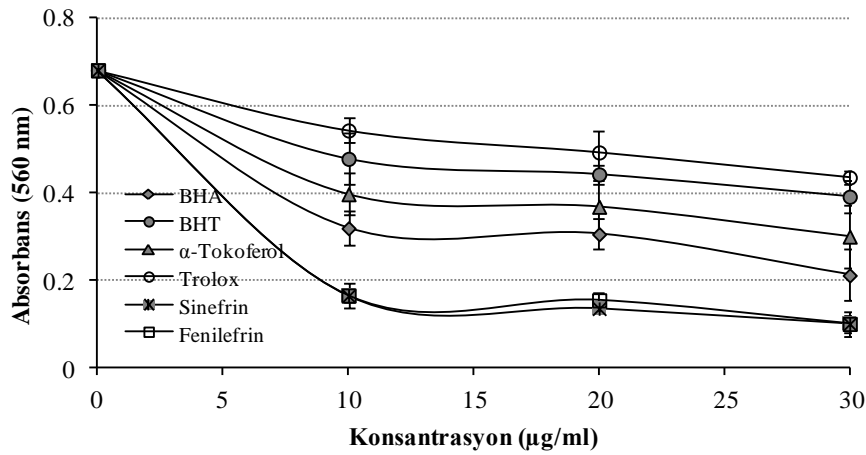


Şekil 4.28. Sinefrin ve Fenilefrin'in (10-30 µg/ml) konsantrasyonundaki DMPD⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve Troloks ile karşılaştırması

Sinefrin ve Fenilefrin çözeltisinin DMPD⁺ radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.28). Sinefrin ve Fenilefrin çözeltileri ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DMPD⁺ giderme aktivitesi Troloks > BHA > Fenilefrin > Sinefrin

4.2.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Sinefrin ve Fenilefrin'in süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi riboflavin / metiyonin / ışık metoduna göre yapıldı.



Şekil 4.29. Sinefrin ve Fenilefrin'in çözeltisinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

Sinefrin, Fenilefrin ve kullanılan standart antioksidanlar sırasıyla şu şekilde süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi sergilediler: Fenilefrin > Sinefrin > BHA > α-Tokoferol > BHT > Troloks.

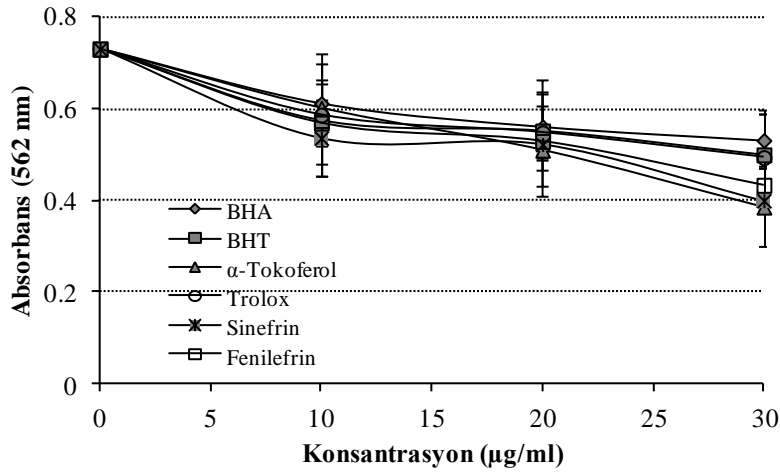
Çizelge 4.7. Sinefrin ve Fenilefrin çözeltilerinin DPPH·, ABTS⁺, DMPD⁺ ve O₂⁻ radikali giderme ve (Fe⁺²) metal şelatlama, bipiridil metal şelatlama aktivitelerinin IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.

	DPPH· Giderme	ABTS ⁺ Giderme	DMPD ⁺ Giderme	O ₂ ⁻ Giderme	(Fe ⁺²) Metal şelatlama	Bipiridil Metal şelatlama
BHA	8,35	5,17	21,65	16,50	57,75	7,87
BHT	33,00	5,37	**	33,00	49,50	6,93
α-Tokoferol	7,78	5,82	**	23,10	34,65	15,40
Troloks	7,87	6,30	18,73	43,31	49,50	10,50
Sinefrin	49,50	4,20	49,50	9,36	34,65	5,73
Fenilefrin	53,30	7,70	46,20	8,77	38,50	5,82

**DMPD⁺ giderme metodunda her iki standart antioksidan bileşik aktivite göstermemektedir (Gülçin 2008).

4.2.8. Ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesi ile ilgili bulgular

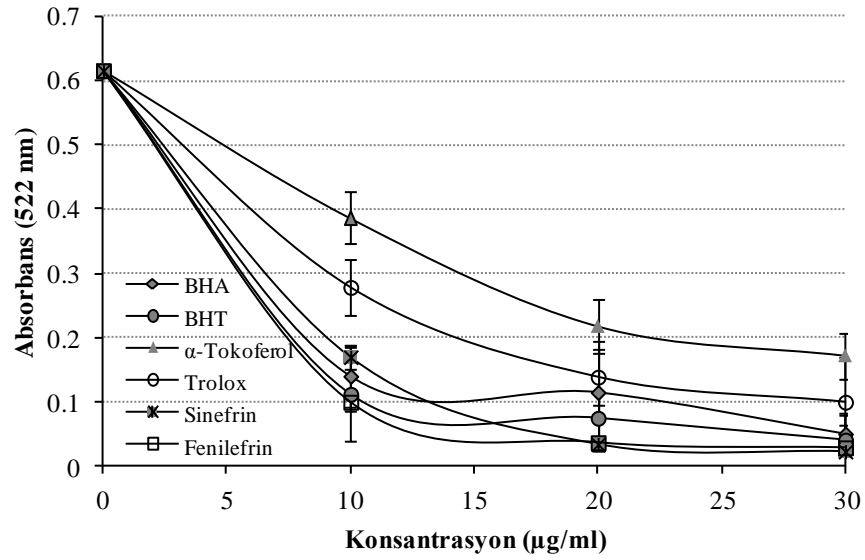
Sinefrin ve Fenilefrin'in ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri Ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama metoduna göre belirlendi. Bu tayinde farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyonlarına karşılık gelen grafik çizilerek IC_{50} değerleri grafikten hesaplandı ve Çizelge 4.7'de verildi. Sinefrin, Fenilefrin've kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) şelatlama kapasiteleri Sinefrin = α -Tokoferol > Fenilefrin > Troloks = BHT > BHA şeklinde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g/ml}$) Sinefrin ve Fenilefrin'in ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.

4.2.9. Bipiridil metal şelatlama bulguları

Sinefrin ve Fenilefrin'in ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil kullanılarak belirlendi. Bu tayinde farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g/ml}$) konsantrasyonlarına karşılık gelen grafik çizilerek IC_{50} değerleri grafikten hesaplandı ve Çizelge 4.7'de verildi. Sinefrin, Fenilefrin've kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla bipiridil metal şelatlama kapasitelerinin mukayesesinde Sinefrin > Fenilefrin > BHT > BHA > Troloks > α -Tokoferol şeklinde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml) Sinefrin ve Fenilefrin'in bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

4.2.10. Total antioksidan aktivite bulgular

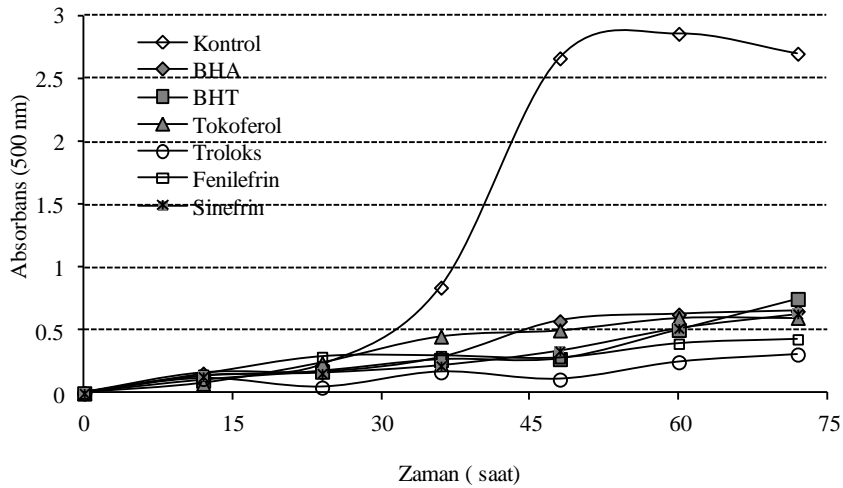
Sinefrin ve Fenilefrin'in total antioksidan aktivitesi "Tiosiyanat Metoduna" göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) ferrik iyonlarına (Fe^{+3}) yükseltger.

Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları (Fe^{+3}) tiosiyanat (SCN^-) ile $Fe(SCN)^{+2}$ kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleksin ise spektrofotometrik olarak 500 nm'de maksimum absorbanis göstermesi esasına dayanır. Yüksek absorbanis, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Total antioksidan aktivite Sinefrin ve Fenilefrin'in 10 µg/ml konsantrasyonundaki emülsiyonunun etanoldaki çözeltilerinin 500 nm'deki absorbanisi ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.32). Şekilde de görüldüğü gibi antioksidan aktivite, Sinefrin ve Fenilefrin'in artan miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Sinefrin ve Fenilefrin ile standart antioksidan moleküllerin 500 nm'deki absorbanisları aynı şekilde ölçülmüştür.

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

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

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 kullanıldı (Şekil 4.32).

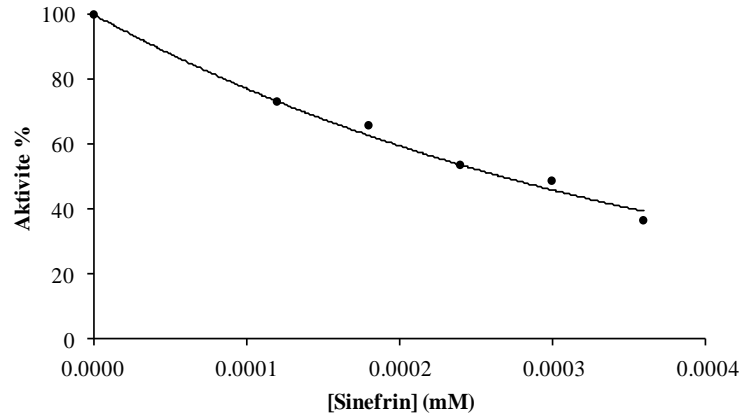


Şekil 4.32. 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlardaki Sinefrin ve Fenilefrin'in total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.

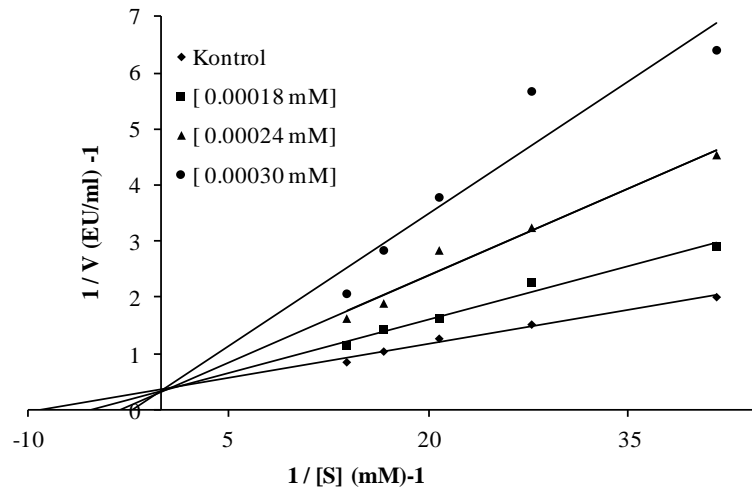
Total antioksidan aktivitesinin tayininde, linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunda 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonu için Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanlar BHA, BHT, Troloks, α -Tokoferol için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu inhibe etme miktarı sırasıyla, %81.91, %86.21, %78.10, %82.36, %91.35 ve %79.00 olarak bulundu. Ayrıca Sinefrin ve Fenilefrin'in total antioksidan aktivitesi diğer standart antioksidanlara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

4.3. Asetilkolin esteraz enziminin aktiviteyi üzerine Sinefrin ve Fenilefrin'in inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

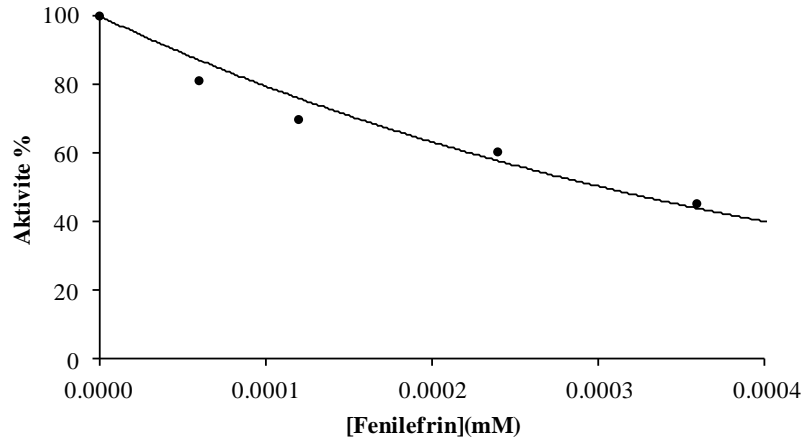
Doygun substrat konsantrasyonunda Asetilkolin esteraz enzimi için Sinefrin ve Fenilefrin'in inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler Asetilkolin esteraz yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için Aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



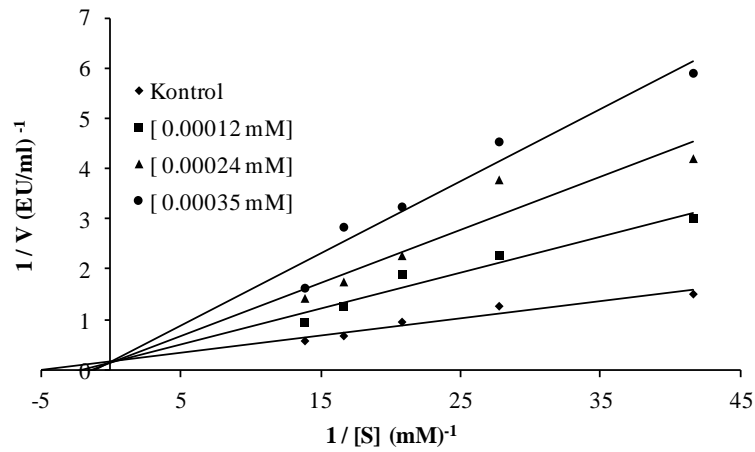
Şekil 4.33. Asetilkolin esteraz enziminin Asetilkolin esteraz yöntemiyle çalışılan beş farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Sinefrin] grafiği



