

**OKTOPAMİN: ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ ve  
İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ  
(hCA I ve hCA II) ÜZERİNE ETKİSİ**

**Cüneyt ÇAĞLAYAN**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN  
2013  
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OKTOPAMİN: ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ ve  
İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ  
(hCA I ve hCA II) ÜZERİNE ETKİSİ**

**Cüneyt ÇAĞLAYAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2013**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

OKTOPAMİN: ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I ve hCA-II) ÜZERİNE ETKİSİ

Prof. Dr İlhami GÜLÇİN.danışmanlığında, Cüneyt ÇAĞLAYAN tarafından hazırlanan bu çalışma 21./01./2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

İmza

Üye : Prof.Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Doç.Dr. Ahmet MAVİ

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU  
Enstitü Müdürü

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

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

OKTOPAMİN: ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ  
İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) ÜZERİNE ETKİSİ

Cüneyt ÇAĞLAYAN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu çalışmada oktopaminin antioksidan ve radikal giderme aktivitesi değerlendirildi. Ayrıca oktopaminin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi (hCA I ve hCA II) üzerine etkisi incelendi.

Oktopaminin antioksidan ve radikal giderme aktivitesini değerlendirmek için ferrik tiyosiyanat metoduna göre 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS<sup>+</sup>) giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH<sup>•</sup>) giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD<sup>+</sup>) giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) giderme aktivitesi, potasyum ferriksiyanit indirgeme, Kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu<sup>2+</sup>) indirgeme ve FRAP metotları ile indirgeme kapasitesi ve bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe<sup>2+</sup>) şelatlama aktivitesi çalışıldı. Ayrıca α-tokoferol ve onun suda çözünen bir analogu olan troloks referans antioksidan olarak kullanıldı. Oktopamin kullanılan bütün metotlarda antioksidan ve radikal giderme aktivitesinin standartlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Çalışmanın ikinci kısmında ise oktopaminin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi (hCA-I ve hCA-II) üzerine *in vitro* etkisi araştırıldı. Öncelikle hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla Sepharose-4B-L-Tirozin Sülfanilamit afinite kolon kromatografisi ile sırasıyla %23,9, %36,5 verimle 113 ve 478,4 kat saflaştırıldı. Enzim saflığını belirlemek için, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda oktopaminin hCA I ve hCA II'yi aktivite ettiği gözlemlendi. Bu amaçla oktopaminin hCA I ve hCA II üzerine aktivasyon etkileri 4-nitrofenil asetat substratı ile esteraz aktivite metodu kullanılarak araştırıldı.

**2013, 99 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, radikal giderme, indirgeme kuvveti, karbonik anhidraz, oktopamin

## ABSTRACT

Master Thesis

OCTOPAMINE: ITS ANTIOXIDANT CAPACITY and ITS EFFECT ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA I and hCA II)

Cüneyt ÇAĞLAYAN

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In this study, antioxidant and radical scavenging activities of octopamine were evaluated. Also, the effects of octopamine on human erythrocyte isoenzymes (hCA I and hCA II) were determined.

In order to evaluate the antioxidant and radical scavenging activities of octopamine, different *in vitro* methods such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS<sup>•+</sup>) scavenging activity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (DPPH<sup>•</sup>) scavenging activity, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine radical (DMPD<sup>•+</sup>) scavenging activity, superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) scavenging activity, reducing power by potassium ferricyanide reduction method, cupric ion (Cu<sup>2+</sup>) reduction capacity by Cuprac method, hydrogen peroxide scavenging activity and ferrous ions (Fe<sup>2+</sup>) chelating activities using by bipyridyl reagent were performed separately. Also,  $\alpha$ -tocopherol and trolox, a water-soluble analogue of  $\alpha$ -tocopherol, were used as the reference antioxidant compounds. Octopamine exhibited weaker antioxidant and radical scavenging effects in all of the used methods.

In the second part of this study, the *in vitro* effects activity of octopamine on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (hCA-I and hCA-II) were investigated. Firstly, hCA-I and hCA-II were purified by Sepharose-4B-L-Tyrosine Sülfanilamid affinity column chromatography with yields of 23,9 and 36.5% and 113.0 and 478,4 fold purifications of each isoenzyme, respectively. For determination of enzyme purity, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed and single band was observed. Then, it was observed that octopamine had activity effects hCA I and hCA II. For this purpose, the activity effects of octopamine on hCA I, and hCA II were investigated by using the esterase assay, with 4-nitrophenyl acetate as substrate

**2013, 99 pages**

**Keywords:** Antioxidant activity, radical scavenging, reducing power, carbonic anhydrase, octopamine

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum alışmamın 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 imkanlarını benden esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr., Abdullah MENZEK'e Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVIÖĐLU'na, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye,

Çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini gördüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı alışanları arkadaşlarım Meryem NAR, Pınar ANNAKKAYA, Hatice HAN, Hülya GÖÇER ve Fevzi TOPAL başta olmak üzere bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım anneme ve babama derin minnet ve saygılarımı sunarım.

Cüneyt ÇAĞLAYAN

Ocak, 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Serbest Radikaller ve etkileri .....	1
1.2. Antioksidanlar .....	5
1.2.1. Endojen antioksidanlar.....	8
1.2.2. Ekzojen antioksidanlar.....	11
1.3. Oktopamin.....	18
1.4. Karbonik Anhidraz.....	20
1.5. Çalışmanın Amacı.....	24
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>28</b>
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	28
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	28
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	29
3.1.3.a. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	29
3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler..	29
3.1.3.c. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler.....	30
3.1.3.d. ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	30
3.1.3.e. DMPD <sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	30
3.1.3.f. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	31
3.1.3.g. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler .....	32
3.1.3.h. Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler .....	32
3.1.3.i. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler....	33

3.1.3.j. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler.....	35
3.2. Antioksidan çalışmaları.....	36
3.2.1. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi tayini .....	36
3.2.2. Cu <sup>2+</sup> -Cu <sup>+</sup> indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu) tayini .....	36
3.2.3. Süperoksit anyon radikali (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) giderme aktivitesi tayini.....	36
3.2.4. DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini.....	37
3.2.5. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini.....	37
3.2.6. DMPD radikali giderme aktivitesi tayini.....	38
3.2.7. FRAP indirgeme kapasitesi tayini.....	38
3.2.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini.....	39
3.3. Oktopaminin karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar.....	39
3.3.1. Deneyde kullanılacak kanın temini.....	39
3.3.2. Enzim saflaştırma çalışmaları.....	39
3.3.2.a. hCA enzim hemolizatının hazırlanması.....	39
3.3.2.b. hCA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar.....	40
3.4. hCA Enzim aktivitesi tayini.....	42
3.4.1. Hidrataz aktivitesi.....	42
3.4.2. Esteraz aktivitesi.....	43
3.5. Protein tayini.....	45
3.5.1. Kalitatif protein tayini.....	45
3.5.2. Kantitatif protein tayini.....	46
3.6. hCA Enzimi için yapılan kinetik çalışmalar .....	46
3.6.1. Enzim için K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar.....	46
3.7. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	47
3.8. hCA I ve hCA II İzoenzimleri aktiviteleri üzerine oktopaminin etkilerinin belirlenmesi.....	47
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>48</b>
4.1. Antioksidan çalışmalar ile ilgili araştırma bulguları.....	48



4.1.1. Fe <sup>3+</sup> -Fe <sup>2+</sup> indirgeme kuvveti bulguları .....	48
4.1.2. Cu <sup>2+</sup> -Cu <sup>+</sup> indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları .....	49
4.1.3. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları .....	50
4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları.....	52
4.1.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları .....	53
4.1.6 DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları .....	55
4.1.7. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları.....	57
4.1.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulguları .....	58
4.2. Karbonik anhidraz enzimi ile ilgili yapılan çalışma bulguları.....	59
4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik .....	59
4.2.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları .....	60
4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları.....	61
4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları.....	62
4.2.4.a. Enzim için K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmaların sonuçları.....	62
4.2.5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	64
4.2.6. hCA I ve hCA II izoenzimleri aktiviteleri üzerine oktopamin etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları.....	64
4.2.6.a. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde etkisi gösteren oktopamin ilgili sonuçları.....	65
4.2.6.b. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde etkisi gösteren oktopamin ile ilgili sonuçları.....	65
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>100</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS <sup>+</sup>	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD <sup>+</sup>	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH <sup>•</sup>	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
E.Ü.	Enzim Ünitesi
E:C.	Enzim kod numarası
hCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
K <sub>m</sub>	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
LOO <sup>•</sup>	Lipit peroksit radikali
LOOH	Lipit hidroperoksit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
PG	Propil gallat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBHQ	<i>tert</i> -Bütihidrokinon
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V <sub>max</sub>	Maksimum hız

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizması.....	10
Şekil 1.2. BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi bazı sentetik antioksidanların açık yapıları.....	11
Şekil 1.3. $\alpha$ -Tokoferolün radikal giderme mekanizması.....	12
Şekil 1.4. C Vitaminin kimyasal yapısı ve enolat formu.....	14
Şekil 1.5. Bir flavonoit olarak kuersetin molekülünün DPPH radikali giderme mekanizması.....	17
Şekil 1.6. $\beta$ -Karotenin açık yapısı.....	17
Şekil 1.7. Çalışmada kullanılan oktopaminin açık kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.8. Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli ve katalitik bölgesi.....	22
Şekil 1.9. hCA II izoenzimi tarafından CO <sub>2</sub> 'in hidrasyon mekanizması.....	23
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	41
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	44
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu$ g/ml) oktopaminin ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	48
Şekil 4.2. Oktopamin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu$ g/ml) kuprik iyonlarını (Cu <sup>2+</sup> ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	49
Şekil 4.3. Oktopaminin (10-30 $\mu$ g/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması .....	51
Şekil 4.4. Oktopamin, $\alpha$ -tokoferol ve troloksun 30 $\mu$ g/ml konsantrasyonunda süperoksit anyon radikalleri giderme aktivite yüzdeleri.....	51
Şekil 4.5. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği.....	52

<b>Şekil 4.6.</b> Oktopaminin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	53
<b>Şekil 4.7.</b> ABTS'nin açık kimyasal yapısı.....	54
<b>Şekil 4.8.</b> ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS <sup>+</sup> için hazırlanan standart grafik.....	54
<b>Şekil 4.9.</b> Farklı konsantrasyonlardaki oktopaminin (10-30 µg/ml) ABTS <sup>+</sup> giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	55
<b>Şekil 4.10.</b> DMPD <sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....	56
<b>Şekil 4.11.</b> Oktopamin DMPD <sup>+</sup> giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırması.....	57
<b>Şekil 4.12.</b> Farklı konsantrasyonlardaki oktopaminin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	58
<b>Şekil 4.13.</b> Oktopaminin (20 µg/ml) bipiridil metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA BHT α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	59
<b>Şekil 4.14.</b> Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	60
<b>Şekil 4.15.</b> İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH <sub>3</sub> COO/0,5 M NaClO <sub>4</sub> pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan absorban grafikleri .....	61
<b>Şekil 4.16.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	63
<b>Şekil 4.17.</b> İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	63
<b>Şekil 4.18.</b> Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı .....	64

<b>Şekil 4.19.</b> hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan oktopamin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Oktopamin] grafiği.....	65
<b>Şekil 4.20.</b> hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan oktopamin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Oktopamin] grafiği .....	66
<b>Şekil 5.1.</b> Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu.....	69
<b>Şekil 5.2.</b> FRAP metoduna göre ferrik iyonlarının ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgenme reaksiyonu.....	70
<b>Şekil 5.3.</b> Bir antioksidan $[(AH)_n]$ tarafından DPPH serbest radikallerinin giderilmesi.....	71
<b>Şekil 5.4.</b> Bir rezveratrol molekülünün DPPH $\cdot$ serbest radikalini söndürmesi ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluşumu.....	72
<b>Şekil 5.5.</b> Bir kurkumin molekülünün DPPH $\cdot$ radikalini gidermesi.....	72
<b>Şekil 5.6.</b> Eugenol molekülünün DPPH $\cdot$ serbest radikalini gidermesi ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu.....	73
<b>Şekil 5.7.</b> Oktopaminin muhtemel DPPH $\cdot$ serbest radikalini giderme mekanizması.....	74
<b>Şekil 5.8.</b> $K_2S_2O_8$ ile ABTS'nin yükseltgenmesi ve ABTS $^{+}$ 'nin kimyasal yapısı.....	74
<b>Şekil 5.9.</b> Kararlı bir radikal olan DMPD $^{+}$ 'nin oluşum ve giderilme mekanizması.....	75
<b>Şekil 5.10.</b> NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT $^{2+}$ 'yi formazana yükseltgemesi.....	77
<b>Şekil 5.11.</b> Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT $^{2+}$ 'yi formazana yükseltgemesi.....	78
<b>Şekil 5.12.</b> L-Karnitin ile $Fe^{2+}$ arasında öne sürülen metal şelatlama mekanizması.....	80
<b>Şekil 5.13.</b> L-Adrenalinin bir $Fe^{2+}$ ile bağlanarak L-Adrenalin- $Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması.....	81