Şekil 4.34. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Sinefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.35. Asetilkolinesteraz enziminin kullanılarak beş farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Fenilefrin] grafiği



Şekil 4.36. Asetilkolin esteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı Fenilefrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.8. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50} (μ M)	K_i Ortalama (μ M)	İnhibisyon Türü	R^2
Sinefrin	0,226	0,169	Yarışmalı	0.9816
Fenilefrin	0,302	0,088	Yarışmalı	0.9765

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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

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

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

1. CA' nın monomerik bir enzim olması,
2. Moleküler kütlesi 30 kDa olarak ne çok büyük ne de çok küçük bir protein olması,
3. CA proteinin tek bir polipeptit zincirine sahip olması,
4. CA I ve CA II izoenzimlerinin en yaygın formlarının olması,
5. Polipeptit zincirinde disülfid bağının olmaması

6. Polipeptit zincirinde şeker ve fosfat gruplarının olmaması,
7. Özellikle CA II izoenziminin çok uzun olması ve hemen hemen her yerde hazır olarak satılabilmesi,
8. Diğer enzimlere nisbeten daha kolay bir saflaştırma prosedürüne sahip olması,
9. Çoğu CA izoenzimlerinin amino asit sekanslarının biliniyor olması,
10. X-Ray difraksiyon analizleriyle mevcut 16 izoenziminin 13 tanesinin yapılarının ve aktif bölgenin geometrilerinin biliniyor olması (Alterio *et al.* 2012),
11. Sadece CO₂ hidraz/dehidrataz aktivitesine sahip olması değil aynı zamanda çok yüksek bir turnover sayısına sahip karboksilik asit esterleri, fosforik asit esterleri ve hatta sülfat esterleri üzerinde de kuvvetli bir esteraz aktivitesine sahip olması (Innocenti *et al.* 2010a; Ekinci *et al.* 2012a; 2012b),
12. İnhibitörler tarafından inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve Zn⁺² iyonu ile inhibitörlerin bağlanma modelinin iyi bir şekilde karakterize edilmiş olması (Supuran 2008; Alterio *et al.* 2012; Akıncıoğlu *et al.* 2014).

Bitkilerde ve hayvanlarda şimdiye kadar CA'nın 16 tane izoenzimi bulunmuştur ve karakterizasyonu yapılmıştır (Pastarekova *et al.* 2004; Akıncıoğlu *et al.* 2013). Bitki CA enzimleri ile hayvan CA enzimleri arasında çeşitli farklılıkların olduğuna dair çalışmalarda saptanmıştır (Atkins *et al.* 1972). Enzimin bitkilerdeki molekül kütlesi 160 kDa ile 260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu tespit edilirken memelilerde molekül kütlesi ise 30 kDa civarında olduğu tespit bulunmuştur (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002).

Tez konunun belirlenmesinde bu önemli özellikler yol gösterici olmuştur ve böylelikle Sinefrin ve Fenilefrin'in hCA izoenzimi hCA I ve II üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi çalışmalarımızın ilk basamağını oluşturmaktadır. İlk olarak bu çalışma için insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırılarak Sinefrin ve Fenilefrin'in her iki izoenzim (hCA I ve II) üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

CA enzimleri canlılarda CO₂ molekülünün hidratasyonunu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen Zn⁺² iyonu içeren bir metaloenzimdir. Son 20 yıldır CA

enzimini katalitik anlamda mekanizmasını aydınlatmayı hedefleyen çok önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucu (Wistrand 1981; Chegwiddden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2001)

Çalışmalarımızda hCA I ve II izoenzimlerini saflaştırmak için kullandığımız Sepharose-4B-L-tirozin kimyasal yapısına sahip jel tarafımızdan hazırlanmıştır. Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose-4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktive edilmiştir. Biz de çalışmamızda aynı yöntem kullanılarak Sepharose-4B afinite jelini CNBr ile aktive ettik, sonra tirozin kovalent olarak bağlanmasını sağlayarak, sülfonamitte diazolarak L-tirozine kenetlendirdik. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfanilamit oluşturur. Sülfanilamit'in kullanılmasının sebebi enzimin inhibitörü olmasıdır. Bu nedenle afinite jelinde ligant olarak kullanılmıştır (Farell *et al.* 1997; Akincioğlu *et al.* 2013)

Tirozinin kullanılma amacı ise enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamaktır ve bu nedenle tirozin uzantı kolu olarak seçilmiştir. Zira CA'nın aktif bölgesi enzimin globüler yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğu X ışınları kristalografisi ile belirlenmiştir. Bu durumda hazırlanan afinite jeline belirtilen derinliğe erişebilmek için istenilen uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. L Tirozin afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında etkili olmuştur (Chegwiddden *et al.* 2000). Hazırlanan jel kullanılarak hCA I ve II izoenzimleri direk hemolizattan saflaştırılmıştır. Jele tutunan hCA I ve 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 kullanılmıştır. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-PAGE uygulanmış ve hCA I ve II için tek bant gözlenmiştir (Şekil 4.19). Enzimin bulunan yaklaşık molekül ağırlığı 30 KDa ağırlığındadır ve literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Kitchen *et al.* 1973).

hCA I'in spesifik aktivitesi 6402,63 EU/mg olup %40 verimle saflaştırıldı. Diğer taraftan hCA II izoenzimi ise spesifik aktivitesi 18990,77 EU/mg olup, %46,5 verimle saflaştırıldı. Ayrıca afinite kolonundan taze insan kanından elde edilen hemolizatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları Çizelge 5.1'de verildi.

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

Numune Türü		Aktive (EÜ/ml)	Toplam hacim(ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		1202,03	26,50	41,25	1093,13	31853,80	29,14	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	CA- I	1213,45	10,50	0,19	1,99	12741,23	6402,63	40,00	219,72
	CA-II	2468,80	6,00	0,13	0,78	14812,80	18990,77	46,50	651,71

K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması için yapılan çalışmada Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan K_m ve V_{max} değerleri ise hCA I izoenzimi için sırasıyla 0,552 mM, 0,338 EU/ml.dak iken hCA II için ise sırasıyla 0,762 mM, 0,888 EU/ml.dak olarak hesaplandı (Şekil 4.3 ve 4.4).

Protein saflaştırma teknikleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan teknik afinite kromatografisi tekniğidir. Bu teknik beraberinde biyoteknoloji, biyokimya ve tıp alanında saf enzim elde etmeyi getirdiği için tercih edilen önemli bir teknik olmuştur. Çalışmalarımız süresince, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları, eşit hacimde alınıp bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Afinite kromatografisi ile CA enzimlerinin saflaştırılması sırasında elüatların protein muhtevaları 280 nm de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan aromatik halka içeren amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır (Segel 1968).

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

Çalışmamızda kalitatif protein tayinleri yanında kantitatif protein tayinleri de yapıldı. Bu tayinler Coomassie-Blue yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı ve tercih edilmesinin sebebi çok kısa sürede uygulanabilir olması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Enzim aktivitesi tayini için ise çalışmamızda iki yöntem kullanıldı.

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

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

Ancak hidrataz aktivitesinin ölçümü fizyolojik olarak daha fazla değer taşır. Aktivite ölçüm pH'sı hCA I ve hCA II izoenzimleri için 7,4 olarak alındı. Nedeni ise hCA I ile II izoenzimlerinin lokalize olduğu yer olan eritrositlerin normal pH'sı 7,4'tür.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede IC_{50} değerleri kullanılmaktadır. Bunun için taze insan kanından saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapılarak belirlendi. İnhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin için Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi grafikten IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan IC_{50} değerleri Çizelge 5.2'de gösterildi.

Çizelge 5.2. hCA I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları IC_{50} değerleri

İzoenzimler	Fenilefrin (μ M)	Sinefrin (μ M)
hCA I	1,64	2,81
hCA II	3,09	2,76

Sonuçlara bakıldığı zaman hCA I ve II izoenzimleri için hidrataz metodunun esteraza göre daha düşük IC_{50} değerleri verdiğini (Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4) ve bu yüzden hidrataz metodunu yani kendi substratı olan CO_2 'yi tercih ettiği özellikle gözlemlenmektedir.

Bu çalışmaların ardından hCA I ve II izoenzimleri için üç farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi ve grafikten K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 5.3. hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrinin ortalama K_i değerleri ve IC_{50} değerleri

İzoenzimler	Sinefrin		Fenilefrin	
	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)
hCA I	0,707	0,199	0,313	0,065
hCA II	0,559	0,336	0,318	0,092

Bilindiği gibi glukoma hastalığından dolayı hCA II üzerine yoğun bir şekilde inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Fenolik bileşiklerin de hCA izoenzimlerinin doğal inhibitörü olduğu bilinmektedir. Doğal kaynaklı bir fenolik bileşik olan Sinefrin'nin glukoma hastalığı için yeni ilaçların sentez ve dizaynında önemli rol oynayacağı şüphesizdir.

CA izoenzimlerinin inhibisyonu antiglokoma, antikonvulsan ve antikanser gibi farmakolojik uygulamalarda büyük öneme sahiptir. Sülfamit ve sülfonamitlerin enzimin aktif bölgesine nasıl bağlandığı ve inhibisyon kinetikleri çok iyi bilinmektedir (Akıncıoğlu 2013). CA inhibitörleri CA izoenzimlerinin fonksiyonlarını bloke etmektedir. Sayısız CA inhibitörleri dört temel grupta değerlendirilebilir:

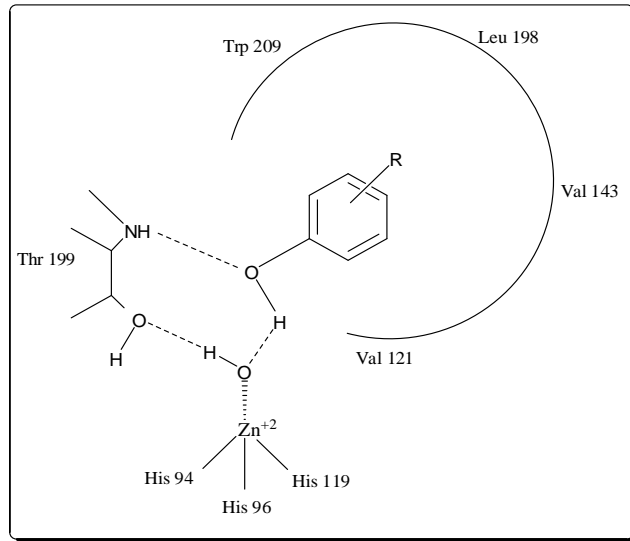
1. Sülfamit ve sülfonamitler
2. Sülfonik asit türevleri
3. Halojenürler, asitler ve tiyosiyanat gibi küçük monoanyonlar
4. Aromatik halkalar veya fenolik bileşikler

Yapılan çalışmalarda sülfamit, sülfonamit ve sülfonik asit türevlerini K_i değerlerinin pikomolardan (pM) milimolara (mM) kadar değiştiği gözlenmiştir. Hâlbuki inorganik monoanyonların K_i değerleri mikromolardan (μ M) milimolara (mM) değişen bir skalaya sahiptir (Krishnamurthy *et al.* 2008).

Son yapılan çalışmalarda sülfamitlerin sülfonamitlerden daha yüksek bir inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir (Akıncıoğlu *et al.* 2013). Benzer şekilde aromatik halkaya sahip fenolik inhibitörlerde olduğu saptanmıştır ve K_i değerleri mikromolardan

milimolara kadar değiştiği gözlenmiştir (Innocenti *et al.* 2010b; Öztürk Sarıkaya *et al.* 2011; şentürk *et al.* 2011; Balaydın *et al.* 2012; Akbaba *et al.* 2013).

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



şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli.

Yine son zamanlarda grubumuz tarafından fenol, fenol türevlerinin ve onların yerini alabilecek türevlerin tüm memeli izozimlerle etkileşimleri araştırılmıştır. Aslında, farklı izozimlerin bu fenoliklere olan inhibisyon profili, birçok basit fenol için milimolardan submikromolar arasında değişen inhibisyon sabitlerine sahip olduğu ve epeyce değişken olduğu görüldü. Bizim bu araştırmamızda Sinefrin ve Fenilefrin'nin hCA izoenzimleri ile ilgili araştırmanın yanında Sinefrin ve Fenilefrin'nin antioksidan etkiye sahip olduğu

düşünülerek tez kapsamında değerlendirilmesi çalışmanın kapsamını genişleterek çalışmayı daha etkili ve orijinal hale getirdi.

Çalışmamızda Sinefrin ve Fenilefrin'in, hCA I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisinin araştırılması yanında her iki maddenin antioksidan kapasitelerinin belirlendi ve antiradikal özellikleri ile ilgili çalışmalarda yapıldı. Bu amaçla tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, Fe^{+3} göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre Fe^{+3} -TPTZ indirgeme kapasitesi, ferrozin ve bipiridil reaktifleri kullanarak iki farklı metotla 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 ($O_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi gibi farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak farklı konsantrasyonlar da Sinefrin ve Fenilefrin'in antioksidan kapasiteleri belirlendi. Kullanılan yöntemlerde gıda ve ilâç sanayisinde yaygın olarak kullanılan BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile kıyaslandı.

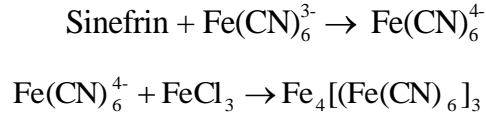
Sinefrin ve Fenilefrin'in çalışılan konsantrasyonlarda (10-30 μ g/ml), artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak total antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamalarda, DPPH, ABTS, DMPD ve $O_2^{\cdot-}$ gidermede ferrozin ve bipiridil kullanarak iki farklı şekilde çalışılan ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) şelatlama aktivitesinde konsantrasyona bağlı olarak aktivitede artış gözlenmiştir.