<b>Şekil 5.14.</b> Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile bağlanarak kurkumin- $Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması.....	82
<b>Şekil 5.15.</b> İki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile bağlanarak Rezveratrol- $Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması.....	82
<b>Şekil 5.16.</b> Rozmarinik asitin ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile oluşturduğu muhtemel kompleks.....	83
<b>Şekil 5.17.</b> Sirinjik asit ve ferulik asitin ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile bağlanarak kompleks oluşturmaları.....	83
<b>Şekil 5.18.</b> Bir flavonoit molekülünün metal iyonlarını iyonları ( $Men^+$ ) ile bağlanarak kompleks oluşturması.....	84
<b>Şekil 5.19.</b> Bir oktopamin molekülünün bir demir iyonunu ( $Fe^{2+}$ ) muhtemel bağlama mekanizması.....	85
<b>Şekil 5.20.</b> Benzoik asit ve sinamik asidin formülü.....	86

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve serbest olmayan radikaller.....	2
<b>Çizelge 1.2.</b> Endojen ve ekzojen kaynaklı bazı serbest radikaller.....	3
<b>Çizelge 1.3.</b> Bazı endojen ve ekzojen antioksidan kaynaklar.....	8
<b>Çizelge 1.4.</b> Sentetik ve doğal antioksidanların özellikleri.....	13
<b>Çizelge 1.5.</b> Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması.....	15
<b>Çizelge 3.1.</b> Esteraz aktivitesi için 3 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	44
<b>Çizelge 3.2.</b> Esteraz aktivitesi için 1 ml'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	45
<b>Çizelge 4.1.</b> 20 µg/ml konsantrasyonunda oktopamin ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik (Cu <sup>2+</sup> ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları.....	50
<b>Çizelge 4.2.</b> Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	62
<b>Çizelge 5.1.</b> Çalışmada kullanılan oktopaminin 20 µg/ml konsantrasyonunda ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik iyonlarını (Cu <sup>2+</sup> ) ve FRAP metoduna göre indirgeme kapasiteleri.....	70

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Serbest Radikaller ve Etkileri

Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan elektronca yoğun bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron yer almaktadır. Bir atom veya molekül, dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduruyorsa serbest radikal olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Halliwell and Gutteridge 1990).

Bir atomdan diğerine elektronların transfer edilmesine oksidasyon denir. Oksidasyon metabolizmanın ve aerobik yaşamın zorunlu bir parçasını temsil eder. Çünkü oksijen ATP formunda enerji üreten elektron transport zincirinde (ETS) son elektron alıcısıdır (Davies 1995). Elektron akışı esnasında, ortaklanmamış elektronlar oluşur. Bu elektronlar ise serbest radikaller oluşturarak, organizmada çeşitli hasarlara yol açarlar (Gülçin 2012).

Oksijen merkezli serbest radikal örnekleri; süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $HO^{\cdot}$ ), peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ), alkolsil ( $RO^{\cdot}$ ) ve nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ) dahil, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir. Hidroksil (yarılanma süresi  $10^{-9}$  saniyedir) ve alkolsil (yarılanma süresi saniyelerdir) serbest radikalleri çok reaktiftir ve komşu hücrelerde bulunan moleküllere hızlı bir şekilde saldırırlar. Sebep oldukları hasarlar kaçınılmazdır. Diğer taraftan süperoksit anyon, lipit hidroperoksitler ve nitrik oksitler nispeten daha az reaktiftirler (Ames *et al.* 1993; Gülçin 2012). Canlı organizmalarda ROS'e ek olarak singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hipoklorik asit (HOCl) gibi radikal olmayan diğer ROS'leri de vardır (Pietta 2000; Gülçin 2012). Aşağıdaki tabloda bazı serbest radikal türleri ve kısaca tanımları verilmiştir.



**Çizelge 1.1.** Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve serbest olmayan radikaller (Gülçin 2012).

Reaktif oksijen türleri		Serbest olmayan radikaller	
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil radikali	$HO\cdot$	Singlet oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil radikali	$HOO\cdot$	Ozon	$O_3$
Lipit radikali	$L\cdot$	Lipit hidroperoksit	$LOOH$
Lipit peroksil radikali	$LOO\cdot$	Hipoklorit	$HOCl$
Peroksil radikali	$ROO\cdot$	Peroksi nitrit	$ONOO^-$
Lipit alkoksil radikali	$LO\cdot$	Diazot trioksit	$N_2O_3$
Azot dioksit radikali	$NO_2\cdot$	Nitrik asit	$HNO_3$
Nitrik oksit radikali	$NO\cdot$	Nitril klorit	$NO_2Cl$
Nitroksil katyon	$NO^+$	Nitroksil anyon	$NO^-$
Protein radikal	$P\cdot$	Nitrik oksit	$N_2O$

Serbest radikaller oldukça kararsız moleküllerdir. Biyomolekülleri oksitleme kapasitesine sahip olan ROS ya en az bir tane ortaklanmamış elektron çifti içerirler, ya da radikal olmayan reaktif bileşiklerdir. Bundan dolayı bu türler oksidan veya pro-oksidan olarak da isimlendirilir (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1991; Gülçin 2012).

ROS normal fizyolojik olaylar esnasında sürekli oluşurlar. Dolayısıyla lipit peroksitlerinin birikimine yol açarak membran lipitlerinin peroksidasyonunu kolaylıkla başlatabilirler (Elmastaş *et al.* 2006; Gülçin 2010). Fizyolojik konsantrasyonlardaki ROS normal hücre fonksiyonları için gerekebilir. Nükleik asitler, lipitler, proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi önemli biyomoleküllere zarar verme kapasitelerine sahiptirler. Ayrıca mutasyona ve DNA hasarına da yol açabilirler. Eğer ROS hücrenel bileşenler tarafından giderilemezlerse protein, lipit ve nükleik asit gibi hücrenel biyomoleküllere zarar verdikten sonra radikal zincir reaksiyonlarını uyararak ciddi metabolik hasarlara da yol açarlar. Bunlar arasında kalp

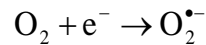
krizi, ateroskleroz, diyabet, kanser ve yaşlanma gibi birçok hastalık sıralanabilir (Tanizawa *et al.* 1992; Duh 1998; Alho and Leinonen 1999; Gülçin 2012).

Canlı organizmalarda ROS farklı yollarla oluşabilir. Ekzojen kaynaklar arasında sigara dumanı, çevresel kirleticiler, organik çözücüler ve pestisitler sayılabilir. Endojen kaynaklar arasında ise peroksizomlar, en önemli ROS kaynağı olarak verilebilir. Serbest radikal ve reaktif türlerinin endojen ve ekzojen kaynakları Çizelge 1.2’de verilmiştir (Annakkaya 2012).

**Çizelge 1.2.** Endojen ve ekzojen kaynaklı bazı serbest radikaller

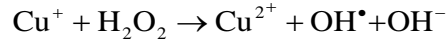
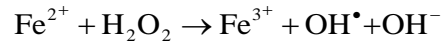
<b>Endojen Kaynaklar</b>	<b>Ekzojen Kaynaklar</b>
Mitokondrial ETS	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Oksidatif reaksiyonlar	Zararlı ışınlar
Otooksidasyon reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit metabolizması	Organik çözücüler
Bazı enzimler	Pestisitler

İnsan metabolizmasında spesifik ROS için çeşitli kaynaklar vardır. Ancak  $O_2^{\bullet -}$  önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Çünkü diğer reaktif türler  $O_2^{\bullet -}$  ile başlayarak sonraki reaksiyonlarda oluşturulur. Kullandığımız  $O_2$ ’nin %1-3 civarında  $O_2^{\bullet -}$ ’ye dönüştüğü tahmin edilmektedir (Fridovich 1986; Gülçin 2012). Süperoksit radikali, hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda en çok ve en kolay oluşan serbest oksijen radikalidir (Halliwell 1989). Bu radikal nadiren oksidatif hasara yol açar. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi ile hızlı bir şekilde  $H_2O_2$ ’ye çevrilmektedir (Cadenas and Packer 1996).

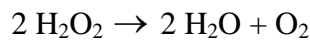


Hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ), hidroksit iyonunun ( $\text{OH}^-$ ) radikalik formudur. Bu radikal  $10^{-9}$  saniyelik yarılanma süresi ile bilinen en reaktif türdür. *In vivo* olarak metal-kataliz proseslerinde endojen kaynaklı  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten veya metabolizmadaki suyun yüksek enerjili radyasyon ışınları tarafından hemolitik parçalanması sonucu oluşur. UV ışınının suyu ayrıştırması zordur. Fakat  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i iki hidroksil radikaline ( $\text{OH}^\cdot$ ) çevirebilir. Bu radikaller yüksek reaktiviteye sahiptir (Gülçin 2012).

Oksijenin iki elektronla indirgenmesiyle oluşturulan  $\text{H}_2\text{O}_2$  serbest bir radikal değildir. Fakat bir oksitleyici ajandır. Oksijenin varlığında ve metal iyonların geçişinde  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten Fenton reaksiyonuyla  $\text{OH}^\cdot$  radikali üretebilir. Fenton reaksiyonları  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^+$  gibi geçiş metalleri ve  $\text{O}_2$  varlığında gerçekleşir.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten hidroksil radikali ( $\text{OH}^\cdot$ ) üretilir (Halliwell ve Gutteridge 1989).



Oksidatif metabolizmanın bir ürünü olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  organizmada doğal olarak üretilir ve aynı zamanda canlı hücreler arasında kolay yayılabilen radikal olmayan reaktif bir türdür. Katalaz enzimi hidrojen peroksidi suya dönüştürerek zararlı etkilerini giderir (Gülçin 2012).



Nitrik oksit, memelilerde birçok patolojik ve fizyolojik proseslerde önemli bir sinyal molekülüdür (Hou *et al.* 1999). Nitrik oksitin aşırısı sitotoksiktir. Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) formu ise  $\text{O}_2^\cdot$  ile birleşerek oluşur ve biyomoleküllerle doğrudan etkileşebilir. Peroksinitrit, lipoproteinlerde lipit peroksidasyonunu indüklemeye kapasitesine sahiptir, fakat proteinlerde tirozin rezidülerini nitratlayarak hücrel sinyallere de müdahale edebilirler (Beckman 1996; Packer 1996; Gülçin 2012).

Peroksil radikali (ROO<sup>•</sup>) biyolojik sistemlerde difüzyon yol uzunluğu ile ömürleri orantılıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden bir H atomu çıkararak başlatılan lipit peroksidasyon yoluyla üretilebilir. Hidroksil radikali bu reaksiyon dizisini başlatma kapasitesine sahiptir (Esterbauer *et al.* 1992; Reaven and Witztum 1996; Gülçin 2012).

Alkolsil radikaller (RO<sup>•</sup>) ve organik hidroperoksitler (ROOH) lipit peroksidasyonunda üretilen diğer radikal ürünlerdir. Proteinlerin amino grupları ile aldehitlerin reaksiyonları, lipoproteinlerin protein kısımlarının modifikasyonunu içeren bir mekanizma olarak tartışılmaktadır (Diplock *et al.* 1998).

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji olarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir bileşiktir (İşbilir 2008). Singlet oksijen normal triplet oksijenden daha az kararlıdır ve moleküller oksijenin (O<sub>2</sub>) diamagnetik formları için kullanılan yaygın ismidir. Singlet oksijenin canlı organizmasında ışığa maruz kalan dokularda oluşumu istenilmeyen diğer bir radikal olmayan ROS türüdür. Yarılanma süresi matriks etrafındaki yapısına bağlı olarak 10<sup>-6</sup> saniye olduğu tahmin edilmektedir. Singlet oksijen, uyarma enerjisini transfer ederek veya kimyasal olarak bağlanarak diğer moleküller ile etkileşebilir. Kimyasal reaksiyonlar için öncelikli hedefler çift bağlardır (Stahl and Sies 1993; Gülçin 2012).

## 1.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, radikalik zincir reaksiyonlarının yayılmasını veya başlamasını önleyerek diğer moleküllerin oksidasyonlarını geciktiren veya durduran bileşikler olarak tanımlanır (Velioğlu *et al.* 1998). Antioksidanlar insan vücudunu serbest radikallere ve ROS'ne karşı korur (Lai *et al.* 2001; Gülçin *et al.* 2004b; 2006). Ayrıca antioksidanlar,

besinlerin oksidatif bozulmalarına karşı koruma sağlayan maddeler olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar (Gülçin *et al.* 2005b; 2004e).

Normal bir hücrede uygun bir pro-oksidan ve antioksidan dengesi vardır. Ancak bu denge esnasında antioksidanların seviyesi azaldığında ya da oksijen türlerinin üretimi arttığında denge pro-oksidanlar lehine değişir. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (Gülçin 2012).