Antioksidan çalışmalarda, her iki fenolik maddenin standartlarla mukayesesinde BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks gibi standart maddeler kullanıldı ve antioksidan çalışmaların çoğu metodunda Sinefrin ve Fenilefrin'in aktivitesinin kullanılan standartların eşit konsantrasyonlarda ki aktivitelerinden daha yüksek ya da benzer aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Bir bileşikte var olan indirgeme kuvveti özelliği, O bileşiğin antioksidan kapasitesi hakkında bize önemli fikirler verir. Çünkü indirgeme özelliği bir bileşiğin antioksidan

aktivite sergilemesinde en önemli etkenlerden biridir (Meir *et al.* 1995). Bunun yanında saf bir maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden yürüyebilir. Şöyleki; geçiş metallerinin sebep olduğu oksidasyonlar için antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellikleri açısından önemli değildir, ancak bileşiğin metal şelatlama özelliğinin olması sistemde oksidasyonu durduracak veya hızını yavaşlatacak olması açısından önemlidir. Tıpkı enzimatik sistemlerde de olduğu gibi örneğin; CAT, SOD ve GP gibi primer antioksidan enzimlerin antioksidan özelliği, onların indirgeme güçlerinin olmasından veya fenolik bileşik içerdiklerinin zenginliğinden değil, H₂O₂'yi uzaklaştırabilme özelliklerinin olmasındandır (Halliwell and Gutteridge 1984; Halliwell 1989). Sonuç olarak denilebilir ki antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama veya radikal giderme gibi farklı mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock 1997; Gülçin 2012). Çalışmamızda yapılan üç ayrı indirme kapasitesi metodu bu anlamda önem taşımaktadır. Bu indirgeme kapasitesi metotlarının sonuçlarına bakıldığında Sinefrin ve Fenilefrin'in indirgeme kapasitesinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı fakat genel olarak standartlardan düşük olduğu gözlemlendi.

Elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu durum biyolojik açıdan aktif olan bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtır (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006). Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin redoks reaksiyonlarında redüktantlarla oksidanların stabilizasyonunda görev yapabilir. Redoks reaksiyonları, başka bir maddeyi yükseltgeyerek kendisinin indirgenmesi olarak tanımlanır. Yukarıda bahsedildiği gibi indirgeme özelliği antioksidan kapasite yönünden önemli bir özelliktir. Bir bileşiğin bu özelliği farklı metotlar ile ölçülebilir. Biz çalışmamızda bu amaçla en yaygın üç metodu kullandık. İlk olarak en önemli metotlardan birisi olan Fe[(CN)₆]⁺³'nin Fe[(CN)₆]⁺²'ye indirgenmesi metodunu kullandık. Bu metod, Sinefrin ve Fenilefrin ilavesiyle indirgenmiş ürüne Fe⁺³'ün ilavesi, 700 nm'de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan Fe₄[Fe(CN)₆] oluşturur yol açar. Absorbansdaki artışı gösterir. Bu durumda sonuç olarak indirgeme kapasitesinin varlığını gösterir.



Bu metotta kontrol çözeltisi sarı renkliken, antioksidan örneklerinin ilavesiyle indirgeme kapasitesine ilişkili olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin en önemli göstergesidir (Benzie and Strain 1996). Çalışmamızın sonuçları bu metot için değerlendirildiğinde Sinefrin ve Fenilefrin'in standartlara göre daha düşük indirgeme kuvvetine sahip olduğu görüldü. Bu iki madde kendi içinde kıyaslandığında ise Sinefrin ve Fenilefrin'in her üç konsantrasyon (10-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) için hemen hemen aynı şekilde indirgenme kuvvetine sahip olduğu gözlemlendi.

Ayrıca mevcut çalışma kapsamında ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgeme kapasitesinin yanı sıra kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) kupröz iyonlarına (Cu^{+}) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduyla Fe^{+3} -TPTZ indirgeme kapasitesi de araştırıldı.

KUPRAK metodu son zamanlarda Apak ve grubu tarafından indirgeme kapasitesi için geliştirilen önemli bir metot olup (2006). Özellikle Gülçin ve grubu tarafından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Gülçin 2008; 2010; Gülçin et al 2010). Bu metot, düşük maliyetli bir metod olmasının yanı sıra hızlı, kararlı ve rahat uygulanabilir. Ayrıca indirgeyici maddelerin molekül yapısına veya hidrofilik özelliklerine bakılmadan birçok antioksidan için uygulanabilir. Ayrıca metodun en iyi diğer özellikleride hızlı, rahat uygulanabilir ve kararlı olmasıdır. Glutasyon gibi tiyol gurubu içeren antioksidanların aktivitelerinin ölçümünde, fenolik bileşiklerin aktivite ölçümlerinde sıklıkla kullanılabilir (Huang *et al.* 2005). Kuprak metodu kromojenik bir metottur ve bir redoks reaksiyonudur. Bu metot fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da olan (pH: 7.0) gerçekleştirilir (Apak *et al.* 2006; Gülçin 2008; Köksal *et al.* 2009). Yine bu metod için sonuçlar değerlendirildiğinde (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Sinefrin ve Fenilefrin'in indirgenme kuvveti standartlara göre daha düşük sonuç verirken, Sinefrin nispeten daha iyi indirgenme kuvveti sergiledi.

Aynı molekül yapısına sahip fenolikler için fenolik halkaya bağlı -OH grubunun pozisyonu antioksidan özellikler açısından belirleyici bir unsurdur (Gülçin 2012). Sinefrin ve Fenilefrin'in yapısı mukayese edildiğinde (Şekil 1.18 ve 1.19) fenol halkasına bağlı -OH grubu Sinefrinde *para* pozisyonunda iken Fenilefrin'de *meta* pozisyonundadır. Bu özelliklerinden dolayı Sinefrin birçok metotta kuprak metodunda da olduğu gibi Fenilefrin'e nazaran daha iyi aktivite özellik gösterdiği belirlenmiştir. Kimyasal özelliklerine bakıldığında bu sonuç zaten beklenen bir durumdur (Gülçin 2012).

Fe^{+3} - Fe^{+2} transformasyonu metodunun çalışıldığı ortamın pH'sı 6.6 civarındadır. Ortamın pH'sı değiştirildiğinde düşük pH'da Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ile renkli Fe^{+2} -TPTZ kompleksinin oluşur. Oluşan bu demir kompleksi oksidan olarak kullanılır ve yeni bir yöntem olan FRAP metodu olarak asidik koşulda indirgeme kuvveti ayrıca belirlenebilir (Benzie and Strain 1996). FRAP metodunun, Fe^{+3} - Fe^{+2} transformasyonu metoduna göre farkı sadece çok daha asidik ortamda ve reaktif kullanarak yapıyor olmasıdır. Bunun yanısıra Fe^{+3} tuzunun redoks potansiyeli ve ABTS⁺'nin redoks potansiyeli ile birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve ABTS⁺ yöntemleri arasında fazla bir fark olmamakla beraber tek fark FRAP'ın daha asidik ortamda (pH 3.6) gerçekleşmesidir. Asidik ortamda ve antioksidanların varlığında Fe^{+3} -TPTZ kompleksi Fe^{+2} -TPTZ kompleksine indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de maksimum absorban gösterir. Fe^{+3}/Fe^{+2} redoks çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyelli birçok bileşik teorik olarak Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilir. Bu nedenle FRAP değerleri daha yüksek çıkabilir. FRAP sonuçları analiz zamanına ve ortamına bağlı olarak değişebilir. Bazı polifenoller daha yavaş hareket eder ve belirlemek için daha uzun reaksiyon zamanı gerekmektedir. Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Ancak diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı, ucuz ve özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmamaktadır (Huang *et al.* 2005; MacDonald-Wicks *et al.* 2006).

Sinefrin ve Fenilefrin'in FRAP metoduna göre ferrik iyonlarını (Fe^{+3}) ferröz iyonlarına (Fe^{+2}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Çalışmada Sinefrin ve Fenilefrin'in indirgeme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla

uygulanan her üç indirgeme metodu arasında bir korelasyon olduğu gözlemlendi ve artan konsantrasyona bağlı olarak indirgeme kapasitelerinde de artış meydana geldi (Çizelge 5.4). Her üç metotta Sinefrin ve Fenilefrin'in kullanılan standartlar içerisinde BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks'dan daha az indirgeme kuvveti olduğu bulundu. Üç metotta Sinefrin ve Fenilefrin için indirgeme kuvveti sonuçları en iyi olan metod FRAP metodu oldu. Sinefrin beklendiği gibi kimyasal yapısından dolayı Fenilefrin'e göre daha iyi sonuçlar gösterdi. Aromatik halkadaki elektronların rezonans yapılarından dolayı delokalizasyonu aromatik hidroksil gruplarının asitliğini artırır ve molekülü daha kuvvetli bir indirgen yapar. Kullanılan her üç indirgeme kapasitesi metodlarında standartlar içinde genellikle en yüksek indirgeme özelliği BHA sergilerken, Troloks en düşük indirgeme özelliği sergiledi.

Çizelge 5.4. Sinefrin ve Fenilefrin'in 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla mukayesesi

Antioksidanlar	Fe^{+3} İndirgeme Metodu	Kuprak Metodu	FRAP Metodu
BHA	2,145	2,115	2,426
BHT	2,163	1,696	1,277
α-Tokoferol	1,176	0,674	1,998
Troloks	1,109	0,673	1,235
Sinefrin	0,258	0,258	0,603
Fenilefrin	0,278	0,116	0,485

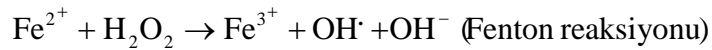
Metabolizmada var olan serbest demir ve bakır kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ardından transferrin proteinleri tarafından ferrik iyonları (Fe^{+3}) şeklinde demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır. Ferröz iyonları (Fe^{+2}) halinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanır. Ferritin proteini metabolizmada birçok dokuda bulunabilir. Ferritin nisbeten kan dolaşımında daha az bulunur. Ferritin testi ile vücutta bulunan demir depoları hakkında bilgi sahibi olunur. Demir eksikliğine bağlı anemilerde ferritin değerleri erkenden ve belirli miktarda düşer. Ferritinin yüksek çıkması ise hemokromataz denilen bronz şeker hastalığı, çeşitli enfeksiyonlar ve bazı

tümörlerin varlığında ortaya çıkar. Transferrine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazken fazla demir iyonları ise “demir havuzu” denilebilecek olan ferritin ve hemosiferrinde depolanır. İnsan plazmasında bulunan bakırın önemli bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formdadır. Seruloplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Normalde durum böyle iken, metabolizmadaki normal dengesinin değiştiği durumlarda hidroksil radikali oluşur (Chevion *et al.* 1993). Oluşan bu radikaller doku hasarlarına sebep olduğundan vücut içerisindeki yabancı organizma ve maddeleri sindirip, yok eden biyolojik hücrelerin diğer bir ifade ile fagositlerin aktivasyonu veya liziz olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu ROS oluşabilmektedir. Serbest radikal oluşumu doku ve hücrelere zarar vererek dolaylı bir yolla geçiş metallerinin yayılmasıyla daha fazla serbest radikal oluşumuna ve onlarında hücredeki zararlarının artmasına sebep olmaktadır. Sonuç olarak bu durum hücre ve doku hasarını daha da hızlandırır. Enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Geçiş metalleri ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek büyük ölçüde hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Gülçin 2012). Şöyleki geçiş metalleri, oksidasyonun başlangıç basamağının aktivasyon enerjisinin indirgenmesine bağlı olarak yağların oksidasyon hızını arttırmırlar. Metaller lipit alkil radikalleri üreterek lipitler ile doğrudan reaksiyona girerler. Geçiş metalleri ayrıca singlet oksijen gibi ROS, OH[•] ve H₂O₂ de üretirler. Lipit alkil radikalleri ve reaktif oksijen türleri de yağ oksidasyonunu hızlandırırılar. Aynı zamanda hidroperoksitlerin parçalanmasına yol açarak yağların otooksidasyonunu hızlandırırılar. Fenolik bileşikler bu durumlarda araya girerek ağır metal iyonlarını şelatlar ve metallerin indüklediği oksidatif reaksiyonları azaltır, ancak bununla birlikte fenolik bileşikler ferrik iyonlarını (Fe⁺³) hidroperoksitlerin bozulmasını katalizlemede daha aktif olan ferröz iyonlara (Fe⁺²) dönüştürürler ve böylece oksidatif reaksiyonların oluşumunu arttırabilme özelliğinede sahipler (Gülçin 2012; Annakkaya 2012).

Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı, beyinde *Substantia nigra*’da mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Böylece Parkinson hastalığına

yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır ve serbest radikaller oluşur. Bu durumda serbest radikaller zincirleme radikalik reaksiyonlar ile *substantia nigra* dejenere olurken bu durum hastalığa sebep olmaktadır.

Organizmada ROS oluşumunu arttıran diğer bir neden ferröz iyonları (Fe^{+2}) gibi iyonik türlerdir. Bu nedenle demir şelatlayabilme kapasitesi özelliği maddeler için oldukça önemlidir. Grubumuz tarafından da oldukça yoğun kullanılan metal iyonları şelatlama aktivitesi metotları, metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engelleyecek veya geciktirecek bileşik saptamak için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan yöntemdir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları (Fe^{+2}), bilinen en tehlikeli, oksidasyona sebep olan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar (Fe^{+3}) da meydana gelebilir. Ferröz iyonları (Fe^{+2}), ferrik iyonlarından (Fe^{+3}) on kat daha fazla reaktiftirler (Miller 1996). Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radikalleri de oluşabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1984; Gülçin 2007).

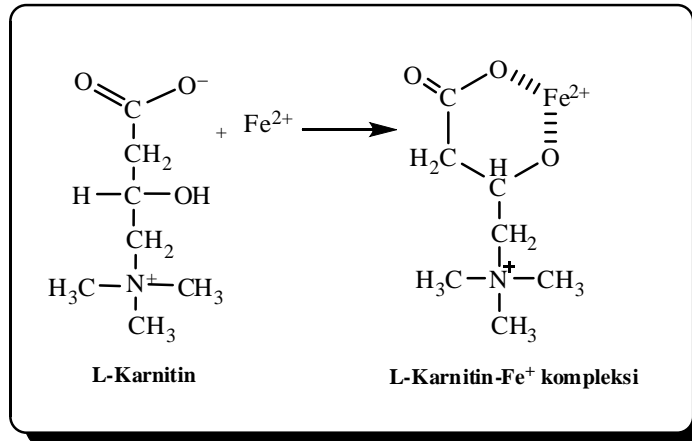


Böylece ferröz iyonları (Fe^{+2}) şelatlama kapasitesi olan bir bileşik ya da madde ferröz iyonları (Fe^{+2}) konsantrasyonunu en aza indirmekte ve oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibe etmektedir (Gülçin 2007b). Ferrozin, ferröz iyonları (Fe^{+2}) gibi iki değerlikli metal iyonları kompleks oluşabilmektedir. Oluşan renkli metal-ferrozin kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbanans göstermektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında metal-ferrozin kompleksi oluşumu engellenmektedir bir zamandan sonra sonlanmaktadır. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesi kabul edilir.

Daha önce L-Adrenalin ile ilgili bir çalışmaya bakıldığında bir L-Adrenalin molekülünün amin grubu ile aynı molekülün hidroksil grubunun bir ferröz iyonu (Fe^{+2}) ile koordinasyonu sonucu L-Adrenalin- Fe^{+2} kompleksi oluştuğu görülmüştür (Gülçin 2009a). Kurkumin molekülüne bakıldığında ise durum farklıdır (Ak and Gülçin 2008).

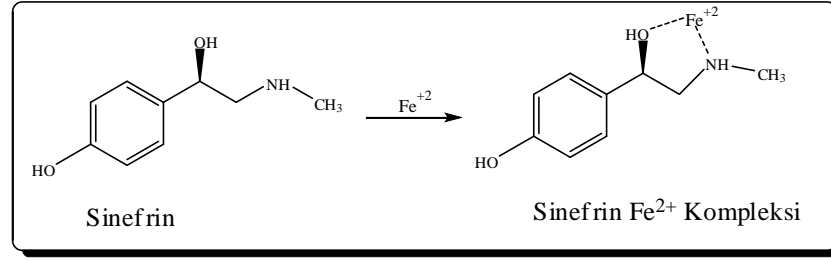
Kurkumin molekülünün ihtiva ettiği her iki aromatik halkaya bağlı metoksi grupları ile hidroksil fonksiyonel grupları arasında ikişer adet ferröz iyonlarının (Fe^{+2}) şelatlamasının yanında hidrokarbon ara zincirindeki enol ve keto grupları tarafından da bir adet ferröz iyonlarının (Fe^{+2}) şelatlama olma durumu söz konusudur

Ayrıca Gülçin (Gülçin 2006b) tarafından L-Karnitin'in metal şelatlama aktivitesinin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada ise L-Karnitin'in ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) konsantrasyona bağlı olarak şelatladığı gözlenmiş ve Şekil 5.2'de gösterildiği şekilde L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{+2}) arasındaki olası metal şelatlama mekanizması aydınlatılmıştır. Bir L-Karnitin molekülünün karboksil grubu ile yine aynı molekülünün γ -karbonuna bağlı hidroksil grubu arasında koordinasyon ile bir metal köprüsü oluşarak bir ferröz iyonunun (Fe^{+2}) şelatlandığı aydınlatılmıştır.

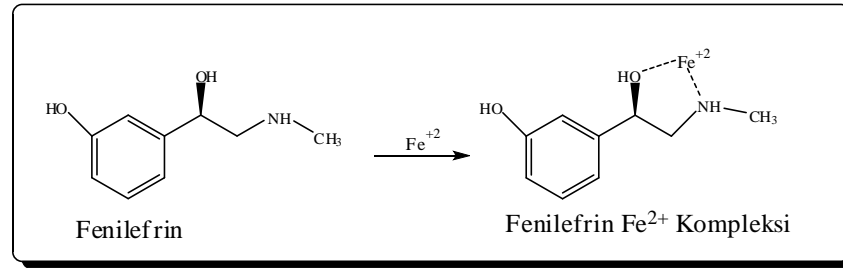


Şekil 5.2. L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{+2}) arasında öne sürülen metal şelatlama mekanizması

Metal şelatlama ile ilgili verilen bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamız kapsamında metal şelatlama özellikleri belirlenen Sinefrin ve Fenilefrin'in metal şelatlama kapasitesi ile ilgili olarak muhtemel bağlanma modeli Şekil 5.3 ve Şekil 5.4'de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. Sinefrin'in ferröz iyonu (Fe⁺²) ile oluşturduğu muhtemel kompleks



Şekil 5.4. Fenilefrin'in ferröz iyonu (Fe⁺²) ile oluşturduğu muhtemel kompleks

Orto ve *para* pozisyonlarındaki aromatik hidroksil gruplarının varlığı, bir moleküle *meta* pozisyonunda aynı grubun varlığından daha çok biyolojik aktivite kazandırdığı bilinmektedir (Chimi *et al.* 1991; Prokony 1988). Çalışmamız kapsamında özellikle vurguladığımız gibi Sinefrin ve Fenilefrin'in -OH gruplarının aromatik halkadaki pozisyonları biyolojik aktivite olarak farklı sonuçlara sebep olmuştur. Sinefrinde -OH grubu *para* pozisyonundadır ve *meta* pozisyonunda -OH grubuna sahip olan Fenilefrin'e göre iyi aktivite göstermiştir ancak benzer sonuçların çıktığı durumlarda söz konusudur.

Çalışmada kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin ile standart antioksidanların ferröz iyonları (Fe⁺²) metal şelatlama aktivitesinin IC₅₀ değerleri değerlendirildiğinde Sinefrin ve Fenilefrin için sırasıyla 34,65 ve 38,50 µg/ml bulunarak standartlara nazaran daha iyi şelatlama özelliği göstermiştir (Çizelge 5.5). Yine benzer şekilde Sinefrin ve Fenilefrin'in bipiridil metal şelatlama aktivitesi için IC₅₀ değeri ile standart antioksidanların IC₅₀ değerlerinden daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu değerler Sinefrin ve Fenilefrin için sırasıyla 5,73 ve 5,82 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ayrıca

metal şelatlama konusunda ferrozin ve bipiridil reaktifleri kullanılarak yapılan her iki metot oranında da pozitif bir korelasyon ve sıralama göstermektedir.

Çizelge 5.5. Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanlara ait DPPH•, ABTS⁺, DMPD⁺, O₂⁻ giderme, ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili IC₅₀ (µg/ml) değerleri

	DPPH• Giderme	ABTS ⁺ Giderme	DMPD ⁺ Giderme	O ₂ ⁻ Giderme	(Fe ⁺²) Metal şelatlama	Bipiridil Metal şelatlama
BHA	8,35	5,17	21,65	16,50	57,75	7,87
BHT	33,00	5,37	**	33,00	49,50	6,93
α-Tokoferol	7,78	5,82	**	23,10	34,65	15,40
Troloks	7,87	6,30	18,73	43,31	49,50	10,50
Sinefrin	49,50	4,20	49,50	9,36	34,65	5,73
Fenilefrin	53,30	7,70	46,20	8,77	38,50	5,82

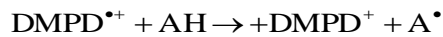
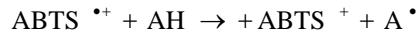
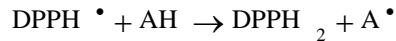
**DMPD⁺ giderme metodunda bu standartlar ile aktivite göstermemektedir (Gülçin 2008).

Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri ve antioksidan kapasiteleri biyolojik sistemlerdeki etkilerinin yanı sıra gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini giderdiği için önemlidir. Bu nedenle antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri ve onların tespiti oldukça önemlidir. Gıda ve farmasötik sistemlerde serbest radikaller meydana gelmekte, lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve bunun sonucu olarak ürünlerin kalitesi düşmektedir. Şüphesiz ki bu durum sağlık açısından tehdit edici unsurdur (Min 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalarda doğal antioksidanları içeren gıdaların kanser ve buna benzer kronik hastalıkları engellediği belirlenmiş ve bu özelliklerinden dolayı meyve ve sebzelerin yapılarında bulunan antioksidanlara olan ilgi artmıştır, çalışmalar bu anlamda giderek önem kazanmaktadır (Baysal and Ersus 1999; Gülçin 2012).

Son zamanlarda serbest radikallerin giderilmesi ile ilgili birçok metot geliştirilmiştir. Bunların başında DPPH radikal giderme aktivitesi (Gülçin 2006b; 2012), ABTS⁺ giderme aktivitesi (Gülçin *et al.* 2006a), DMPD⁺ giderme aktivitesi (Basile *et al.* 2006), PMS-NADH-NBT sisteminde (Gülçin 2005), ksantin-ksantin oksidaz sistemi (Nagai *et*

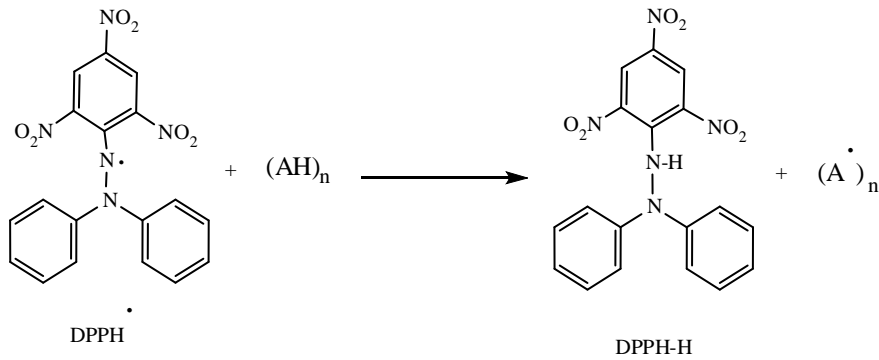
al. 2001) ve riboflavin-metiyonin-ışık sistemi (Zhishen *et al.* 1999) gibi sistemlerde oluşturulan O_2^- giderme aktivitesi gibi radikal giderme metotları sıklıkla kullanılmaktadır. Kromojenik bu metotların radikal giderme metotları uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajlardan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Awika *et al.* 2003; Van den Berg *et al.* 1999). Çalışmada kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin'in süperoksit radikal giderme aktivitesine ait IC_{50} değerleri sırasıyla 9,36 ve 8,77 $\mu\text{g/ml}$ civarında iken, bu değerler standartlar için (BHA, BHT, α -Tokoferol ve Troloks) 16.50-43,31 $\mu\text{g/ml}$ aralığında bulunmuştur. Gülçin ve grubunun yapmış olduğu diğer örnek çalışmalara bakıldığında IC_{50} değerleri α -hederin, hederasaponin C, hederakolşizit E ve F gibi doğal antioksidanlar için 45-51 $\mu\text{g/ml}$ arasında bulunmuştur (Gülçin *et al.* 2004c).

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



Menekşe renkli DPPH \cdot , pembe renkli DMPD $^{+\cdot}$ ve yeşil-mavi renkli ABTS $^{+\cdot}$ kromojenik yöntemleri kullanmak ve uygulamak oldukça kolaydır. Ayrıca DPPH \cdot , ABTS $^{+\cdot}$ ve DMPD $^{+\cdot}$ giderme yöntemleri hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürlerdir. Bu metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir. Kolay ve hızlı olmalarından dolayı bu yöntemler için aynı anda birden fazla maddenin çalışılması mümkündür (Awika *et al.* 2003).

Bu yöntemlerden biri olan ve kullanılan DPPH radikali uzun ömürlü bir serbest radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik *et al.* 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası, hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır (Şekil 5.5). Bu redüksiyonun ardından radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşur ve bu molekül 517 nm’de herhangi bir absorbans vermemektedir. Sonuç olarak DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin [(AH)_n] varlığında DPPH radikali Şekil 5.5’da belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).

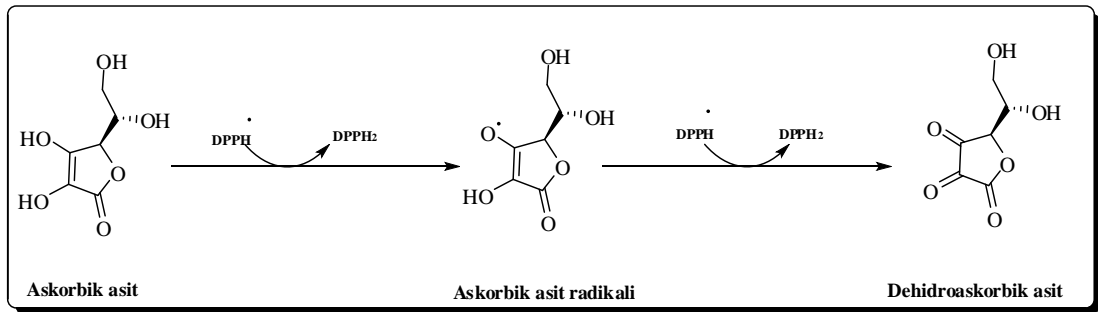


Şekil 5.5. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

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

L-Karnitinde bulunan karbonil gurubu, α-karbonundaki konjugasyon ile oluşan radikali stabil hale getirir. L-Karnitin molekülünde karboksilat gurubu bir adet karbonil birimine sahiptir. L-Karnitindeki iki nolü karbon atomundan bir hidrojeni kolayca koparılabilir ve koparılan hidrojen tarafından da DPPH radikali söndürülebilir. Benzer bir

mekanizma Nishizawa ve arkadaşları tarafından konjuge gruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon için de öne sürülmüştür (2005). DPPH radikalleri giderme aktivitesi antioksidan vitaminler ile polihidroksi aromatik bileşiklerin değerlendirmesinde uzun zamandan beri sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Yoshida *et al.* 1989; Nishizawa *et al.* 2005)



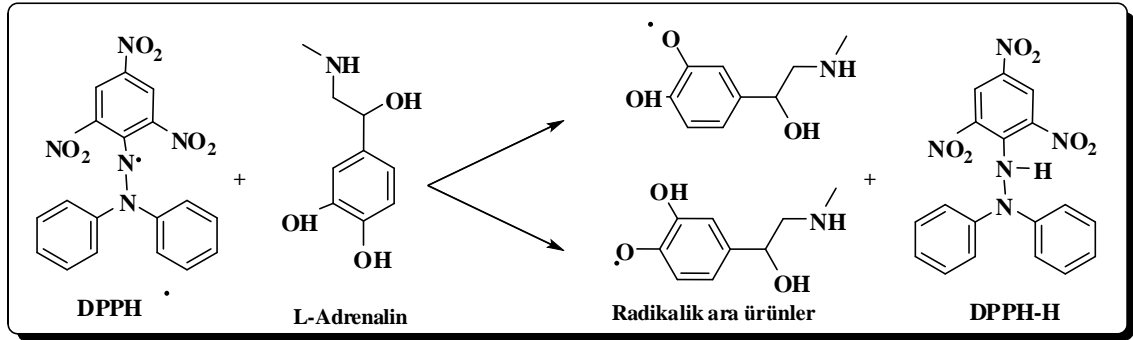
Şekil 5.6. Konjuge gruplara sahip askorbik asit'in DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon

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

Ayrıca yine Gülçin tarafından yapılan diğer çalışmada ise farklı moleküllerin DPPH serbest radikali ile etkileşme mekanizmalarına açıklık getirilmiştir. Bu anlamda rezveratrol ile ilgili yapılan bir çalışmada bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH· radikalini söndürdüğü ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluştuğu bildirilmiştir. Daha sonra oluşan bu radikalik ara ürünün radikal formunun fenolik halka tarafından dağıtıldığı belirlenmiştir (Gülçin 2009b).