Oksidatif stres; yapısı değişmiş antioksidan enzimler veya toksinler tarafından antioksidan bileşenlerin konsantrasyonu azaltılarak oluşur veya kronik enflamasyon sonucunda aktifleşen fagositlerin sebep olduğu oksijen, azot veya karbon temelli reaktif türlerin hasarı sonucu meydana gelir (Somogyi *et al.* 2007; Gülçin 2012).

Antioksidanlar başlıca dört yolla etkilerini gösterirler (Gökpınar *et al.* 2006);

1. Giderme (scavenging) etkisi: Oksidanlar nispeten daha zayıf bir moleküle dönüştürerek, karşısındaki reaktif molekülü etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme (quenching) etkisi: Antioksidanlar oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive ederler. Vitaminler ve flavanoitler bu şekilde etki eder.
3. Zincir kırma (chain breaking) etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma (repair) etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar.

Oksijenli solunum yapan organizmalarda, hasar görmüş molekülleri onarma veya uzaklaştırmak için antioksidan enzim ve bileşenleri içeren antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Hücreler, antioksidan enzimlerin etkileşim ağı tarafından oksidatif strese karşı korunurlar (Davies 1995; Gülçin 2012).

Antioksidan bileşikler besinleri depolama ve işleme esnasında bozulmalarına yol açan ana sebeplerden biri olan lipid peroksidasyonu işlemini geciktirirler, raf ömrünü artırırlar ve serbest radikalleri giderirler (Halliwell 1997). Öte yandan antioksidanlar birçok kronik hastalıkların ilerlemesini de geciktirirler. Son yıllarda özellikle doğal ve güvenilir bir kaynak olan bitki kökenli antioksidanlar üzerindeki çalışmalar bir hayli ilgi görmüştür. Antioksidanlar, radikal zincir reaksiyonlarını önlemek için gıdalara ilave edilir ve neticede oksidasyon işlemini geciktirerek reaksiyonun bitmesine yol açan basamakları başlatma veya ilerleme basamağını inhibe ederek önemli bir görev yüklenirler (Shahidi *et al.* 1992; Gülçin 2006a).

Gıda bileşenlerin antioksidan özelliklerini belirlerken antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite gibi farklı terimler sık sık birbirinin yerine kullanılır. Ancak bu terimler aynı anlama gelmemektedir. Aktivite; bir spesifik antioksidan ve bir spesifik oksidan arasındaki bir reaksiyonun sabit oranından bahseder. Kapasite; bir örnekte verilen serbest radikal giderme (1 mol) miktarının bir ölçüsüdür (MacDonald-Wicks *et al.* 2006; Gülçin 2012).

Meyve ve sebzelerin tüketimi, en tehlikeli bilinen kronik ateroskleroz gibi bazı kronik hastalıkların riskini azalttığı bilinmektedir (Rimm *et al.* 1996a; 1996b). Epidemiyolojik çalışmalarda meyve ve sebzelerin tüketimi ile kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi yaşla orantılı olan hastalıklar arasında ters bir orantı olduğu gözlemlenmiştir (Eberhardt *et al.* 2000; Ganesan *et al.* 2011; Gülçin 2012).

Aerobik canlılarda antioksidan savunma sistemleri, metabolizmada üretilen ve dışarıdan diyetle alınan antioksidan savunma sistemleri olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Gülçin 2007).

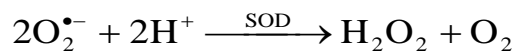
**Çizelge 1.3.** Bazı endojen ve ekzojen antioksidan kaynaklar

<b>Antioksidanlar</b>			
<b>Endojen antioksidanlar</b>		<b>Ekzojen antioksidanlar</b>	
<b>Enzimler</b>	<b>Küçük moleküller</b>	<b>Sentetik</b>	<b>Doğal</b>
Katalaz	Glutasyon	BHA	Tokoferoller
Peroksidaz	Melatonin	BHT	Karotenler
Süperoksit dismutaz	Serotonin	TBHQ	Fenoller
Glutasyon peroksidaz	Adrenalin	Propilgallat	Flavonitler
Glutasyon redüktaz	Noradrenalin	Troloks	C vitamini

### 1.2.1. Endojen antioksidanlar

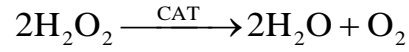
Peroksidaz enzimi, hidrojen atomlarını verme eğiliminde olan bileşikler ile bu atomların alıcısı olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bileşiği arasındaki reaksiyonu katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Whitaker 1994). Peroksizomlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı başka bir substrat ihtiyacı duymayan katalaz enzimi tarafından düzenlenirken, hücrenin diğer kompartmanlarında aktivitesini göstermek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ten başka substratlara ihtiyaç duyan farklı peroksidaz enzimleri tarafından düzenlenir (Scandalus *et al.* 1994).

Süperoksit dismutaz (SOD), canlı organizmada üretilen serbest radikallere karşı oluşan ilk savunma enzimidir. Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijen metabolizması gerçekleştiren hücrelerde, hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korurlar. SOD, süperoksidin daha az zararlı reaktif oksijen türü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e dönüşümünü sağlar (Halliwell 1994; Akkuş 1995).

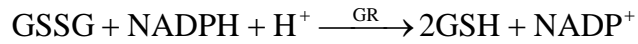
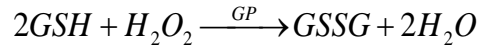


Hem gurubu içeren bir protein olan katalaz, peroksizomlarda lokalize olup, dört alt birimden oluşur. Genelde bütün hücre türlerinde bulunur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in parçalanmasını

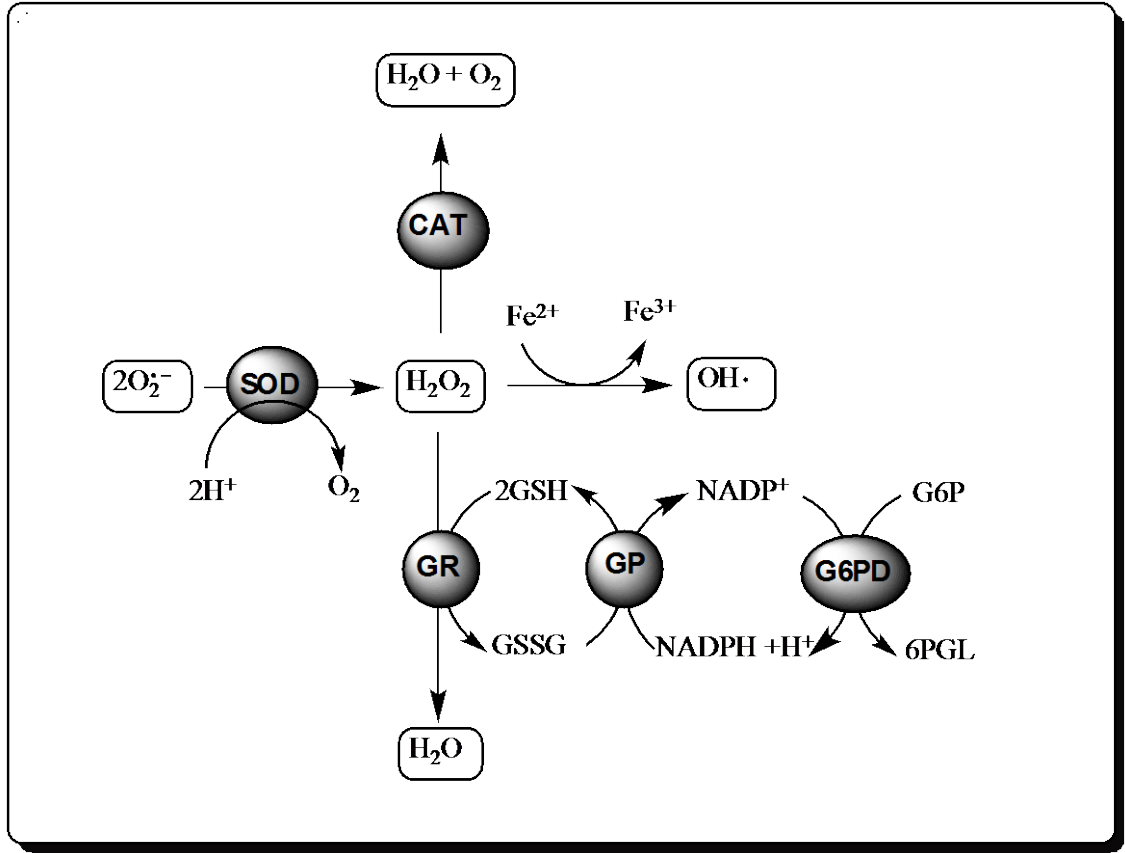
sağlar. Eğer  $H_2O_2$  oluşum hızı yüksekse, katalaz indirgeyici aktivite gösterir.  $H_2O_2$ 'in oluşum hızı düşükse, katalaz elektron vericisi olduğu durumlarda peroksidatif aktivite gösterir (Murray *et al.* 1996 ; Onat *et al.* 2002).



Glutasyon peroksidaz (GP), hücrede bulunan  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunu sağlar. Bu enzim lipid peroksidasyonun başlamasını ve ilerlemesini engellemektedir. Sitozolde bulunur. Reaksiyon sonucu oksitlenmiş glutasyon GSSG oluşur. Antioksidan savunma sisteminin devam edebilmesi için oksitlenmiş glutasyon (GSSG) tekrar indirgenmiş formuna (G-SH) dönüşmesi gerekir. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir (Seven ve Candan 1996). Glutasyon redüktaz (GR); dimerik yapıda sitozolde ve mitokondride bulunan bir enzimdir. Prostetik grubunda flavin adenin dinükleotit (FAD) bulunur. NADPH varlığında oksitlenmiş glutasyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler.







**Şekil 1.1.** Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizması.

\*(SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, GR: Glutasyon redüktaz, GP: Glutasyon peroksidaz, G6PD: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, G6P: Glukoz 6-fosfat, 6PGL: 6-Fosfoglukano- $\gamma$ -lakton)

Glutasyon (GSH), organizmanın tüm hücrelerinde glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir. Aminoasitlerin hücre içine taşınması gibi farklı metabolik fonksiyonlara sahiptir. Suda iyi çözünebilen önemli bir hücre içi antioksidandır. Glutasyon proteinlerdeki tiyol gruplarını (-SH) indirger halde tutar ve onları oksidasyona karşı korur (Onat *et al.* 2002).

Melatonin,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{NO}\cdot$  ve  $\cdot\text{ONOO}^-$  gibi serbest radikalleri giderdiği bilinmektedir. Hem suda hem de lipitlerle çözünebildiğinden, geniş bir alanda antioksidan aktivite gösteren güçlü bir antioksidandır. Melatonin seviyesi yaşlanma ile birlikte de azaldığı için yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğuna inanılmaktadır (Yazıcı ve Köse 2004).

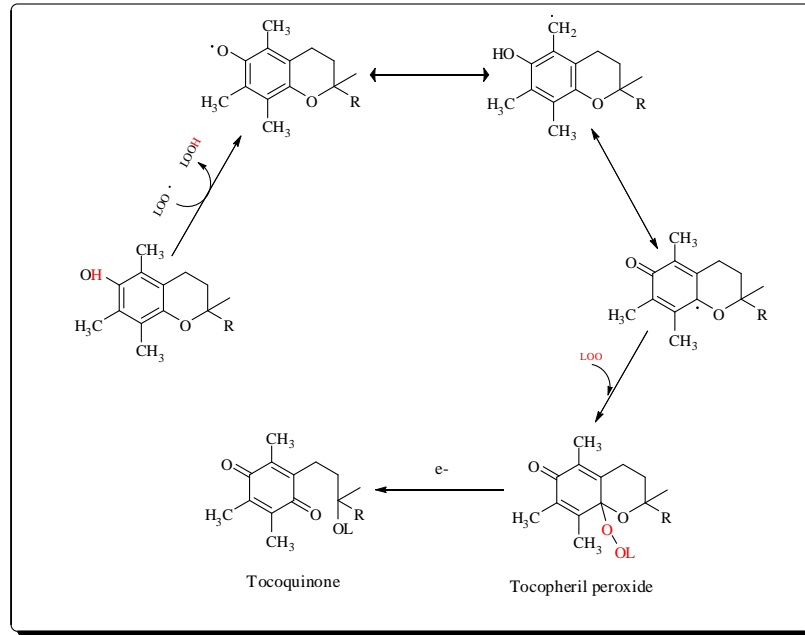
### 1.2.2. Ekzojen antioksidanlar

Antioksidanlar, gıdalara zarar veren radikal zincir reaksiyonlarını önlemek amacıyla gıdalara eklenmektedir (Gülçin *et al.* 2004e; Gülçin *et al.* 2007a). Son zamanlarda en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlar BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi fenolik bileşiklerdir. Farmakolojik uygulamalar ve besinler için kullanılan en önemli sentetik antioksidanlardır.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>BHA</b>	-H	-OH	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OCH <sub>3</sub>
<b>BHT</b>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>
<b>PG</b>	-OH	-OH	-OH	-COOC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
<b>TBHQ</b>	-H	-OH	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH

**Şekil 1.2.** BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanların açık yapıları

Genelde yüksek konsantrasyonlarda E vitamini içeren besinler, granüller, tohumlar, kabuklu yemişler ve sebze yağlarıdır. Bu grubun en önemli antioksidanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Diğer tokoferollere göre antioksidan aktivitesi daha düşüktür. Yağda çözünebilir bir antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol, lipid peroksidasyonunu azaltır. Ayrıca radikalik zincir reaksiyonlarını kırar ve hücre membranını oksidasyondan korur.  $\alpha$ -Tokoferol, Avrupa kıtasındaki diyetle çok kullanılırken,  $\gamma$ -tokoferol Amerika kıtasındaki diyetle daha çok kullanılır (Gülçin 2012).