Diğer bir çalışmada ise benzer mekanizma da metabolizmada görev alan ve özellikle organizmayı acil harekete hazırlama, kanın iç organlar ve deriden kaslara sevk edilmesini sağlama, karaciğerdeki glikojenin glukoza dönüşmesi ve böylelikle acil

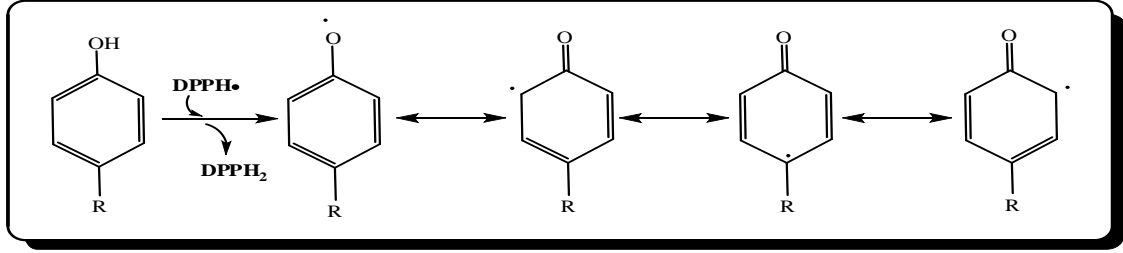
enerji kaynağı sağlanması etkisine sahip olan L-Adrenalin için öngörülmüştür (Gülçin 2009a). Bu çalışmada L-Adrenalin'in rezveratrol ile benzer bir DPPH· radikali giderme mekanizmasına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH· radikali söndürmesi ve L-Adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu

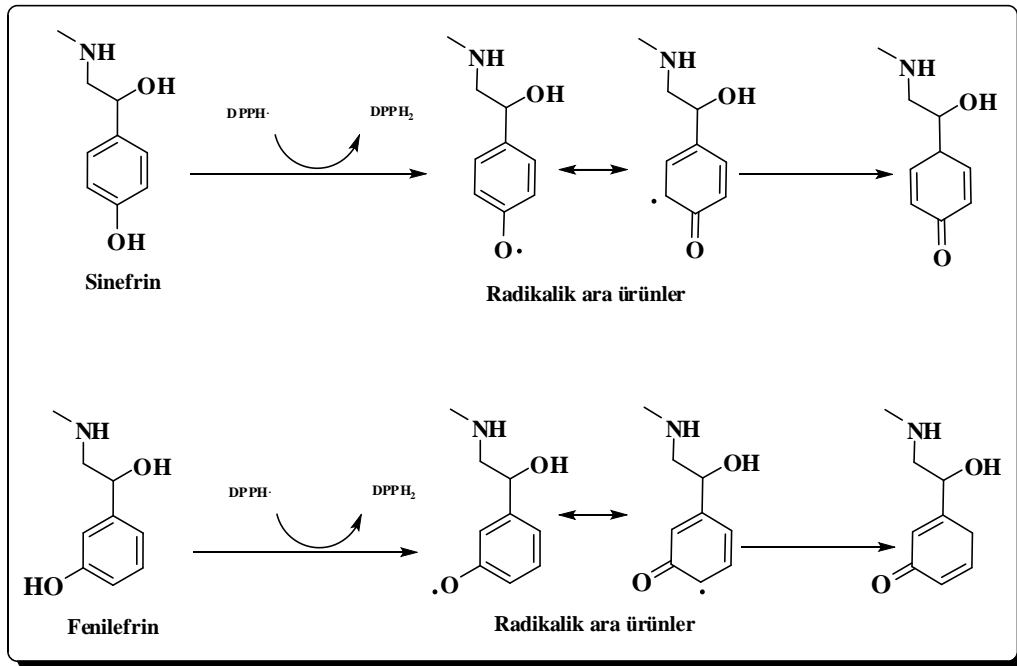
Çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin'in DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili IC_{50} değerleri sırasıyla 49,50 ve 53,30 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 5.3). DPPH radikali giderme aktivitesinin IC_{50} değeri, L-Adrenalin (Gülçin 2009a) için 30,6 $\mu\text{g/ml}$, kurkumin için 34,9 $\mu\text{g/ml}$ (Ak and Gülçin 2008), silmarin için 20,8 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin *et al.* 2009d), rezveratrol için 6,96 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin 2010), eugenol için 16,06 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin 2011), α -hederin için 69,4 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin *et al.* 2004c), CAPE için 3,30 $\mu\text{g/ml}$ (Göçer and Gülçin 2011), *Pistacia terebinthus* için 22,35 $\mu\text{g/ml}$ (Göçer 2013) ve propolis için 31,81 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin *et al.* 2010) olarak bulunmuştur.

Son zamanda yapılan fenolik halkaya sahip olan moleküllerin DPPH· radikali giderme ile ilgili çalışmalar göz önünde alındığında fenolik yapıdaki bileşiklerin DPPH· radikali giderme mekanizmaları tahmin edilebilir. Bu mekanizmalara son olarak *p*-Hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit gibi mono fenoller için muhtemel DPPH· radikali giderme mekanizması verilebilir (Şekil 5.8.)



Şekil 5.8. Mono fenoller için muhtemel DPPH· radikali giderme mekanizması

Tez kapsamında çalıştığımız Sinefrin ve Fenilefrin'in DPPH· radikali giderme mekanizması ise Şekil 5.9'da verilmiştir.

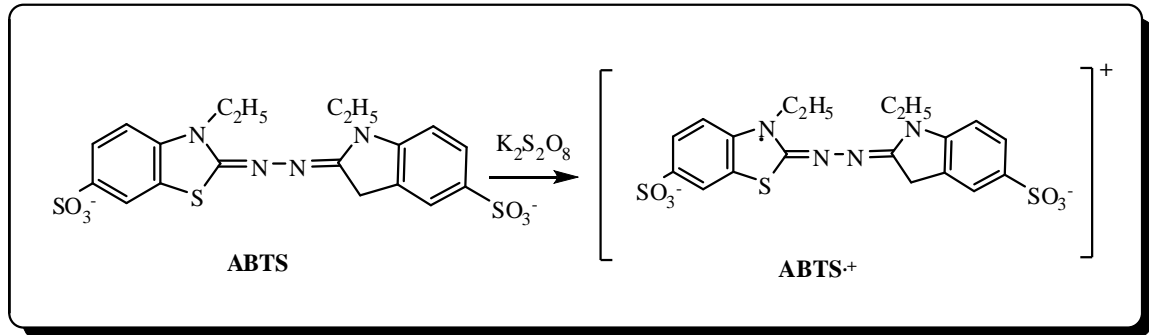


Şekil 5.9. Sinefrin ve Fenilefrin moleküllerinin DPPH· radikalini söndürmesi mekanizması

Hidrokinon yapıları bir DPPH· ile etkileşerek hidrokinon radikaline ve ikinci bir DPPH· ile etkileştikten sonra da 1,4-benzokinona dönüşken iki radikali söndürür ancak mono fenolik yapıdaki bileşikler bir fenolik grup kapalı olduğu için ancak bir DPPH· ile etkileşebilirler. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS⁺ giderme aktivitesi

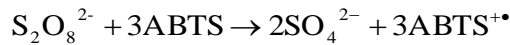
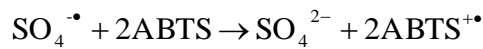
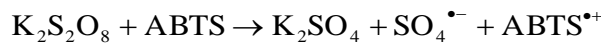
de sulu karışımların, içeceklerin, ekstralarının ve saf maddelerin radikal giderme aktiviteleri tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller 1996; Gülçin 2006b).

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



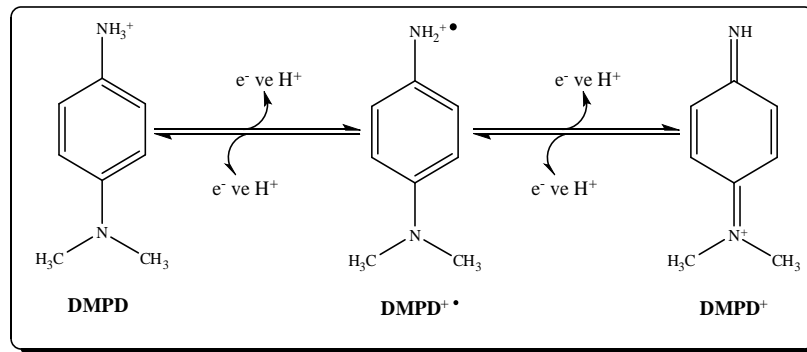
Şekil 5.10. ABTS'nin $K_2S_2O_8$ ile oksidasyonu sonucu ABTS radikalinin ($ABTS^{\bullet+}$) oluşum mekanizması

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



ABTS radikalleri, DPPH radikallerinden daha reaktiftirler. Bir H atom transferrini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferrini gerçekleştirir (Kaviarasan *et al.* 2006). ABTS radikalleri giderme mekanizması, yukarıda DPPH radikalleri giderme mekanizmasına benzer özellikler arz eder. Çizelge 5.5'deki sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan Sinefrin ve Fenilefrin'in oldukça kuvvetli bir şekilde ABTS radikalleri giderdiği gözlenmektedir. DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait IC₅₀ değerlerinde olduğu gibi ABTS radikallerini giderme tayininde de Sinefrin ve Fenilefrin'in IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,20 ve 7,70 µg/ml olduğu bulunmuştur. Bu değerler BHA için 5,17 µg/ml, BHT için 5,37, α-Tokoferol için 5,82 µg/ml ve Troloks için 6,30 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara bakıldığında Sinefrin en yüksek ABTS⁺ giderme aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

Deneysel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir radikal giderme metodu ise DMPD^{•+} giderme aktivitesidir. DMPD^{•+} giderme analizinin temeli, asidik pH'da ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu (DMPD^{•+}) oluşturması esasına dayanır. DMPD^{•+}, 505 nm'de maksimum absorbans gösterir. Şekil 5.11'da görüldüğü gibi DMPD^{•+}'ye bir H atomu transfer edebilen antioksidanlar koyu pembe rengi söndürür ve sonuçta bir renksizleşme meydana gelir. Bu reaksiyon on dakikadan daha kısadır. Radikal katyonunun oluşumu ise yavaştır. Bunun için yapılan çalışmalarda en iyi bulgular, son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk solüsyonu veren FeCl₃ ile elde edilir. Üstelik bu metot diğer radikal giderme metotlarında olduğu gibi düşük maliyet ve yüksek tekrar edilebilirlik imkânı da sağlamaktadır.



Şekil 5.11. Kararlı bir radikal olan DMPD^{•+}'nin oluşum ve giderilme mekanizması

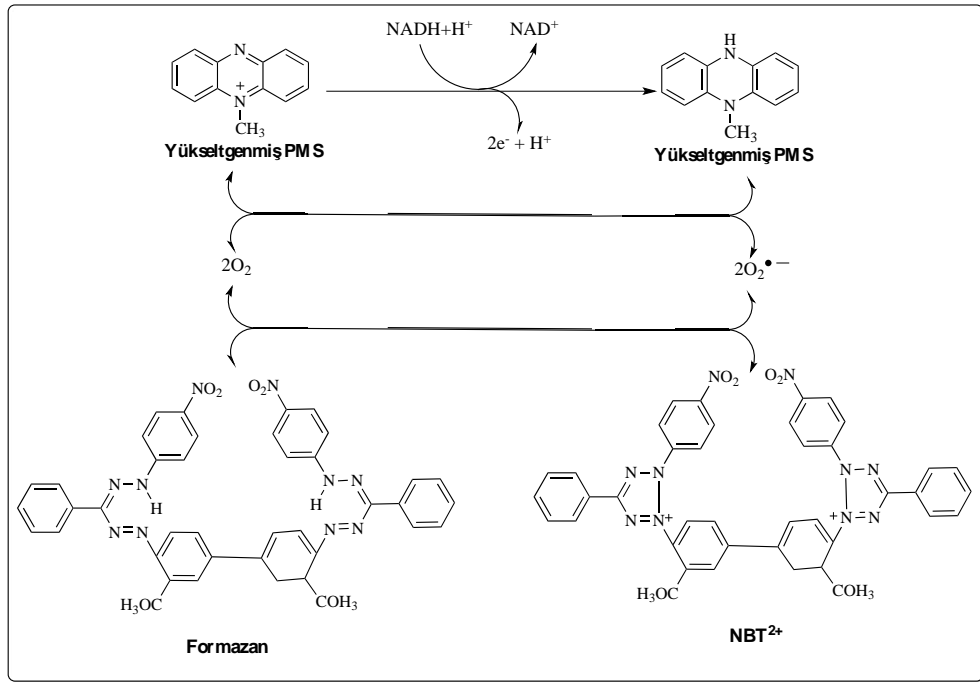
Sinefrin ve Fenilefrin'in DMPD^{•+} giderme aktivitesi standart olarak kullanılan BHA ve troloks bileşiklerinden daha az etkindir. Bu metotta BHT ve α -Tokoferol gibi hidrofobik özelliğe sahip standartlar tam sonuç vermemektedirler (Gülçin 2008). Sinefrin ve Fenilefrin'in DMPD^{•+} giderme aktivitesine ait IC₅₀ değeri sırasıyla 49,50 ve 46,20 $\mu\text{g/ml}$ iken bu değer BHA ve Troloks için sırasıyla 21,65 ve 18,73 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 5.5). DMPD^{•+} giderme aktivitesi ile ilgili IC₅₀ değerleri literatürde ki diğer çalışmalar ile mukayese edildiğinde ise benzer sonuçlar gözlenmektedir. Gülçin ve grubu tarafından yapılan diğer çalışmalarda IC₅₀ değerleri ise L-Adrenalin için 15,6 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin 2009a), eugenol için 10,04 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin 2010), rezveratrol için 9,5 $\mu\text{g/ml}$ (Gülçin 2010), kurkumin için 34,5 $\mu\text{g/ml}$ (Ak and Gülçin 2008) ve CAPE için 26,70 $\mu\text{g/ml}$ (Göçer and Gülçin 2011) olarak bulunmuştur.

Son olarak radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda son olarak süperoksit anyon radikalleri ($\text{O}_2^{\cdot-}$) giderme aktivitesi araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipit peroksidasyonunu direkt başlatan oksijen merkezli radikallerdir. Bu radikaller, biyolojik makromoleküller ile direkt etkileşerek doku hasarlarına sebep olurlar (Halliwell and Gutteridge 1984). Ayrıca lipit peroksidasyonunu başlatan hidroksi radikali gibi daha aktif radikalleri oluşturmak için değişikliğe uğrayabilirler. Süperoksit anyon radikalleri çok reaktif değildir, ancak dehidratazların demir sülfür gruplarını yükseltgeyerek inaktivasyona sebep olur ayrıca Fe^{+2} iyonlarının salınımına da sebep olurlar. Görüldüğü gibi süperoksit anyon radikalleri Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilirler. Fe^{+2} ise hem daha reaktif hem de Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksit moleküllerinden oldukça reaktif olan OH^{\cdot} radikallerinin oluşumuna sebep olurlar. Bunun yanında Haber-Weiss reaksiyonu ile doğrudan H_2O_2 ile etkileşerek OH^{\cdot} iyonu ve OH^{\cdot} 'de oluşturabilir (Gülçin *et al.* 2007a; 2007b).

Ayrıca süperoksit anyon radikalleri CAT ve PO enzimlerini de inaktive edebilir. Oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranını da parçalayabilir (Fridovich 1983; Mavi 2005). Lipit, protein ve DNA gibi oldukça önemli biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, OH^{\cdot} ve $^1\text{O}_2$ gibi diğer

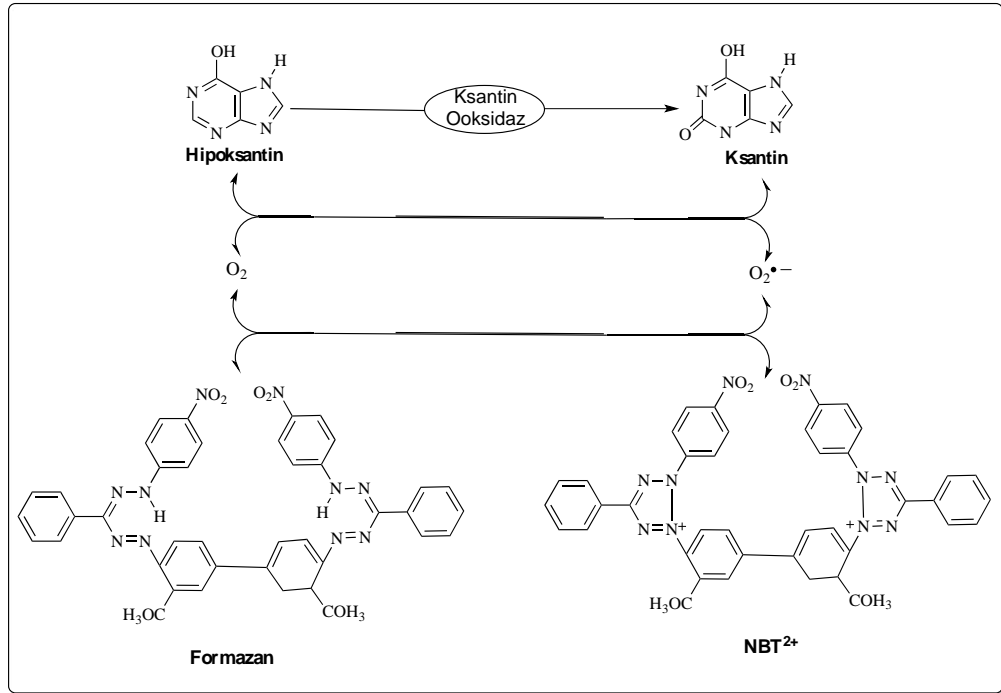
ROS'nin oluşumunda da önemli rol oynar (Pietta 2000). Ayrıca Sitokrom c gibi bazı demir komplekslerini de kolaylıkla indirgeyebilir (Gülçin 2005).

Bu metotta O_2^- riboflavin/metiyonin/işık sisteminde çözünen oksijenden elde edildi. Elde edilen süperoksit anyon radikalleri NBT^{+2} 'yi formazana yükseltger. Formazan ise 560 nm'de maksimum absorbans gösterir. Azalan absorbans süperoksit radikallerinin giderildiğinin göstergesidir. Şekil 5.12'de de görüldüğü gibi NADH/PMS ortamında üretilen süperoksit radikallerinin NBT^{+2} 'yi formazana yükseltmesi görülmektedir.



Şekil 5.12. NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT^{+2} 'yi formazana yükseltmesi

Bunun yanında yine süperoksit anyon radikalleri benzer şekilde ksantin/ksantin oksidaz sisteminde de üretilebilir. Bu sistemde üretilen O_2^- Şekil 5.13'te gösterilen benzer mekanizma ile NBT^{+2} 'yi formazana yükseltger.



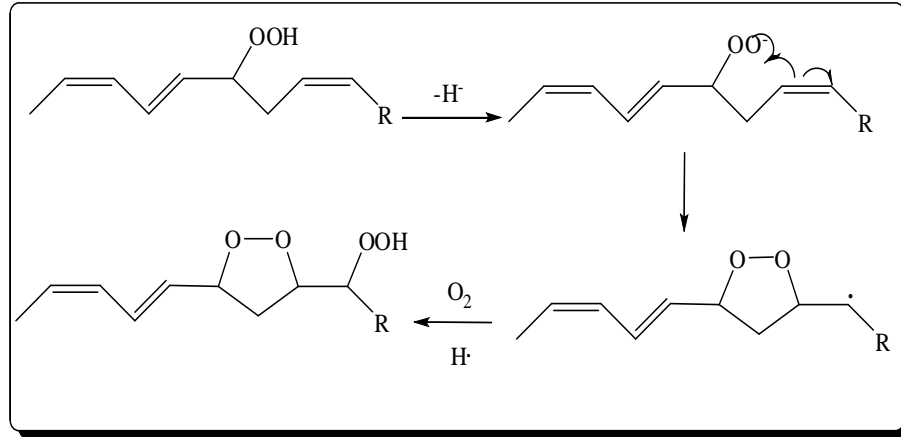
Şekil 5.13. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT⁺²'yi formazana yükseltmesi

O₂^{•-} benzer şekilde metiyonin - riboflavin - ışık sisteminde de üretilmekte ve üretilen O₂^{•-}'i yukarıda verilen mekanizmalar ile aynı şekilde NBT⁺²'yi formazana yükseltmektedir. Oluşan formazan ise 560 nm'de maksimum absorbanı vermektedir.

Sinefrin ve Fenilefrin'in O₂^{•-} giderme aktivitesine ait IC₅₀ değerleri sırasıyla 9,36 µg/ml ve 8,77 µg/ml bulunurken, diğer standartlara ait IC₅₀ değerleri ise BHA için 16.50 µg/ml, BHT için 33.00 µg/ml, α-Tokoferol için 23.10 µg/ml ve Troloks için ise 43.31µg/ml olarak gözlenmiştir (Çizelge 5.5). Sonuçlara bakıldığında Sinefrin ve Fenilefrin benzer aktivite gösterirken standartlara göre her iki madde de çok iyi O₂^{•-} giderme aktivitesi gösterdiği görülmektedir.

Total antioksidan kapasitesi, bir parametre olarak gıda ve tıbbi açıdan biyoaktif bileşenler için en sık kullanılan metodlardan biridir. Lipit peroksidasyonu, hidrojen zengin metilen grupları içeren çoklu doymamış yağ asitlerine serbest radikallerin

saldırısıyla başlayan radikalik zincir reaksiyonlarıdır. Bu zincir reaksiyonların ardarda olmasıyla lipid oksidasyonu meydana gelir ve sonuç olarak bu durum biyolojik moleküllerde birçok hasara sebep olur. Genelde bizim grup çalışmalarımızda ve diğer çalışmalarda bir maddenin total antioksidan kapasitesini belirlemek için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu azaltabilme özelliği test edilir. Peroksitler linoleik asitin oksidasyonu süresince oluşur ve antioksidanların varlığında linoleik asitin oksidasyonu azalır. Bu yüzden antioksidanlar, lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinde, ROS oluşumu ve onların zararlı etkilerine karşı korunmada çok önemli rol oynarlar (Gülçin 2012).



Şekil 5.14. Otooksidasyon sonucu α -linoleik asitin endoperoksite dönüşümü

Sinefrin ve Fenilefrin'in total antioksidan aktivitesi "Tiosiyanat Metoduna" göre belirlendi. Tez kapsamında da geniş bir şekilde anlatıldı ve anlatıldığı üzere bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını (Fe^{+2}) ferrik iyonlarına (Fe^{+3}) yükseltir. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları (Fe^{+3}) tiyosiyanat (SCN^-) ile 500 nm 'de maksimum absorbanı veren $Fe(SCN)^{+2}$ kompleksini oluşturur. Görülen yüksek absorbanı değeri, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazla olduğunun göstergesidir. Deney periyodik olarak 12 saatte bir ölçüm yapılarak toplam 72 saatte gerçekleştirildi. Total antioksidan aktivite, Sinefrin ve Fenilefrin'in $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundaki çözeltilerinin emülsiyonunun 500 nm 'deki absorbanı ölçülerek belirlendi. Daha sonra absorbanı karşı inkübasyon süresine ait

grafik çizildi ve sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Total antioksidan aktivitesinin tayininde, linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunda 10 µg/ml konsantrasyonu için Sinefrin, Fenilefrin ve standart antioksidanlar BHA, BHT, Troloks, α-Tokoferol için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri sırasıyla, %81.91, %86.21 ve %78.10, %82.36, %91.35, %79.00 olarak bulundu.

Fenolik bileşikler türevlerinin antioksidan kapasiteleri aromatik halkaya bağlı olan hidroksil grubunun (-OH) sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Ayrıca bu grupların karşılıklı bağlandığı grup ile sübstüentin de tipine bağlıdır (Rice-Evans *et al.* 1996; Gülçin 2012) bağlı olduğu bilinmektedir. Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksisinamik asit ve türevleri hidroksibenzoik asit ve türevlerinden daha iyi antioksidan kapasiteye sahip oldukları ayrıca bilinmektedir. Hidroksisinamik asit ve türevlerinde $CH_2=CH-COOH$ gurubu bulunmaktadır. Hidroksibenzoik asit ve türevlerinde ise $-COOH$ gurubu bulunur ve daha fazla antioksidan aktivite sağlar (Cuppett *et al.* 1997; Gülçin 2012). Fenol omurgasında bulunan farklı yan grupların varlığı onların antioksidan kapasitelerini ve hidrojen verme kapasiteleri üzerine etki eder. Genel itibariyle süstitüe olmayan fenol bileşiği, hidrojen verici olarak daha az aktiftir. Diğer taraftan, antioksidan aktivite açısından mono fenoller, difenollere göre etkileri azdır. *Orto* veya *Para* pozisyonunda hidroksil grubu gibi elektron verici bir gurubun varlığı fenolik antioksidanların antioksidan aktivitesini artırır (Pokorny 1988; Chimi *et al.* 1991). Bununla birlikte, fenolik halkada bulunan aromatik asit, ester veya lakton gibi karbonil bir grupları da antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır. Fenolik halkada bulunan metoksil grupları sterik engel teşkil eden bir komşu inert grup tarafından fenolik antioksidanların aktivitesini artırır (Dziedzic and Hudson 1984; Göçer and Gülçin 2011).

Daha önce yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarının sayısı ve konumu antioksidan aktiviteyi belirleyen önemli özellikler olduğu bildirilmiştir (Dziedzic and Hudson 1984; Chen and Ho 1997; Göçer and Gülçin 2011). Monofenolik bileşiklerin difenolik ve polifenolik bileşiklere göre daha düşük antioksidan aktiviteye

sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan aktivite-yapı çalışmalarında L-Dopa'nın tirozinden daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu Gülçin tarafından kanıtlanmıştır (Gülçin 2007a). Bu çalışma antioksidan aktivitenin fenolik hidroksil grupları tarafından kontrol edildiğini göstermektedir ve monofenollerin oksidasyon engellemesi bir veya iki metoksi gurubunun varlığında önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca iki fenolik asidin birleşmesiyle elde edilen ürünün monomerlere göre daha çok etkili olduğu belirlenmiştir. Örneğin iki kafeik asidin birleşmesiyle oluşan rozmarinik asidin daha iyi antioksidan aktivite sergilediği bulunmuştur (Gülçin 2006b). Bunun tersine, kafeik asidin şeker birimleri ile esterleşmesinin aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir (Cuvelier *et al.* 1992; Chen and Ho 1997).

Bütün bu çalışmalar ışığında Sinefrin ve Fenilefrin'in çalışılan metotlardaki antioksidan aktivitesi değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan standartlara göre daha düşük antioksidan aktivite sergilemesi tam anlamıyla anlaşılmaktadır. Sinefrin ve Fenilefrin'in molekülünün monofenolik yapıda olması, bir inert komşu grubu bulundurmaması, hidroksil (-OH) ve amin gruplarının (-NH₂) fenolik halkaya bağlı para pozisyonunda bağlanmış olması ve full konjuge sistem çalıştığımız her iki molekül içinde olmaması daha az antioksidan aktivite sergilemesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda son basamak olarak Sinefrin ve Fenilefrin'in AChE üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapıldı. Bilindiği üzere AChE oldukça önemli bir enzimdir. ACh hidrolizini sağlayarak bir nörotransmitter olan bu maddenin iletimi sağlandıktan sonra yıkımını gerçekleştirilir. Asetilkolin ise büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Asetilkolinin güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur (Nacmansohn 1952). AChE, asetilkolin adlı nörotransmitteri asetat ve kolin olarak parçalarken, diğer nörotransmitter, serotonin, dopamin ve norepinefrini parçalamazlar. Serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi nörotransmitterler sinaptik boşluk tarafından absorbe edilirler ve merkezi sinir iletiminde önemli rol oynarlar. AChE başlıca beyin, sinir hücreleri, kas ve eritrositlerde bulunur. Psöodokolinesteraz ise aynı mekanizmaya sahiptir ancak plazmada bulunmakta ve asetilkolin yıkımını dolaşımında sağlamaktadır. Asetilkolinesteraz sinir ucu önünde biriken kimyasalları parçalayarak oradan

uzaklaştırır. Böylece arkadan gelen elektron taşıyıcıların önü sürekli açılır ve iletimde herhangi bir aksama yaşanmaz (Wilson and Nachmansohn 1954).