**Şekil 1.3.**  $\alpha$ -Tokoferolün radikal giderme mekanizması

Sentetik antioksidanlar yağ ve yağ asitlerinde kendi çözünürlüklerini artırmak amacıyla alkoller tarafından daima yer değiştirirler (Hudson 1990). Bununla birlikte BHA ve BHT toksik etkileri sebebiyle bir çok ülkede yasal olarak kullanımları sınırlandırılmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Ayrıca BHT düşük konsantrasyonlarda mutajenite üzerinde düşük etkiye sahiptir ancak yüksek konsantrasyonlarda mutajeniteleri önemli ölçüde artmaktadır (Shahidi and Wanasundara 1992). Bu sebeplerden dolayı antioksidanların doğal kaynaklarını bulmak için yapılan çalışmalara hız verilmiştir. Ayrıca sentetik antioksidanların alternatifleri olan doğal antioksidanlara karşı tüketici tercihlerinde artan bir talep gözlemlenmiştir (Gülçin 2006b; 2007).

Bitkisel kaynaklı yağlar için en uygun antioksidan madde TBHQ'dur. BHA ve BHT sıcaklığa oldukça dayanıklıdır. TBHQ sık sık pişirilen ve kızartılan ürünlerde yağların dengelenmesi için kullanılır. PG gibi gallatların dezavantajları sıcaklığa karşı hassasiyetleri ve demir iyonları ile etkileşimleridir. BHA ve BHT gibi bazı antioksidanlar sinerjik etkileri sonucu kombine edilerek de kullanılır (Sherwin 1972; Omura 1995). Ayrıca BHA, PG ile kullanıldığında de sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (Gülçin 2012).

Bu sonuçlar gösteriyor ki doğal kaynaklı antioksidanlar, sentetik antioksidanlardan daha güvenilir ve sağlık açısından daha faydalıdır. Doğal antioksidanlar 1980'den beri sentetik antioksidanlara bir alternatif olarak görülmektedir (Gülçin 2012).

Gıdaların korumalarında yaygın bir şekilde kullanılan doğal ve sentetik antioksidanların avantaj ve dezavantajları aşağıdaki tabloda sıralanmıştır (Gülçin 2012).

**Çizelge 1.4.** Sentetik ve doğal antioksidanların özellikleri

<b>Sentetik antioksidanlar</b>	<b>Doğal antioksidanlar</b>
Ucuzdurlar	Pahalıdırlar
Uygulama alanı geniştir	Bazı ürünlerin kullanımlarında sınırlandırılmıştır
Suda çözünürlükleri düşüktürler	Çözünebilirlik alanları geniştir
İlgi azalmaktadır	İlgi artmaktadır
Bazıları adipoz dokuda depolanmıştır	Tamamıyla metabolize olurlar
Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır	Talep ve kullanımları artmaktadır
Yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler	Antioksidan aktiviteleri orta seviyededir
Güvenlikle ilgili endişeler artmaktadır	Zararsız maddeler olarak bilinir

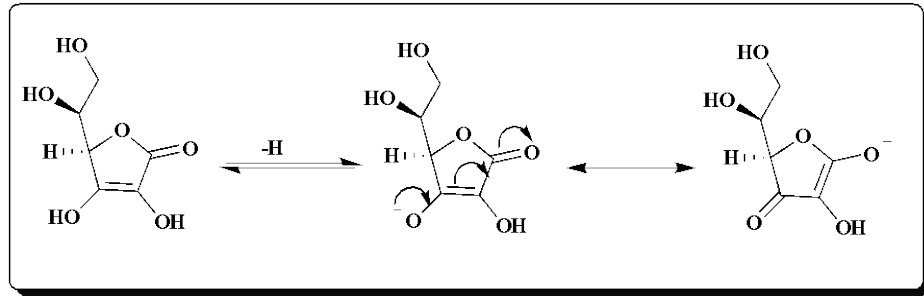
İnsan diyetindeki antioksidan aktivitesine sahip olan farklı bileşikler ROS giderici etkiye sahiptirler. Diyetle alınan antioksidanların en çok bilinen temsilcileri; C vitamini, tokoferoller, karotenoitler ve flavonoitlerdir. C vitamininin dışındaki antioksidanların her bir grubu yapısal olarak farklı bileşiklerin bir dizisinden ibarettir. Örneğin; 600'den fazla karotenoit olduğu bilinmektedir ve bunların 50 tanesi insan diyetinde vardır (Gülçin 2012).

Doğal antioksidanlar en çok yeşil sebzelerde (Gülçin *et al.* 2004b; Gülçin 2007), tohumlarda (Gülçin 2005b; 2007), baklagiller ve meyvelerde, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve bazı B vitamini içeren besinlerde bulunur (Gülçin *et al.* 2005a). Ayrıca sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde ve köklerde bol miktarda bulunmaktadır (Pratt *et al.* 1990; Gülçin 2003, 2007).

Yapılan çalışmalarda, sebze ve meyve bakımından zengin bir beslenmenin hastalıklara yakalanma, kalp-damar hastalıkları, bazı kanser türleri, diyabet, alzheimer hastalığı ve katarakt riskini önemli derecede azalttığını göstermiştir (Gülçin 2012).

Doğal antioksidanlar antibakteriyal, antiviral, inflamatuvar, antialerjik ve antitrombotik aktiviteleri içeren biyolojik etkilerin yaygın bir dizisini sergilemekle bilinirler. Aslında yaşam için en önemli özellik antioksidan kapasitesidir ve bu özellik yaşlanmaya karşı antikanserojenik, antimutajenik aktiviteye yol açar (Cook and Samman 1996).

Askorbik asit (C vitamini) suda çözünebilir bir vitamindir. Bitkilerde ve diyetle alınan besinlerin çoğunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur.



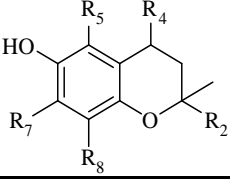
**Şekil 1.4.** C vitamininin kimyasal yapısı ve enolat formu

Askorbik asit tipik olarak oksidanlar ile etkileşir. Ayrıca elektron transferiyle radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırabilir. Bir tek elektron transfer ederek etkili bir redüksiyon gerçekleştirebilir. Bir konjuge sistem formunda bulunan çift bağlı karbonil grubu ve bir çift hidroksil grubu bulunduran çift bağlardaki gruplar bir karboksilik asit vinil türevi gibi davranır. Çünkü deprotonize edilmiş konjuge bazlar iki önemli rezonans yapı kararlılığının olduğu askorbik asitteki hidroksil grubu normal hidroksil gruplarından daha çok asidiktir. Başka bir deyişle askorbik asitin deprotonize edilmiş formu stabil olmuş enolat gibi düşünülebilir (Gülçin 2012).

Aynı zamanda insan plazması 60  $\mu\text{mol}$  civarında askorbat içerir. ROS ile etkileşim olduğunda, askorbil serbest radikal araçları ile dehidroaskorbata dönüşür. Dehidroaskorbat, askorbat ile karşılaştırıldığında çok düşük seviyelerde bulunur. ROS'ni giderme etkisine sahip olan askorbik asit süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikal ve singlet oksijene karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Sulu çözeltilerde askorbik asit etkin bir şekilde azot oksit türlerini de yok edebilir. Diyetteki askorbik asidin ana kaynakları özellikle narenciye meyvesi, kivi, kiraz, kavun gibi meyveler ve domates, brokoli, karnabahar, brüksel lahanası ve lahana gibi sebzelerdir (Gülçin 2012).

Tokoferoller (E vitamini), birçok E vitamini aktivitesine sahip olan kimyasal bileşiklerin bir sınıfıdır. Tokoferol ve tokotrienol olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bu iki grup, dört izomere ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ) sahiptir ve toplamda sekiz tane tokoferol izomeri vardır (Gülçin 2012). Tokoferol türlerinin antioksidan aktiviteleri arasında farklar vardır ve singlet oksijeni giderme kapasitesi  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  tokoferole doğru gittikçe azalır (Han 2012).

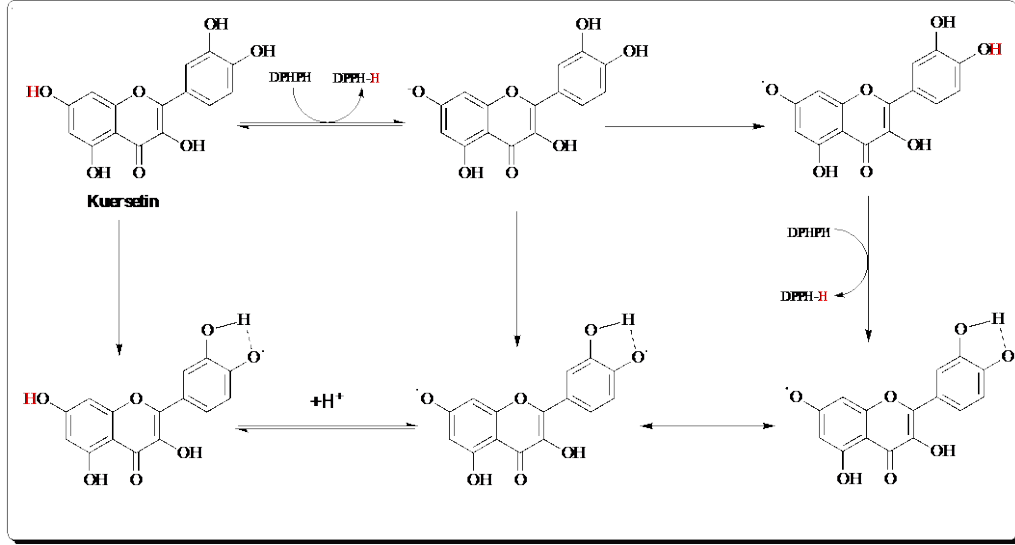
**Çizelge 1.5.** Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması (Gülçin and Beydemir 2013)

				
<b>Tokoferoller</b>				
	$R_2 = \left\{ \text{---} \right\}$			
	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>
<b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b><math>\beta</math>-Tokoferol</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b><math>\gamma</math>-Tokoferol</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b><math>\delta</math>-Tokoferol</b>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<b>Tokotrienoller</b>				
	$R_2 = \left\{ \text{---} \right\}$			
	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>	<b>R<sub>8</sub></b>
<b><math>\alpha</math>-Tokotrienol</b>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b><math>\beta</math>-Tokotrienol</b>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<b><math>\gamma</math>-Tokotrienol</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<b><math>\delta</math>-Tokotrienol</b>	H	H	H	CH <sub>3</sub>

Tokoferoller lipit peroksil radikallerine hidroksil gruplarının hidrojenini vererek antioksidan olarak rol oynarlar. Bir tokoferolden bir radikal oluşumu aromatik halka yapısı üzerinden tek elektronun delokalizasyonundan stabil edilirler. Bileşiklerin bu grubu yüksek lipofiliktir ve lipoproteinler ile membranlarda etkindir (Diplock *et al.* 1998). Bu grubun en önemli antioksidanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Aynı zamanda  $\alpha$ -tokoferol yağda çözünen bir antioksidandır.  $\alpha$ -Tokoferol membranları oksidasyondan korur. Hücre organellerinde ve hücrelerin dış membranlarındaki yağlarda çözünebilir.  $\alpha$ -Tokoferol, Parkinson hastalığına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Tokoferollerin eksikliğinde nörolojik hastalıklar gözlenmiştir (Gülçin 2012).

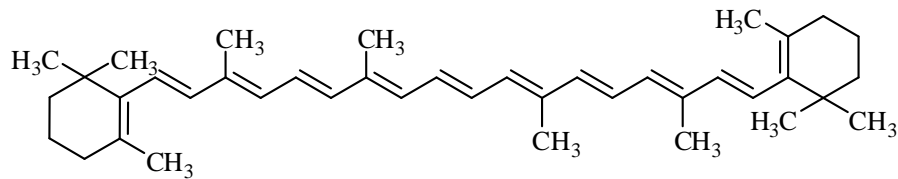
Fenolik bileşikler, segonder bitki metabolitleridir ve doğal olarak bitki kökenli besinsel yiyecekler dahil tüm bitki materyallerinde bulunur. Bu bileşikler hem insan ve hem de hayvan diyetlerinin tamamlayıcısıdır (Gülçin 2006b). Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli grubudur (Gray 1978; Moure *et al.* 2001). Bu maddeler meyve, sebze, baharat ve tahıl gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Katiyar and Mukhtar 1997; Gülçin 2007) ve keskin acı tatları vardır (Gutierrez *et al.* 1989).

Flavonoitler, bitkilerin ortak bileşenleridir. 4000'den fazla flavonoit içeren 8000'den fazla polifenol çeşitli bitki türlerinde olduğu tespit edilmiştir ve sayıları gün geçtikçe artmaktadır (Gülçin 2012). Yapraklar, kökler, gövdeler, meyve ve tohumlar gibi bitkilerin değişik parçalarından izole edilmektedir. Flavonoitler, fenilalanin ve tirozin aminoasitlerinden ve malonattan oluşturulur (Harborne *et al.* 1986). Antioksidan olarak flavonoitlerin süperoksit anyon radikali, lipit peroksi radikali, hidroksil radikalleri gibi radikal temizleyici ve metal şelatörü olduğu belirlenmiştir (Gülçin 2012). Flavonoitler çok etkili antioksidanlardır ve düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı onları korurlar. Flavonoitler diyetlerimizin en önemli antioksidan bileşenleri arasındadır. Günlük alımları 100 miligramın üzerindedir (Gülçin 2012).



**Şekil 1.5.** Bir flavonoid olarak kuersetin molekülünün DPPH radikali giderme mekanizması

Karotenoitler, fotooksidatif proseslere karşı bitkileri korurlar. En etkili antioksidan çeşitlerinden biridir. Peroksil radikaller ve singlet moleküler oksijeni giderme etkisine sahiptirler (Stahl and Sies 2003). Fotosentez sırasında zararlı ışıklara karşı foto koruma, kansere karşı koruma, antioksidan etki, tümör büyümesini engelleme gibi özellikleri mevcuttur. Sebze ve meyvelere turuncu, kırmızı, sarı, yeşil renklerini veren karotenoitler, genellikle havuç, domates, greyfurt, portakal ve ıspanakta bol miktarda bulunur. Şimdiye kadar en fazla çalışma yapılan karotenoit,  $\beta$ -karotendir (Annakkaya 2012).  $\beta$ -Karoten içeriği açısından zengin olarak beslenen toplumlarda akciğer kanseri, deri kanseri ve kalp hastalığı görülme sıklığı daha azdır.  $\beta$ -Karotenin koruyucu etkisi, antioksidan özelliği ve bağışıklık sistemi güçlendirici gibi etkilerden kaynaklanmaktadır.



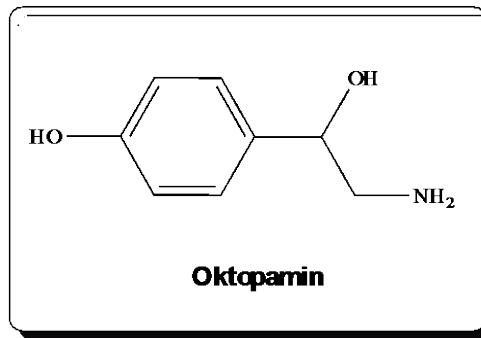
**Şekil 1.6.**  $\beta$ -Karotenin açık yapısı



Fenolik bileşikler, oksidatif hasara karşı metabolizmanın doğal direncini artırmada önemli bir etkiye sahip olan bileşiklerdir (Gülçin 2012). Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu önlemede de büyük bir rolü vardır (Gülçin 2007). Meyve ve sebze ağırlıklı diyet sayesinde koroner kalp hastalığı, felç ve kanser gibi oksidatif hasarlara karşı fenolik asitlerin koruyucu potansiyelinden dolayı fenolik asitlere olan ilgi gittikçe artmaktadır (Annakkaya 2012). Fenolik asitler de kendi içerisinde hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asitler olarak ikiye ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler bitkisel gıdalarda çok az miktarda bulunur. Bunlar salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisünamik asitler ise fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellikler gösterirler. Bunlar ise kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Fenolik asitler bitkilerde daha çok organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş haldedirler (Balasundram *et al.* 2006; Saldamlı 2007; Gülçin 2012).

### 1.3. Oktopamin

Oktopamin 1951 yılında Erspamer ve Boretti tarafından ahtapotların tükürük bezlerinden keşfettikleri bir fenolik bileşiktir. Oktopaminin IUPAC adlandırması, (RS)-4-(2-amino-1-hidroksi-etil) fenol'dur. Oktopamin,  $\beta$  pozisyonunda bir tiramine bir OH grubu eklenmesiyle tiramin  $\beta$ -hidroksilaz enzimi tarafından oluşturulur. Oktopaminin kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir (Roeder *et al.* 2003).



**Şekil 1.7.** Çalışmada kullanılan oktopaminin açık kimyasal yapısı

Oktopamin, eklem bacaklılarda kompleks davranışların açığa çıkmasında, kas hareketlerinin periferik ayarlanmasında ve merkezi sinirsel dolaşımın ayarlanmasıyla ilişkili olan biyojenik bir amindir (Sınakevitch and Strausfeld 2006). Hafıza ve öğrenmede oktopaminin muhtemel bir rolü olduğu belirlendi ve bu çalışmada öğrenme esnasında klasik koşullanmayla ilişkili olan oktopamin reseptörlerine bağlı formamidinlerle beslendikleri rapor edildi (Dudai *et al.* 1987). Biyojenik mono amin oktopamin, çeşitli omurgasız türlerde nörotransmitter, nörohormon ve nöromodülatör olarak bulunmuştur (Axelrod and Saavedra 1977). Oktopamin işçi arıların davranışsal olgunlaşmalarının en önemli biyojenik amin aracısı olarak görülmektedir (Waniger *et al.* 1999). Oktopamin bal arılarında öğrenme, hafıza, beslenme, uçma, çiftleşme gibi çeşitli fizyolojik davranışlardaki rolü önemlidir (Long *et al.* 1986; Giebultowic *et al.* 1990; Braun and Bicker 1992; Burrell and Smith 1995). Ayrıca oktopamin ateş böceklerinin lanternlerinde ışık üretimine yol açar (Livingstone *et al.* 2012). Oktopamin hücre içi siklik AMP seviyesinin artmasına yol açan spesifik reseptörler aracılığıyla hareket eden biyolojik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Oktopamin ve oktopamin reseptörlerinin önemli fizyolojik özellikleri tam açıklanmamasına rağmen oldukça iyi karakterize edilmiştir (Roeder *et al.* 2003).

Omurgalılarda nöroadrenerjik sistem, omurgasızlarda oktopaminerjik sistem tarafından fonksiyonel olarak yer değiştiği tahmin edilmektedir. Oktopaminerjik sistem başlıca omurgasızlarda mevcuttur. Çünkü onun reseptörleri omurgalılarda bulunmaz. Bu yüzden oktopamin reseptörleri spesifik böcek öldürücü ilaçlarını geliştirmek için uygun bir hedef olarak kullanılabilir (Farooqui 2007).

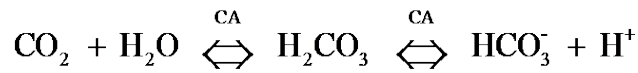
Oktopamin böceklerin sinir sistemlerinde nörohormon, nörotransmitter ve nöromodülatör olarak fonksiyon görür. Nörohormon olarak; karbonhidrat ve lipit metabolizmasını uyarır. Oktopamin, G-protein çifti reseptörlerin ailesine ait spesifik proteinleri bağlayarak etkisini gösterir. Son zamanlarda insan beyin fizyolojisinde belirli amin bağlı reseptörleri temsil eden 2 yeni G-protein çifti reseptörü memeli beyinlerinde keşfedildi. Bu reseptörler hipotalamus gibi beyin birkaç bölgesinde mevcuttur. Nörotransmitter olarak; Endokrin bezlerinin aktivitesini düzenler.

Nöromodülatör olarak; duyu organların hassasiyetinde artma, harekete geçirme, başlatma, çeşitli ritmik davranışların sürdürülmesi , hafıza ve öğrenme gibi kompleks davranışların düzenlenmesini sağlar (Farooqui 2007).

Oktopamin, parkinson hastalığıyla önemli bir ilişkisi vardır. Oktopamin, tiramin ve sinefrin gibi özel aminler tirozin metabolizmasının ürünleridir. Daha önce bu aminler düşük fizyolojik konsantrasyonlarından dolayı merkezi sinir sisteminde önemsiz düşünülüyorlardı. Şimdiki kanıtlar bu özel aminlerin insan beyin fizyolojisinde önemli bir rol oynadığını gösteriyor (Andrea *et al.* 2009). Uyarıcı özelliklerinden dolayı özel bir madde olan Oktopamin World Anti-Doping Agency (WADA) tarafından spor müsabakalarında yasaklanmıştır ve doping kontrol örneklerinde oktopaminin analitik bulguları WADA tarafından rapor edilmiştir (Thevis 2011).

#### 1.4. Karbonik anhidraz

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda bulunan ve  $Zn^{2+}$  iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz canlılarda  $HCO_3^-$ 'in dehidratasyonu ve  $CO_2$ 'in hidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



Karbonik anhidraz tükrük bezleri, böbrek, beyin, göz merceği, pankreas, uterus ve prostatta aktiviteye sahiptir. Ayrıca bu enzim yumurta kabuğu yapımında, bazı böcek ve bakterilerde, balıkların solungaç salgı organlarında ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında önemli rol oynamaktadır. Karbonik anhidraz sitoplazmada çözünmüş halde veya hücre membranına bağlı olarak bulunur (Maren 1967)

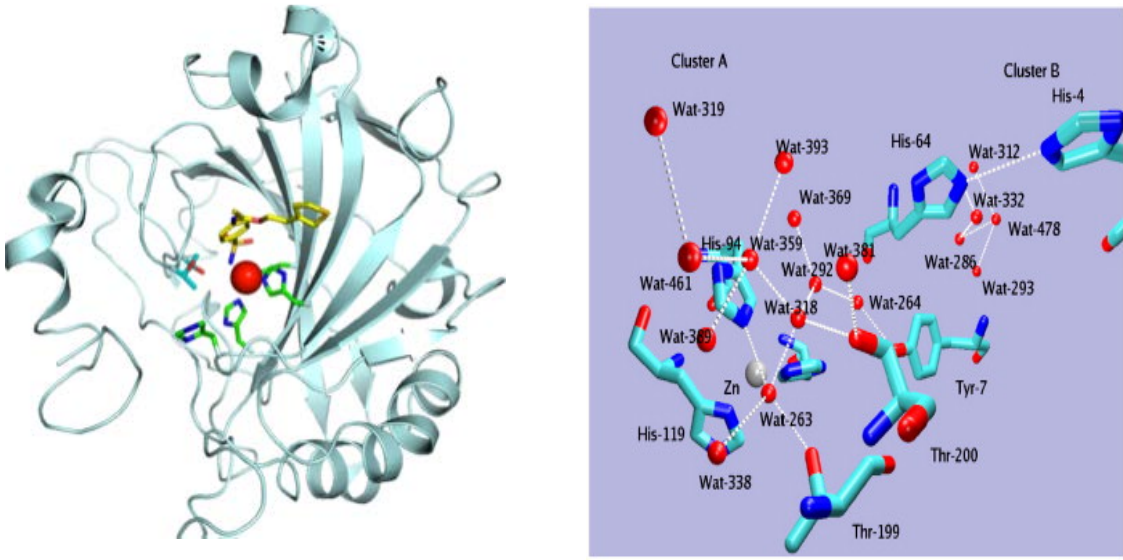
Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı olan enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlere verilecek bir örnek karbonik

anhidraz enzimidir. Karbonik anhidraz enziminin bir çok canlı türünde CO<sub>2</sub>'in hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen çok sayıda izoenzimi mevcuttur. Bugüne kadar memeli hayvanların eritrositlerinde CA I ve CA II, iskelet kasında CA III, insan böbreğinde CA IV, belirli dokuların mitokondrilerinde CA V, tükürük bezlerinde CA VI ve sitozolde CA VII bulunur (Küfrevioğlu ve Keha 2004 ).

CA I, insan eritrosit hücrelerinde en fazla bulunan ve 30 kDa moleküler ağırlığında sitoplazmik CA izoenzimlerinden biridir. Eritrositlere ilave olarak kalın bağırsak epitel, kornea epitel, göz merceğinde bulunur (Hilvo 2005).

CA II, CA ailesinin en yaygın bulunan izoenzimidir. İlk başta eritrositlerde bulunmuştur. Birçok biyolojik sıvının üretiminde yer alırken pankreatik kanaldan pankreatik sıvıya, karaciğer epitel hücrelerinden safraya ve aynı zamanda tükürük salgısına HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salınımını sağlamaktadır. Bunun dışında yağ asidi ve amino asit sentezine de katılırlar. CA II aynı zamanda bikarbonat/klorit taşıyıcılarının anyon değiştirici ailesinin üyeleriyle fonksiyonel ve fizyolojik olarak etkileşime girerek etki göstermektedir (Leppilampi 2006).