Aktive edilmiş nötrofiller ve makrofajlardan üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidanlar, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve ağırlı patojenik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Gibson and Huang 2005; Fawole *et al.* 2010). Alzheimer hastalığı, farklı biyokimyasal yolların arızaları bir sonucu olarak ortaya çıkar ve genellikle yaşlı kişilerde görülür.

Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalmasına neden olmaktadır. Bu hastalıkta en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir. Hastalığın tedavisi için ya da engellenmesi için asetilkolin yıkımı azaltılmalıdır ve bu durum asetilkolini yıkan AChE'nin inhibisyonu ile mümkündür. AChE aktif bölgesi, beş ana bağlanma bölgesinden oluşur. İlk olarak oksianyon çukuru tetrahedral geçiş haliyle dengededir. AChE'nin ikinci aktif bölgesi, esteratik bölgedir. Bu bölge serin rezidülerinden oluşur ve esteratik karbonil grubuna (C-O) saldırır. Üçüncü aktif bölge, anyonik substratların bağlama bölgesidir bu bölgede negatif yük az sayıdaarken aromatik rezüdüler çok sayıdadır. Bilindiği gibi ACh'nin quarterner amonyum ucu bulunmaktadır. Bu aktif bölgedeki aromatik gruplarının Z elektronları ACh'nin quarterner N atomuna tercihli etkileşimi sayesinde bağlanır. Dördüncü aktif bölge seçici aromatik bağlanma bölgesidir. Bu bölgede esteratik ve anyonik bölgeler yakındır. Bu nedenle bu aktif bölge aril substratlar ve aktif bölge ligandları için önemlidir. Son olarak beşinci aktif bölge periferik anyon bağlanma bölgesidir. Periferik anyonik bağlanma alanı aktif kısımdan ayrılan grubun hidrofobik parçasına bağlanabilir. Bu şekilde AChE'nin farklı mekanizmalar üzerinden yürüyen bağlanma bölgelerinin olması Alzheimer hastalığının tedavisi için girilen AChE inhibitör arayışını olumlu yönde desteklerken çalışılacak inhibitör çeşitliliğinin artmasına neden olmaktadır (Göçer *et al.* 2013). Alzheimer hastalığı için kullanılan ve dizayn edilen ilaçlar asetilkolin seviyesini ayarlama kullanılır ve ona göre dizayn edilir (Heinrich and Teoh 2004). Asetilkolin sinapslarda sinyal aktarımında görev alır. Sinapslara sinyal iletimi gittikten sonra AChE ile hidrolizlenerek kolin ve asetat bileşiğine parçalanır. Bugüne kadar bu konuyla alakalı

çalışmalar genellikle AChE üzerine inhibisyon etkisi için çalışılan ilaçlar ve inhibitör olarak dizayn edilen ilaçlardır. Bu ilaçların birçok yan etkisi vardır. Yan etkilerden bazıları; gastrointestinal sistem rahatsızlıkları, hepatotoksisite, bulantı, kusma, ishal, baş dönmesi ve bunlarla ilgili çok çeşitli sorunlardır (Schulz 2003). İlaçların yan etkilerinin olması hastalığı tedavi ederken başka ciddi rahatsızlıklara sebep olması, AChE için daha iyi inhibitör olan doğal kaynaklara ilgiyi artırmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız Sinefrin doğal kaynaklı bir mono fenoliktir. Bu anlamda AChE inhibitörü olarak ilaç dizaynında kullanılması mümkündür. Çalıştığımız maddeler fenolik yapıdadır ve fenolik bileşikler serbest radikali giderme özelliklerine sahiptirler. Serbest radikaller doku ve hücrelerde birçok hastalığa sebep olmaktadır ve bu hastalıklardan biride Alzheimer hastalığıdır. Fenolik bileşikler serbest radikalleri giderdiği gibi onların neden olduğu hastalıkları da engellerler. İşte çalışmamızda kullandığımız Sinefrin ve Fenilefrin AChE inhibisyon özellikleri yönünden değerlendirildi. AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi araştırılarak inhibisyon türü, K_i ve IC_{50} değeri belirlendi. Bu çalışma Ellman metoduna göre belirlendi (Ellman 1961). Sonuçların μM seviyede olması antioksidan ve radikal giderme özelliği de taşıyan Sinefrin ve Fenilefrin için beklenen bir sonuçtur.

Çizelge 5.6. Asetilkolin esteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sinefrin ve Fenilefrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50} (μM)	K_i Ortalama (μM)	İnhibisyon Türü	R^2
Sinefrin	0,226	0,169	Yarışmalı	0,9816
Fenilefrin	0,302	0,088	Yarışmalı	0,9765

Yapılan inhibisyon çalışmalarının sonuçları, IC_{50} , K_i değeri ve inhibisyon türleri Çizelge 5.6'de verilmiştir.

Bütün bu sonuçlar göze alındığında farmakolojik çalışmalarda yol gösterici olabileceği bunun yanısıra bulunan sonuçların alzheimer hastalığının ve bu hastalığın tedavisinin araştırılması açısından tetikleyici bir unsur olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abuja, P.M., Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Antioxidant and prooxidant activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density-lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4091-4096.
- Ak, T., 2006. Curcuminin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbaba, Y., Akıncioğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013a. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry* DOI: 10.3109/ 39 14756366.2012.750311
- Akbaba, Y., Balaydın, H.T., Menzek, A., Göksu, S., Şahin, E., Ekinci, D., 2013b. Synthesis and biological evaluation of novel bromophenol derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Archiv der Pharmazie Chemistry*, 346, 447-454.
- Akıncioğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1379-1385.
- Akıncioğlu, A., Topal, M., Gülçin, İ., Göksu, S., 2014. Novel Sulphamides and Sulphonamides Incorporating the Tetralin Scaffold as Carbonic Anhydrase and Acetylcholine Esterase Inhibitors. *Archive der Pharmazie Chemistry*, 347,68-76.
- Allam, A.R., Sridhar, G.R., Das, U.N., 2007. Elevated butrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypothesis*, 69, 6, 1272-1276.
- Alterio V., Fiore D.A., Katia D'Ambrosio, Supuran C.T., Simone G. D., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *American Chemical Society*, 112, 4421-4468.
- Altınışık, M., 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A. D. Aydın.
- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Anonim, 2006. Bitkilerde doğal renk maddeleri ve fenolik bileşikler. mesleki eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi, Ankara
- Anonmyous, 1984. Soymilk in brief. a case that makes sense. STS soya technology systems Ltd. 11 Dhoby Ghaut 11-06 Cathay Building Singapore, 0922.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir S.E., Erça E. 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292-304.
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj A., 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233-1240.

- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137-5149.
- Arouma, O.I., Cuppett, S.L., 1997. Antioxidant methodology- *in vivo* and *in vitro* concepts. AOCS Pres. USA, pp 141-172.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma tedavisinde kullanılmaya aday karbonik anhidrazi inhibitörlerinin sentezi ve inhibisyon etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Arslan, O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 66, 982-983.
- Atkins, C.A., Patterson, B.D., Graham, D., 1972. Plant carbonic anhydrases. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218-223.
- Balaydın, H.T., Şentürk, M., Göksu, S., Menzek, A., 2012. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols and their derivatives including natural products: vidalol B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 423-428.
- Başkurt S. 2010. Ege ve akdeniz bölgelerinden toplanan karasinek (*Musca domestica* L.) populasyonlarında ace geninin kısmi baz dizi analizinin yapılması ve bu örneklerde % kalan asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin belirlenmesi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Muğla.
- Baysal, T., Ersus, S., 1999. Karotenoitler ve insan sağlığı. *Gıda*, 24, 177-185.
- Becker, L.B., Vanden H.T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q., 1999. Schumacker P.T. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology*, 277, 2240- 2246.
- Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W., Wayner, D.D.M., 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology and Medicine*, 2, 419-444
- Benzie, I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. *Biochemistry*, 7. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Denizli A., Özden A. K.), Palme Yayıncılık.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 35-39.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L.L., Simonetti, R.G., Glud, C., 2007. Antioxidant supplements for primary and secondary prevention systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*, 297, 842-857.

- Blekas, G., Boskou, D., 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenil acetic acid and a-tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. *Grasasy Aceites*, 49, 34-37.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant deteminations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Botcher, K., Waheed, A., Sly, W. S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the Crab Gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- 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.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören A.C., 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*; 51, 66-74.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Hisar, RO., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Canfield, LM., Valenzuela, JG., 1993. Cooxidations, significance to carotenoid action *in vivo*. *Annual New York Academic Science*, 691, 192-199.
- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F., 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stress-included ulcer formation in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 31, 199-203.
- Carlson, P., 1992. *Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya* (Editör: Telefoncu, A.) Kırkkaleli. 420.
- Cemeroğlu, B., F. Karadeniz, 2001. *Meyve ve Sebze Besleme Teknolojisi 2. Cilt: Meyve Suyu Üretim Teknolojisi*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 25, Ankara, 384 s.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2004. *Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi, Meyve Sebze İşleme Teknolojisi*, 1-174. In Ed. B. Cemeroğlu, *Meyve Sebze Teknolojisi. 2. Baskı*, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y. and Carter, N., 2000. The carbonic anhydrase-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Chen, J.H., Ho, C.T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 45:2374-2378
- Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhshtein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible

- productive criteria for tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90, 1102-1106.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society, 68, 307-312.
- Chua, M.T., Tung, Y.T., Chang, S.T., 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. Bioresource Technology, 99, 1918-1925.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127, 233-242.
- Coffey, M.D., Cole, R.A., Colles, S.M., and Chisolm, G.M. 1995. *In vitro* cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid and peroxyl radicals. Journal of Clinical Investigation, 96; 1866–1873.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. Nutritional Biochemistry, 7, 66-76.
- Cuppert, S., Schnepf, M., Hall, C., 1997. Natural antioxidant-are they a reality? Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications. AOCS Press, Champaign.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berst, C. 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. Biosciences Biotechnology Biochemistry, 56, 324-325
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Menzek, A., Gülçin, İ. 2012. Synthesis and antioxidant properties of (3,4-dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone and its derivatives. Archive Der Parmazie, 345,323–334.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: *in vivo* and *in vitro* studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 266-270.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase *in vitro* and *in vivo*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30, 2257-2261.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Marine Environmental Research, 56, 443–470.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., 2004. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer's disease. the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. Drugs Aging, 21, 453-478.
- Davies, K., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 50, 279-289.
- Dawes, H.W., Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwi fruit juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2398-2403.

- Defeng, W., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress and free radical damage, *Alcohol Research and Health*, 27, 277-284.
- Dembele, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 731-742.
- Demir, H., Turkoglu, V., 2005. Effects of neostigmine methylsulphate on enzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plasma, muscle and liver *in vivo*. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 32, 25-30.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry With Clinical Correlations*. Kanada
- Dinis T.C.P., Maderia, V.M.C., Almeida L.M., 1994. Action Of Phenolic Derivates (Acetaminophen, Salicylate and 5-aminosalicylate) As Inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Diplock, A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 p. Belgium.
- Diplock, A.T., 1997. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radical Research*, 27, 511-532.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid. M., Stahl, W., Vina-Ribes, J., 1998. Functional foodscience and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80,77-112
- Dizdaroğlu, M., 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10, 225-42.
- Dodgson, S.J., 1991. The carbonic anhydrases: overview of their importance in cellular physiology and in molecular genetics. *Cellular Physiology and Molecular Genetics*. Plenum Press, New York, pp. 3-14.
- Doğan E., 2011. İnotropik ajan olarak kullanılan dobutamin ve levosimendanın rat torasik aortunda invitro ortamda vasküler tonüs üzerine olan etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Isparta.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S., Waterhouse, A.L., 1998. Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1247-1252.
- Dragsted L.O., Strube M., Leth T., 1997. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention*, 6,522-528.
- Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., Collins, A. R. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research* 56,1291-1295.
- Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.f., 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 14,45-51.
- Ekinci, D., M. Al-Rashida, G. Abbas, M. Senturk and C.T. Supuran, 2012a. Chromone containing sulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 27, 744-747.
- Ekinci, D., N.I. Kurbanoglu, E. Salamci, M. Senturk and C.T. Supuran, 2012b. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human and bovine isoenzymes by benzenesulphonamides, cyclitols and phenolic compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 27, 845-848.

- Elliot, J.G. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*, 53, 46-48.
- Ellman G.L. Courtney K.D. Andres V. Featherston R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Elmastas, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y., 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 258-266.
- Elmastas, M., Türkecul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148.
- Ewald, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., Akesson, B., 1999. Effect of processing on major flavanoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.
- Farell, J. M., Barber, M., Krause, D., Litovitz, T.A., 1997. Effects of low frequency electromagnetic fields on the activity of ornithine decarboxylase in developing chicken embryos. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 91-96.
- Fawole, O.A., Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Light, M.E., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2010. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 235-241
- Feldstein, J.B., Silverman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Fennema O.R. 1996. *Food Chemistry*. Third Edition, University of Wisconsin-Madison
- Dragsted LO, Strube M, Leth T (1997) Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention* 6, 522-528
- Fernandez-Lopez,j., Zhi N., Aleson-Carbonell I.,Perez-Alvarez, A., Kuri, V., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extract,application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72: 55-63.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D'angelo, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 420-425.
- Finkel, T., Holbrook N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, 408, 240-247
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritiene, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.