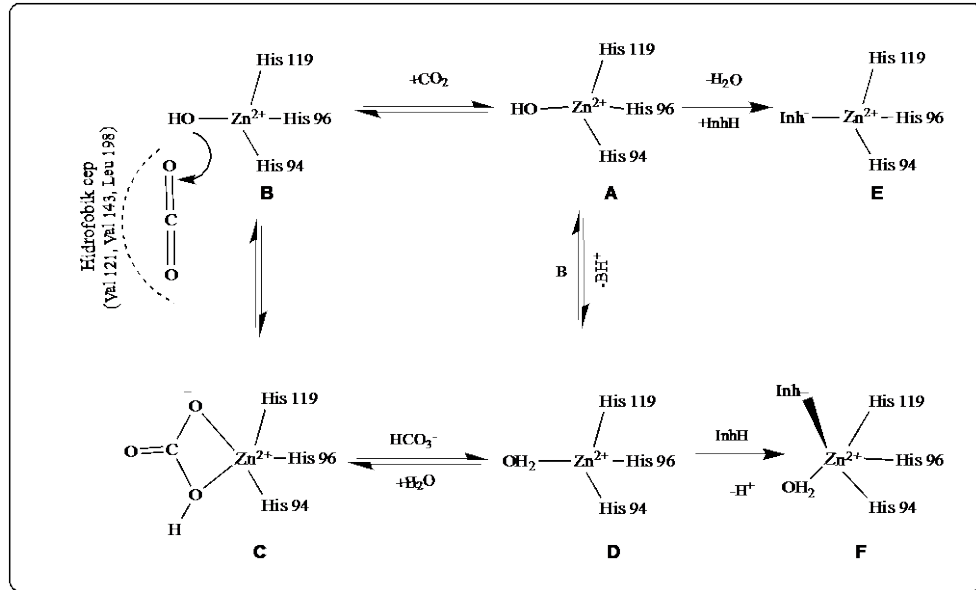
Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Zn iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik bir durumdadır. Dört ligant gibi H<sub>2</sub>O ve OH<sup>-</sup> ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomu ile koordine edilmiştir. Ligantlar protein formundaki bir indirekt ligandın H bağı ile diğer guruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Lesburg and Christianson 1995; Aslan 2013).



**Şekil.1.8.** Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli ve katalitik bölgesi

Şekil.1.8.'da görüldüğü gibi merkezde koordine edilmiş Zn atomu kırmızı küre ile gösterilmiştir. Aktif bölgede gösterilen His ve Thr rezidüleri çubuk modelleri ile gösterilmiştir.

Enzim kinetiği hakkında hCA II üzerinde yapılan spesifik bölgedeki değişiklik ve X-Ray kristalografisi çalışmalarında da katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Yapılan X-Ray kristalografisi sonuçları metal iyonunun bir  $H_2O$  ve  $OH^-$  iyonu ve His-94, His-96 ve His-119 rezidüleri tarafından koordine edilen aktif bölgedeki  $15 \text{ \AA}$  derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Zn bağlı  $H_2O$ , Glu-106 rezidüsünün karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr-199'un  $-OH$  grubuyla H bağı ile tutulmaktadır. Bu etkileşmeler Zn bağlı  $H_2O$  molekülünün nükleofilitesini arttırmaktadır (Şekil 1.9). Böylece molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki  $CO_2$ 'e doğru hareket etmektedir (Supuran and Scozzafava 2001; Arslan 2013; Akıncıoğlu *et al.* 2013).



**Şekil 1.9.** hCA II izoenzimi tarafından CO<sub>2</sub>'in hidratasyon mekanizması.

Eritrositlerde CA I izoenzimi ile beraber CA II izoenzimi de bulunur. CA I ve CA II izoenzimlerin en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>'i HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in CO<sub>2</sub>'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında rol alır. CA I izoenziminin 25°C'de turnover sayısı  $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , CA II izoenziminin turnover sayısı ise  $10^6 \text{ s}^{-1}$ 'dir. CA I eksikliği tanı olarak belirlenmiş ancak herhangi bir klinik bulguyla ilgisi belirlenememiştir (Ren and Lindskog 1992; Supuran and Scozzafava 2001; Nar 2011).

Karbonik anhidraz enziminin son derece önemli olan hidrataz aktivitesi fonksiyonu bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu katalizlemesi ile organik sentezlerde kullanımını dikkatleri üzerine toplamıştır. Bu yüzden, CA enzimin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik metotların geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde enzim saflaştırılması için, çok çeşitli kromatografik teknikler bulunmaktadır. Bu teknikler göz önüne alındığında yüksek ayırma avantajı ile birlikte saflaştırma stratejisinin planlanmasındaki adım sayısının azlığından dolayı afinite kromatografisi birçok proteinin ya da enzimin saflaştırılması için idealdir (Arslan *et al.* 1996).

### 1.5. Çalışmanın Amacı

Yaşam için vazgeçilmez olan oksijen belirli durumlarda insan vücudunu kötü etkileyebilir. Oksidasyon canlı organizmalar için çok önemlidir. Oksijenin muhtemel zararlı etkilerinin çoğu, reaktif oksijen türlerinin oluşmasından dolayıdır. ROS'nin kontrolsüz üretimi ve dengesiz antioksidan savunma mekanizması birçok hastalık belirtileri ve erken yaşlanma ile sonuçlanır. ROS genelde süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ),  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  ile singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi serbest radikaller olmayan reaktifleri içerir. Organizmada ROS üretimi ile antioksidan tarafından ROS'un giderilmesi arasında bir denge vardır. Bu denge bozulduğu zaman ROS hücre membranlarında ya da hücre içi moleküllerde modifikasyonlara yol açar. Buna ek olarak patolojik durum ya da oksidatif stres altında ROS aşırı üretilir ve lipid peroksidasyonuna yol açar. Ancak antioksidan savunma mekanizması tarafından ROS ortadan kaldırılır (Gülçin 2008). Dolayısıyla antioksidan maddelerin organizmalara birçok faydaları olduğu için son zamanlarda popülaritesi artmıştır ve bu alandaki çoğu çalışmalar hız kazanmıştır.

Sonuç olarak bunlar düşünüldüğünde bu araştırmalar bizi bir fenolik bileşik olan oktopaminin antioksidan kapasitesini araştırmaya yönlendirdi. Bu amaçla oktopaminin kuprak metodu ile kuprik iyonları ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi,  $O_2^{\cdot-}$  giderme aktivitesi,  $ABTS^{\cdot+}$  giderme aktivitesi,  $DPPH^{\cdot}$  giderme aktivitesi,  $DMPD^{\cdot+}$  giderme aktivitesi, bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi,  $Fe^{3+}-Fe^{2+}$  indirgeme kapasitesi ve FRAP indirgeme kapasitesi kullanarak antioksidan kapasitesini belirledik. Bu aktiviteler birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırıldı.

Bu tez kapsamında oktopaminin antioksidan etkisi araştırıldı. Fenolik yapıya sahip oktopaminin sadece antioksidan özellikleri değil saflaştırılacak olan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerinde gözlenen aktivite etkileri de araştırıldı. Fizyolojik şartlarda insan eritrositlerindeki hCA enzimlerinin oldukça değiştiği görülmüştür. hCA aktivitesindeki değişiklikler diyabet, şeker hastalığı ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Gülçin *et al.* 2004f).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Canlı vücudundaki metabolik olaylarda devamlı üretilen ROS; nükleik asitler, lipitler, karbohidratlar, proteinler ve doymamış yağ asitleri gibi önemli biyomoleküllere zarar verdiği gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda ROS'nin 100'den fazla kronik hastalığa sebep olduğu belirlenmiştir (Gülçin 2010). Bütün aerobik organizmalar, zararlı molekülleri uzaklaştıran ya da onaran antioksidan enzimleri ve bileşenleri içeren antioksidan savunma sistemine sahiptir (Gülçin 2012). Koruyucu moleküller olarak adlandırılan antioksidanlar, ROS kaynaklı oksidatif hasarı azaltırlar ve birçok kronik hastalığın ilerlemesine engel olurlar (Gülçin 2008).

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) dantrolene sodyum (Büyükokuroğlu *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), yeni sentezlenmiş 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.

Bunlara ek olarak farklı kaynaklardan saflaştırılan maddelerin veya saf maddelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. *Perilla pankinensis* bitkisinden total olarak saflaştırılan antosiyaninler (Gülçin *et al.* 2005b), sarmaşık bitkisinden  $\alpha$ -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) gibi maddelerin de son zamanlarda antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile mukayeseleri yapılmış ve muhtemel mekanizmaları 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 ve karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), kiraz (Wang *et al.* 1999), ışgın (Oktay *et al.* 2007), turuncgiller (Saleh *et al.* 1998), brokoli (Gülçin *et al.* 2004e), kıvılcık (Gülçin *et al.* 2005c), defne (Elmastas *et al.* 2006a), mantar (Elmastas *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a), madımak (*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2003), evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısırğan (Gülçin *et al.* 2004b), su mercimeği (Gülçin *et al.* 2009b), meyan kökü ve yaprakları (*Glycyrrhiza glabra L.*) (Şerbetçi and Gülçin 2009), kiraz sapı (*Cerasus avium L.*) su mercimeği (Gülçin *et al.* 2010a), zencefil (Stoilova *et al.* 2006), ökse otu (Uçar *et al.* 2006), oğul otu (Köksal *et al.* 2011) ve tarçın (Chua *et al.* 2007) gibi birçok meyve ve sebze ile zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) ve karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012a) gibi bitkisel yağların ve propolisin (Gülçin *et al.* 2010b) ve kuru erik (Donavan 1998) gibi çeşitli meyve ve sebzelerde antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998) ve meyve sularında (Wen *et al.* 1999) yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir. Ayrıca patates (Friedman 1997), soğan (Ewald *et al.* 1999), fasulye (Ewald *et al.* 1999) ve ıspanak (Gil *et al.* 1999) gibi çeşitli sebzelerin de antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.

Oktopamin maddesinin antioksidan kapasitesi ve karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerinde daha önce herhangi bir çalışmanın yapılmaması bizi bu araştırmaya teşvik etti. Ayrıca oktopamin maddesi diğer farklı alanlarda da çalışılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları; cırcır böceklerinde nörohormon oktopaminin konsantrasyonu ve davranışının uzun vadedeki stres üzerine etkileri (Adamo and Baker 2011), parkinson hastalığında amin metabolizmasının belirtisi (Andrea *et al.* 2009), Kraliçesiz işçi

arılarında üremenin düzenlenmesinde oktopamin ve tiraminin rolü (Salomon *et al.* 2011), memelilerde oktopaminin rolü (Kakimoto *et al.* 1961), merkezi sinir lokuslarında oktopamin reseptörünün farmakolojisi (Roeder 1995), insanda doping kontrol örneklerinde oktopaminin rolü (Thevis *et al.* 2011), tiramin ve oktopamin: davranışların antagonist modölatörleri ve metabolizma (Roeder *et al.* 2003), meyve ve kurt sineklerinin beyinlerinde oktopaminin karşılaştırılması (Sınakevitch and Strausfeld 2006), böcek davranışlarında nöromodölatör oktopamin (Farooqui 2007) gibi sıralanabilir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonikası) (ABTS), N,N-dimetil-p fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali,  $\alpha$ - tokoferol, oktopamin, linoleik asit, aseton ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, (Sternheim Germany)'dan satın alındı. Çalışmada kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve L-tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamit, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetil aminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamit, N,N'-metilen bisakrilamit, Coomassie Brilliant Blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk'ten alınmıştır.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 730
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Hanna Instrument
Hassas terazi	Scaltec SBA 41
İnkübatör	Elektro-Mag (0-300°C)
Otomatik pipetler	Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Saf su cihazı	Firstream Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm <sup>3</sup> 'lük kuartz küvet

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

#### 3.1.3.a. $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$ 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:** 15 g TCA destile suda çözüldü ve toplam hacmi 150 ml'ye destile suyla tamamlandı.

4. **%0,1'lik  $FeCl_3$  çözeltisinin hazırlanması:** 165 mg  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

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

1. **0,01 M'lık  $CuCl_2$  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'luk  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  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.

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

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

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

**1. 0,1 M'luk fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,4):** 2,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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'luk ABTS<sup>+</sup> çözeltilisinin hazırlanması:** 11 mg ABTS, 0,1 M'luk ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**3. 2,45 mM'luk potasyum persülfat çözeltilisinin hazırlanması:** 66,25 mg  $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$  0,1 M'luk ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### **3.1.3.e. DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

**1. 0,1 M'luk asetat tamponunun hazırlanması (pH:5,3):** 2,05 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  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'lük DMPD<sup>+</sup> çözeltilisinin hazırlanması:** 209 mg DMPD 10 ml destile suda çözülerek hazırlandı.

**3. 0,001 M'lük DMPD<sup>+</sup> çözeltilisinin hazırlanması:** 0,1 M'lük DMPD çözeltilisinden 1 ml alındı 100 ml'lik ve 0,1 M'lük (pH:5,3) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 ml ve 0,05 M'lük FeCl<sub>3</sub> ilave edilerek hazırlandı.

**4. 0,05 M'lük FeCl<sub>3</sub> çözeltilisinin hazırlanması:** 0,81 g FeCl<sub>3</sub> 100 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

#### **3.1.3.f. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

**1. 0,05 M'lük fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,8):** 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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. 1,33x10<sup>-5</sup> M'lük riboflavin çözeltilisinin hazırlanması:** 12 mg riboflavin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.

**3. 4,46x10<sup>-5</sup> M'lük metiyonin çözeltilisinin hazırlanması:** 0,665 mg metiyonin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.

**4. 8,15x10<sup>-8</sup> M'lük NBT çözeltilisinin hazırlanması:** 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 ml'ye fosfat tamponuyla (pH:7,4, 0,1 M) tamamlandı.

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

**1. 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması:** 2,46 g  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  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  $\text{FeCl}_3$  Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,54 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  alındı ve 100 ml destile suda çözüldü.

**5. FRAP Reaktifinin Hazırlanması:** 10 hacim 0,3M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20mM'lık  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltisinden oluşur.

### 3.1.3.h. Bipiridil metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler

**1. 0,1 M'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'lık, 0,2 M'lık HCl çözeltisinde çözüldü.

**4. 2 mM'lık FeSO<sub>4</sub> Çözeltisinin Hazırlanması:** 0,028 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

### **3.1.3.i. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

**1. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH:8,8 (Sephrose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon):** 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 950 ml destile suda çözümlenerek, 1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**2. 0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH:10 (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon):** 15,9 g (0,15 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 8,4g (0,1 mol) NaHCO<sub>3</sub>'ün 1 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

**3. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti):** 3,03 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözümlenerek 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

**4. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti):** 3,026 g (25 mmol) Tris ve 3,12 g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözüldü. Daha sonra 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye tamamlandı.

**5. 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/1 M NaCl, pH:6,3 (kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):** 2,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 14,63 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<sub>4</sub>, pH:7,4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti):** 6,06 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözümlenerek, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra



hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**7. 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH:5,6 (kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):** 9,2 g NaClO<sub>4</sub> tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol CH<sub>3</sub>COONa.3 H<sub>2</sub>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 çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

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

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

**11. İndikatör çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):** 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,22 g NaHCO<sub>3</sub> ün 1 L'ye saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

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

**13. Stok oktopamin çözeltisinin hazırlanması:** 10 mg oktopamin (g/mol) 10 ml su içerisinde çözüldü.

**3.1.3.j. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler**

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

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

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

**4. Akrlamit-Bisakrilamit çözeltisinin hazırlanması:** 30 g akrilamit ve 0,8 g bisakrilamit karışımı 100 ml suda çözüldü.

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

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

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

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

## 3.2. Antioksidan Çalışmalar

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

Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (1986). Bunun için öncelikle 1 mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde deney tüplerine aktarıldı, hacim destile suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml ve 0,2 M'lık fosfat tamponu (pH:6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyumferrisiyanür [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 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 %0,1'lik FeCl<sub>3</sub> ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol olarak numune yerine su kullanıldı.

### 3.2.2. Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>+</sup> indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu) tayini

Oktopamin Cu<sup>2+</sup> indirgeme aktivitesi Apak ve arkadaşlarının kullandığı metodun (2006) hafif bir modifikasyonuyla yapılarak kullanıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan oktopamin tüplerine sırasıyla 0,25 ml CuCl<sub>2</sub> çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10<sup>-3</sup>M) ve 0,25 ml CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> tampon çözeltisi (1 M) eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

### 3.2.3. Süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) giderme aktivitesi tayini

Oktopamin süperoksit anyon radikali giderme etkisi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Bu amaçla Zhishen ve arkadaşlarının (1999) kullandığı metod hafif bir modifikasyonla kullanıldı. 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 çözeltiliye 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 20W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Absorbans, sudan oluşan köre karşı 560 nm'de kaydedildi.

#### **3.2.4. DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini**

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune 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.

#### **3.2.5. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini**

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre belirlendi (1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiliye 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi ilave edilerek ABTS radikalleri üretildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile  $0,700 \pm 0,025$  nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan oktopamin farklı konsantrasyonlarına (10-30 µg/ml) birer ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım saat inkübe edildi. Etanoldan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar kaydedildi.

### 3.2.6. DMPD radikali giderme aktivitesi tayini

DMPD radikali giderme aktivitesi tayini Fogliano ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon ( $\text{DMPD}^+$ ) elde edildi. Bunun için 100 ml'lik DMPD çözeltisine (pH:5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 ml  $\text{FeCl}_3$  ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 ml'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı.  $\text{DMPD}^+$  radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik yoğunluğu 0,1 M'lük ve pH'ı 5,3 olan fosfat tamponu ile  $0,900 \pm 0,100$  nm'ye ayarlandı. Günlük taze olarak hazırlanan  $\text{DMPD}^+$  çözeltisinin absorbansı 12 saate kadar kararlı kalabilir.

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

### 3.2.7. FRAP indirgeme kapasitesi tayini

Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde oktopamin ve standart çözeltiler aktarıldı. Hacimleri 0,5 ml'ye tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250  $\mu\text{l}$  20 mM'lük  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi ve 2250  $\mu\text{l}$  FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 mL olması sağlandı. Deney tüpleri vortex'de karıştırıldı ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbanları kaydedildi. Kör olarak asetat tamponu kullanıldı.

### 3.2.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini

$\text{Fe}^{2+}$  şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı (1999). Bu amaçla deney tüplerine 0,25 ml  $\text{FeSO}_4$  çözeltisi (2 mM) aktarıldı. Bu çözeltinin üzerine 0,12 ml oktopamin veya standart çözelti ilave edildi. Daha sonra sırasıyla 1 ml Tris-

HCl tamponu (pH:7,4) ve HCl (0,2 M) içerisinde çözünmüş 1,5 ml'lık ve %0,2'lik bipiridil çözeltisi ilave edildi. 2,5 ml etanol ve 0,63 ml saf su içeren numunenin absorbansı 522 nm'de ölçüldü. Kör olarak Tris-HCl tamponu kullanıldı. Kontrol olarak da numune yerine Tris- HCl tamponu kullanılarak hazırlanan çözelti kullanıldı.

### **3.3. Oktopaminin Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerindeki Etkisi ile İlgili Çalışmalar**

#### **3.3.1. Deneyde Kullanılan Kanın Temini**

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

#### **3.3.2. Enzim Saflaştırma Çalışmaları**

##### **3.3.2.a. hCA enzim hemolizatının hazırlanması**

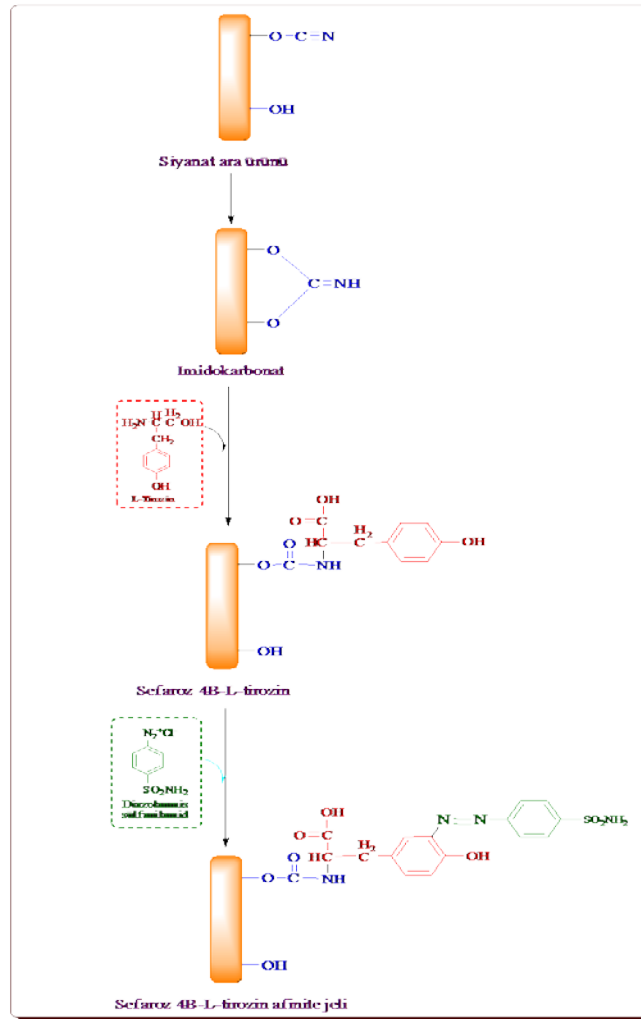
Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınarak, tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa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

### 3.3.2.b. hCA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

#### Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite jelinin hazırlanması

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

CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH:10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml'lik 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.



**Şekil 3.1.** CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları (Atasever *et al.* 2013)

Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> 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 sülfanilamid 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-SO<sub>4</sub> (pH:7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı. Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterildi.



### **Afinite kolonunun paketlenmesi**

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

### **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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece hCA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (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. hCA Enzim Aktivitesi Tayini**

### **3.4.1. Hidrataz aktivitesi**

hCA enzim aktivitesi tayini Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metodudur (1964). CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 ml veronal tamponu (0,025 M, pH: 8,2), 0,1 ml %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO<sub>2</sub> çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t<sub>0</sub>). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH: 6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t<sub>c</sub>).

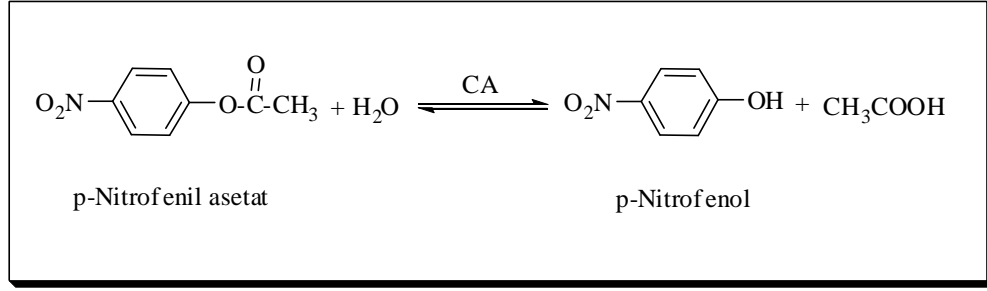
Bu yöntemle göre hCA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960). Hemolizat, saf enzim çözeltisi ve aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı. Kinetik ve aktivite 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 absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 3 ml’lik kuvars küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

**Çizelge 3.1.** Esteraz aktivitesi için 3 ml’lik kuvars küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü
0,5 M Tris-SO <sub>4</sub> , pH:7,4	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	300

1 ml’lik kuvars küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı.

**Çizelge 3.2.** Esteraz aktivitesi için 1 ml'lik kuvars küvetlere kullanılan çözeltiler

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

Çizelge 3.2'deki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C'de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

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

### **3.5. Protein Tayini**

#### **3.5.1. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozin aminoasitlerinin 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 10-100 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. hCA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar**

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

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

hesaplandı.