- Frel, B., 1994. Natural Antioxidants in Human Health and Disease, Academic Press. Sandiego. pp387-409.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide radical:an endogenous toxicant. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 23, 239-257.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.
- Fujikawa, A.K., Nishimori, I., Taguchi, T., Onishi, S., 1999. Human carbonic anhydrase XIV (CA14): cDNA cloning, mRNA expression, and mapping to chromosome 1. Genomics, 61, 74-81.
- Gervais, M.R. and B.L. Tufts. 1999. Carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 123, 343-350.
- Gibson, G.E., Huang, H.M., 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 26, 575-578.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., 1999. Effect Of Postharvest Storage And Processing On The Antioxidant constituents (Flavonoids And Vitamin C) Of fresh-cut spinach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2213-2217.
- Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW 2004. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. Journal of Neuroimmunology, 149, 101-109
- Gorinstein, S., O. Martin-Belloso, Y.S. Park, R. Haruenkit, L. Lojek, M. Ciz, A. Caspi, I. Libman and S. Trakhtenberg, 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrusfruits. Food Chemistry, 74, 309-315.
- Göçer, H., 2013. Antioxidant properties of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) seeds. International Journal of Academic Research, 5, 120-124.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. Archiv der Pharmazie, 346, 783-792.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. International Journal of Academic Research , 5, 149-154.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62, 821-825.
- Gökalp, N., 2006. Doğal antioksidanlar, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gülçin İ., 2007a. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. Amino Acids, 32, 431-438.
- Gülçin İ., Bursal E., Sehitoğlu M.H., Bilsel M., Gören A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum. Food and Chemical Toxicology, 48, 2227-2238.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s114.

- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2006a. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, 78, 803–811.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as Trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. *Chemico-Biological Interaction*, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 287-293.
- Gülçin, İ., Beydemir, S. 2013. Fenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 408-30.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. *In vitro* antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu M.E., 2004f. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 613-616.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34, 193-202.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003b. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34, 278-281.
- Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 22, 685-695.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Sciences and Technology*, 43, 195–212.
- Gülçin, İ., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21, 354-361.
- Gülçin, İ., Gagua, N., Beydemir, S., Bayram, R., Bakuridze, A, Gepdiremen, A. 2012b. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from

- Vinca herbacea Waldst. and kit. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27, 528-32.
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. joannis. Research Journal of Biological Sciences, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004c. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006a. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. Phytotherapy Research, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food Chemistry, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004d. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). Food Chemistry, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004b. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.). Italian Journal of Food Sciences, 16, 17-30.
- Haaz, S., Fontaine, K.R., Cutter, G., Limdi, N., Perumean-Chaney, S. ve Allison, D.B., 2006. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. Obesity Reviews, 7, 79-88.
- Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. Drugs, 42, 569-605.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal, 219, 1-4.
- Halliwell, B., 1989. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. Acto Neurologica Scandivanica, 126, 23-33.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. Nutritional Review, 52, 253-265.
- Harborne J.B., 1986. In: Cody V, Middleton E, Harborne JB, Alan R (eds) Plant flavonoids in biology and medicine. Liss, New York, pp 15-24
- Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P., 1999. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edn. Taylor and Francis, London
- Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids advances in research since 1986. Chapman and Hall/CRC, p.638, USA.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M., Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: A Biochemical interaction study. Toxicology, 185, 1-8.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. FASEB Journal, 10, 481-490.
- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local caucasian knowledge. Journal of Ethnopharmacol, 92, 147-162.
- Herbert, V., 1997. "The value of antioxidant supplements vs their natural counterparts", Journal of the American Dietetic Association, 97, 375-376.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hudson, B.J.F., 1990, *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London and New York, p 1–316.
- Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *The Science of the Total Environment*, 248, 45-50.
- Innocenti A., Ozturk Sarikaya S.B., Gülçin İ., Supuran C.T., 2010a. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 18, 2159-2164.
- Innocenti, A., Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2010b. Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenols effectively inhibit mammalian isoforms I-XV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5050–5053.
- Ishikawa, K., Hashimoto, H., Mitani, S., Toki, Y., Okumara, K., Ito, T., 1995. Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: roles of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes. *International Journal of Cardiology*, 47, 225-233.
- Jabusch, J.R., Deutsch, HF., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-Nitrophenyl acetate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238, 170-177.
- Jiang, Q., Christen S., Shigenaga M.K., Ames B.N., 2001. Gammatocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74, 714-722
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., 2006. Bazı üzümü meyvelerde toplam fenol ve antosiyanin içerikleri. II. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 309-312.
- Kaviarasan, S., Naik, G.H., Gangabagirathi, R., Anuradha, C.V., Priyadarsini K.I., 2007. *In vitro* studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry* 103, 31–37
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2005. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*.
- Keilin, D., Martin, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Kitchen, B.J., Masters, C.J., Winzor, D.J., 1973. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase. *Biochemical Journal*, 135, 93-99.
- Kneepkens, C. M., Lepage, G., Roy, C. C., 1994. The Potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 17, 127–160.
- Koshland, D., 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 44, 98-104.
- Köksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoğlu, F., Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of *melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 217-222.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea L.*) *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 65-78.

- Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., 2009. On the *in vitro* antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 395–405.
- Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Gitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B., Whitesides, G.M., 2008. *Chemical Reviews* 108, 946–1051.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During In Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakkis, M.M., Bergenhem, N.C.H., Tashian, R.E., 1996. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in *E-Coli* and demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 268-272.
- Lehninger, A. L., 1993. *Principles of Biochemistry*, New York, Worth Publishers, 2th Edition., 198-239.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principles of Biochemistry*, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Liang, J.Y., Lipscomb, W.N., 1991. Substrate and inhibitor binding to human carbonic anhydrase II: a theoretical study. *International Workshop on Carbonic Anhydrase (Spoleto, Italy VCH Verlagsgesellschaft, pp. 50-64)*
- Lichtenthaler, R., Marx, F. and Kind, O.M., 2003. Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay, *European Food Research and Technology*, 216,166–173.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology and Therapeutics*, 74, 1-20.
- Lloyd, R.V., Hanna, P.M., Mason, R.P., 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*; 22, 885- 888.
- Loeckie, L., Zwart, D., John, H., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in human. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 202-226.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41, 1814-1818.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2046–2056.
- Magalhaes L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima J.L.F.C., 2009. Flow injection based method for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77, 1559-1566.
- Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiological Reviews*, 47, 595-781.
- Maren, T.H., 1987. Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research. *Drug Development Research*,10, 255-276.
- Massie, B. M., Szlachcic, Y., Tabau, J. F., 1993. Scintigraphic and electrocardiographic evidence of silent coronary artery disease in asymptomatic hypertension: a case control study. *Journal of the American College of Cardiology*, 22, 1598-1606

- Mavi, A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s.52-53, Erzurum.
- Megep, 2006. Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167-1179.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. *Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, pp. 618-649.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H., 1997. Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2970-2977.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual source. *Food Chemistry*, 72, 145-171
- Mugnaini, V., Lucarini, M., 2007. Hydrogen bonding affects the persistency of alkyl peroxy radicals. *Organic Letters*, 9, 2725-2728.
- Nachmansohn, D., 1952. In *Modern Trends in Physiology, Biochemistry*. Academic Press, New York. 229.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.
- Neşe Ç., 2003, Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28, 54-61.
- Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y., 1985. Oxidation of lipids: VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58,1971-1975
- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y., 1982. Regeneration of vitamin E from a-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chemistry Letters*, 27,789-792
- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., Nivano, Y., 2005. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 714-716.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J., Robin, G.C., 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays*, 21, 1031-1042
- Oakeshott, J.G., Van Papenrecht, E. A., Boyce T. M., Healy, M. J., Russell, R. J. 1993. Evolutionary genetics of drosophila esterases. *Genetica*. 90, 239- 268.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of isgin (*Rheum ribes* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047- 3055.
- Oliveira, I., Valentao, P., Lopes, R., Andrade, P.A., Bento, A., Pereira, J.A., 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleraceae* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*, 92, 129-134.

- Omura, K., 1995. Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1565–1570
- Orağlı, K. M., 2001. *Klinik Oftalmoloji*. 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., 2002a. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2772–2777.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002b. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122–3128
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Sciences*, 68, 487-490.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin İ., Supuran, C.T., 2011. *In vitro* inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 21, 4259-4262.
- Paiva, S.A., Russell, R.M., 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, 426-33,
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C., 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art. *Therapeutic Applications and Future Prospects*, 119, 199-229.
- Payzın, S., 2000. Hiper tansiyon ve Damarlar. *Türkiye Klinikleri Kardiyoloji*, 13, 349-51
- Pehlivan, M., Gülerüz, M., 2004. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 33,51- 57.
- Pellati F, Benvenuti S, Melegari M, Firenzuoli F. 2002. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. amara by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 1113–1119.
- Penzak, S.R., Jann, M.W., Cold, J.A., Hon, Y.Y., Desai, H.D. Gurley, B.J., 2001. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *Journal of Clinical Pharmacology*, 41, 1059–1063.
- Phillips, D. C., 1996. The tree-dimensional structure of an enzymes molecule. *Science*, 215, 78.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Pokorny, J., 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan H (ed) Academic Press, London, p 141.

- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 433-446.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Prior, R.L., Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.
- Putzbach, K., Rimmer, C.A., Sharpless, K.E. Sander, L.C., 2007. Determination of bitter orange alkaloids in dietary supplements Standard reference materials by liquid chromatography with ultraviolet absorbance and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1156, 304-311.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. 1993. Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by beta-carotene. *Arterioscler Thromb*, 13, 590-600.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1120, 81-86.
- Rice-Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24,790–795.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J.T. 1964. Carbonic anhydrase, from human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 1065-1078.
- Roex, E.W.M., Keijzers, R., Gestel, C.A.M., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology* 64, 451-460.
- Sahin, H., Yazıcı, T., 2007. Alzheimer hastalığı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun. Klinik Gelişim Dergisi*, 48- 52.
- Saldamlı, İ., 2007. *Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları*. Ankara, 463-492.
- Saleh, M.M., Hashem, F.A.E., Glombitza, K.W., 1998. Study of Citrus *aitensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated. *Food Chemistry*, 63, 397-400.
- Santana, J., Sharpless, K.E. ve Nelson, B.C., 2008. Determination of para-synephrine and meta-synephrine positional isomers in bitter orange containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS. *Food Chemistry*, 109: 675-682.
- Schoneich, C., 1999. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach, *Experimental Gerontology*, 34, 19-34.
- Schulz, V., 2003. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trial and guidelines fail to consider. *Phytomedicine*, 10,74-79.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2002. *Biorganic Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1177-1180. With permission from Elsevier.

- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations: Enzim kinetics. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32, 67-103.
- Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food Phenolics Sources Chemistry Effects Applications. Technomic Publication, pp. 235-277 USA.
- Sharp E.N., Rupper, P., Miller, T.A., 2008. The structure and spectra of organic peroxy radicals. Physical Chemistry Chemical Physics, 10, 3955-3981.
- Sherwin, E. R., 1990, Food Additives. Ed. by L. Branen, pp. 139-193. Marcel Dekker, New York.
- Sherwin, E.R., 1972. Antioxidants for food fats and oils. Journal of American Oil Chemist's Society, 49, 468-472.
- Sies, H., Stahl, W., 1995. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. The American Journal of Clinical Nutrition, 62, 1315-1321.
- Simic, M.G., 1981. Free radical mechanism of autoxidation process. Journal of Chemical Education 58, 125-131.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food and Chemical Toxicology, 46, 3295-3302.
- Sly, S.W., Hu, Y.P., 1995. Human Carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. Annual Reviews, 64, 375-401.
- Soreq, H., Zakut, H., 1993. Human acetylcholinesterases and anticholinesterases. The American Society of Human Genetics, 55, 593-594.
- Söyüt H., 2006. Gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- St Angelo, A.J., 1996. Lipid oxidation in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36,175–224
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S., 2007. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). Food Chemistry, 102, 764-770.
- Supuran, C. T., Manole, G., Andruh, M., 1993. Carbonic anhydrase inhibitors part II. coordination compounds of heterocyclic sulfonamides with lanthanides are potent inhibitors of isozymes I and II. Journal of Inorganic Biochemistry, 49, 97-103.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors part 94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamidederivatives as antitumor agents?. European Journal of Medicinal Chemistry, 35, 867-74.
- Supuran, C.T. Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature Reviews Drug Discovery, 7, 168-181.
- Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidan, W.R., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents? Bioorganic and Medicinal Chemistry, 9, 703-714.

- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M. and Banciu, M.D., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-thiophene- and pyrrole-carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering properties as aqueous suspensions. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 8, 2145-2155.
- Şanlı, Y. 1988. Veteriner Farmakoloji Kemoterapotik İlaçlar, Veteriner Fakültesi Yayınları, p 658- 696.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan A., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 3207-3211.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2011. *In vitro* inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds *Chemical Biology and Drug Design*, 77, 494-496.
- 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* 13, 657-671.
- Tan S., Evans R., Singh B., 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crop. *Amino Acids*, 30, 195–204.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic-anhydrases. *Advances In Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine*, 30, 321-356.
- Tee, E.S., 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 103-163.
- Temel, H.E., 2008. Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Tobin, A.J., 1970. Carbonic anhydrase from parsley leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2656-2666.
- Tuovinen, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. *Toxicology*, 196, 31–39.
- Uçar, E.Ö., Karagöz, A., Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, 77, 556-560.
- Ünal, G., Gürkan, M.O., 2001. İsektisitler Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri, Ethemoglu Ofset Matbacılık, 3- 24p.
- Vaklinova, S.G., Goushtina, L.M., Lazova, G.N., 1982. carbonic anhydrase activity in chloroplasts an chloroplast fragments. *Comptes Rendus de l'Academic Bulgare des Sciences*, 37, 677-680.
- Vale, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102,103: 649-652.
- Valenzuela, A.B., Nieto, S.K., 1996. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 47, 186-196
- Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Bast, A., 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511–517

- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63, 335-342.
- Weber P, Bendich A, Schalch W., 1996. Vitamin C and human health a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66, 19-30.
- Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2959-2962.
- Wichi, H.P., 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717-723.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-54.
- Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
- Wilson, I.B., Nachmansohn, D., 1954. In *Ion Transport Across Membranes*. Academic Press, New York. 35s.
- Wistrand, P.J. 1981: The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte. *Acta Physiologica Scandinavica* 113: 417-26.
- Wright A., Bubb W.A., Hawkins C.L., Davies M.J.. 2002. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochemistry and Photobiology*, 76, 35-46.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their mutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27-32.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
- Yoshida, T., Chou, T., Haba, K., Okano, Y., Shingu T, Miyamoto K, Koshiura R, Okuda, T., 1989. Camelliin B and nobotanin I, macrocyclic ellagitannin dimmers and related dimmers, and their antitumor activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 3174-3176.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S., Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143:190-194.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini ise İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında yüksek lisans tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı ve çalışmalarına halen devam etmektedir.