### **3.7. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü**

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniğı 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 Aktiviteleri Üzerine Oktopaminin Etkisinin Belirlenmesi**

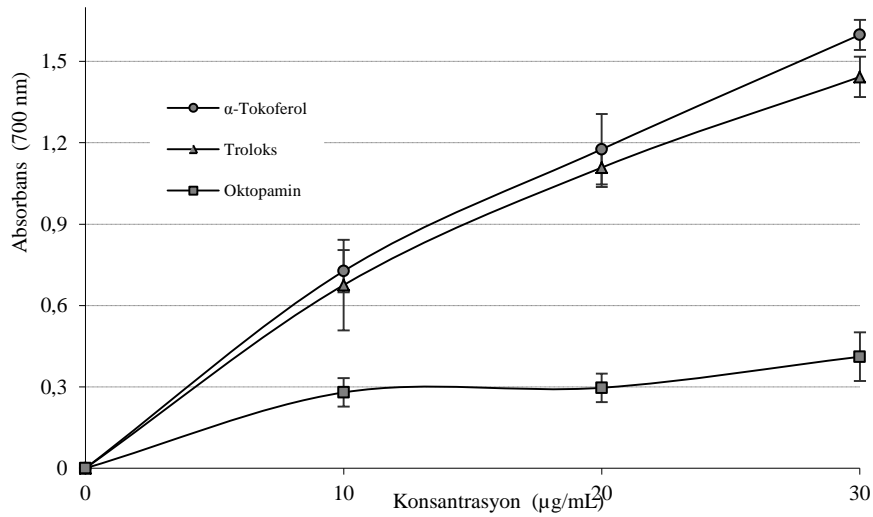
Oktopaminin, saflaştırılacak olan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

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

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



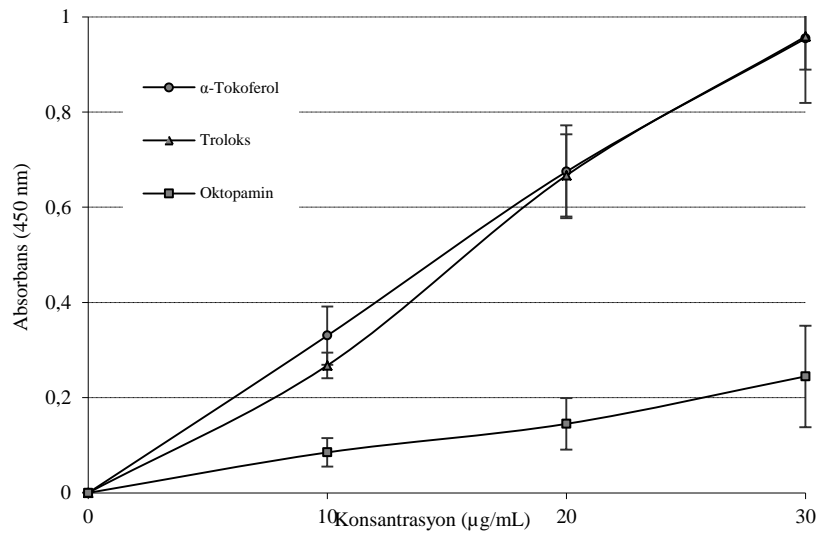
**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) oktopaminin ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Oktopaminin ferrik iyonlarını (Fe<sup>3+</sup>) ferröz iyonlarına (Fe<sup>2+</sup>) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.1) her bir standart antioksidan ve oktopamin için 20 µg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

Bu konsantrasyonda oktopamin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları:  $\alpha$ -tokoferol > troloks > oktopamin şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.1’de gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

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

Oktopaminin kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi, konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Oktopamin kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30  $\mu g/ml$ ) çözeltilerinin 450 nm’deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.2). Oktopamin çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.2) her bir standart antioksidan ve oktopamin için 20  $\mu g/ml$ ’ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1’de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.



**Şekil 4.2.** Oktopamin farklı konsantrasyonlardaki (10-30  $\mu g/ml$ ) kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda oktopamin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ )



indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında;  $\alpha$ -tokoferol  $\approx$  troloks  $>$  oktopamin şeklinde sıralanmaktadır.

**Çizelge 4.1.** 20  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda oktopamin ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ve kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

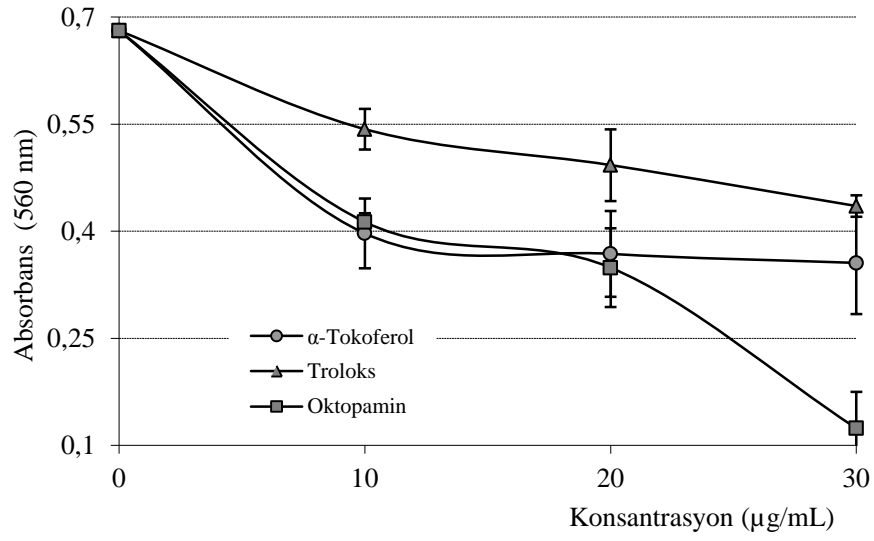
Antioksidanlar	Absorbans (700 nm)	Absorbans (450 nm)
$\alpha$ -Tokoferol	1,176	0,675
Troloks	1,109	0,667
Oktopamin	0,297	0,145

#### 4.1.3. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

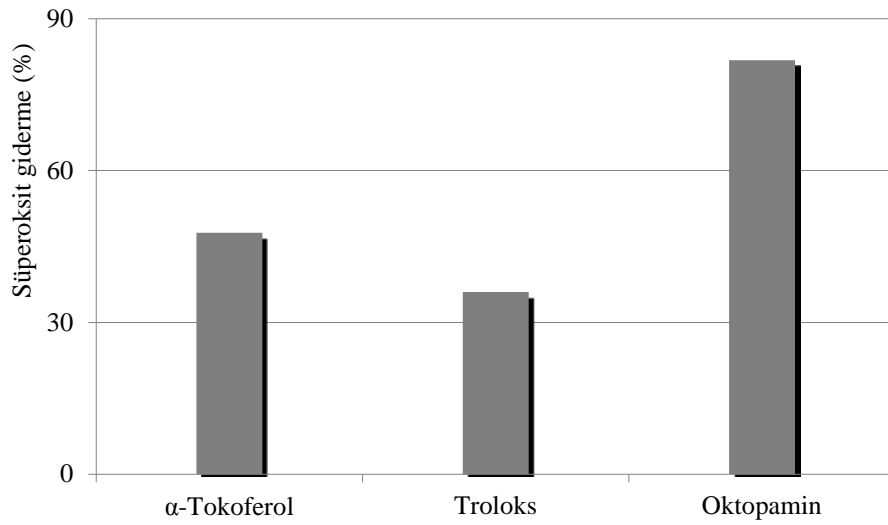
Oktopaminin, süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi riboflavin/metiyonin/ışık metoduna göre yapıldı. Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

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

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



**Şekil 4.3.** Oktopaminin (10-30 µg/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması



**Şekil 4.4.** Oktopamin,  $\alpha$ -tokoferol ve troloksun 30 µg/ml konsantrasyonunda süperoksit anyon radikalleri giderme aktivite yüzdeleri

Oktopaminin ve kullanılan standart antioksidan molekülleri sırasıyla (30 µg/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri oktopamin >  $\alpha$ -tokoferol > troloks şeklinde olduğu gözlemlendi.

#### 4.1.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Oktopamin ve çalışmada kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve troluks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ( $r^2$ : 0,9821) (Şekil 4.5).

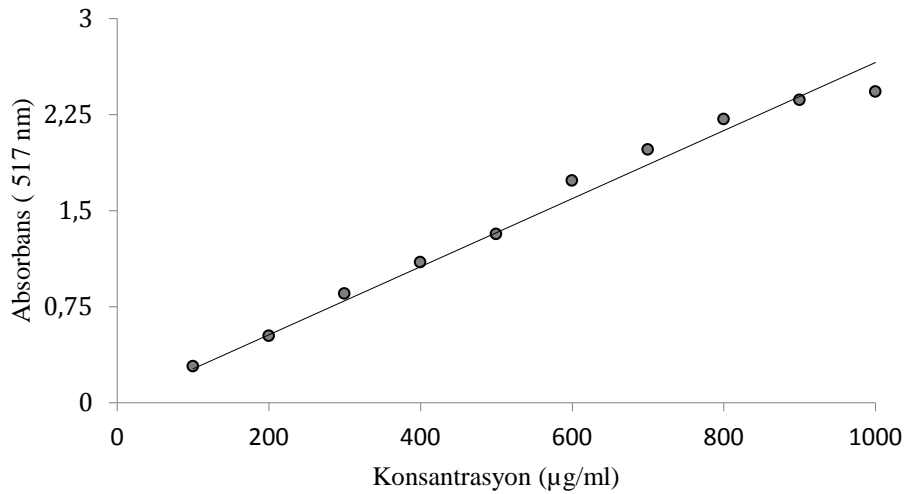
DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH serbest radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{517}) = 0,0027x \text{ [DPPH]}$$

DPPH serbest radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

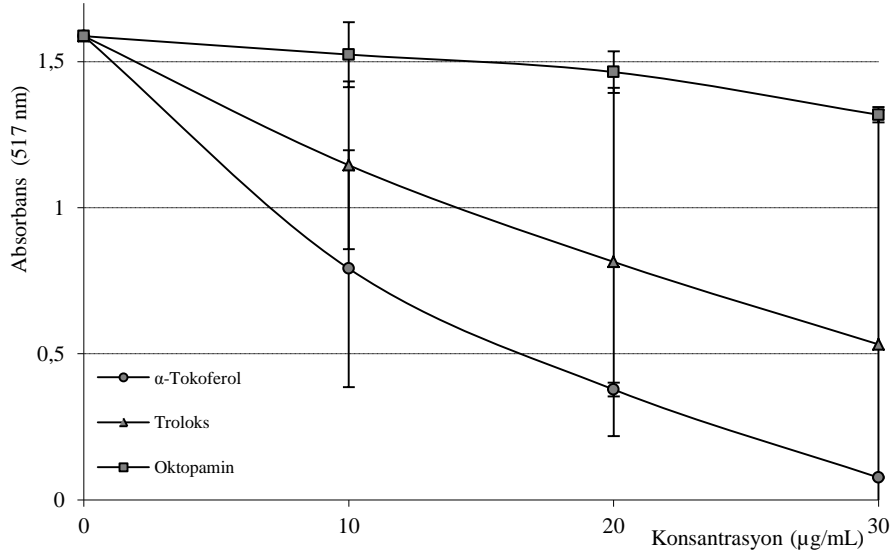
$$\text{DPPH} \cdot \text{giderme aktivitesi (\%)} = \left( 1 - \frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$

Burada  $\lambda_{517-N}$  DPPH serbest radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{517-K}$ , ise sadece DPPH serbest radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak  $\alpha$ -tokoferol ve troluks kullanıldı.



Şekil 4.5. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Oktopamin çözeltisinin DPPH serbest radikali giderme aktivitesi Şekil 4.6’da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



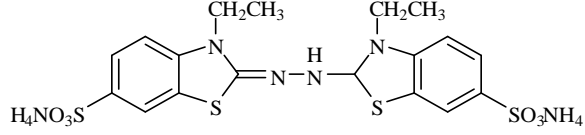
**Şekil 4.6.** Oktopaminin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Oktopamin ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH serbest radikali giderme aktivitesi sergilediler: α-Tokoferol > troloks > oktopamin şeklindedir.

#### 4.1.5. ABTS<sup>+</sup> radikal giderme aktivitesi bulgular

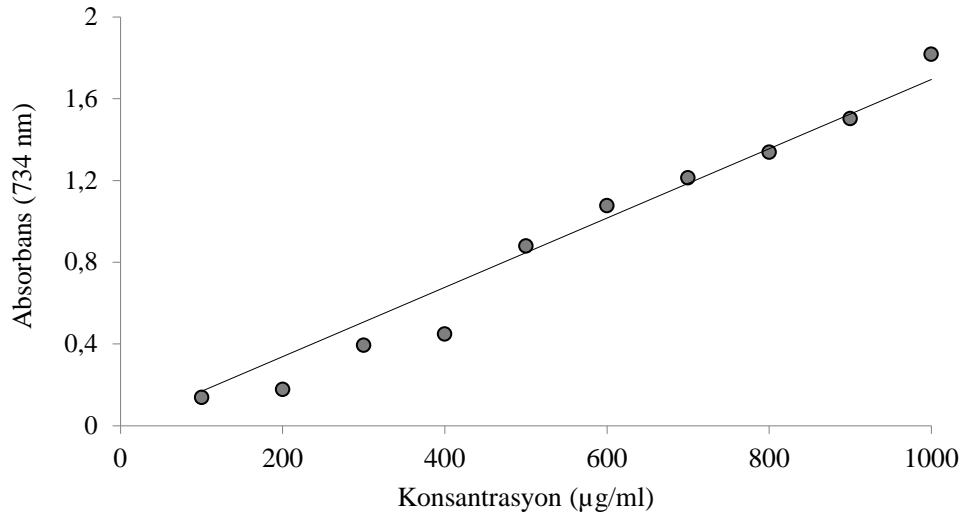
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996; Gülçin *et al.* 2007b). Bunun için öncelikle ABTS’den ABTS<sup>+</sup>’nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS’nin kimyasal yapısı Şekil 4.7’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.



**Şekil 4.7.** ABTS'nin açık kimyasal yapısı

Bu aşamadan sonra oktopaminle çalışmada kullanılan  $\alpha$ - tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin  $ABTS^{+}$  giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ( $r^2:0,9629$ ) (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.**  $ABTS^{+}$  giderme aktivitesi tayininde kullanılan  $ABTS^{+}$  için hazırlanan standart grafik

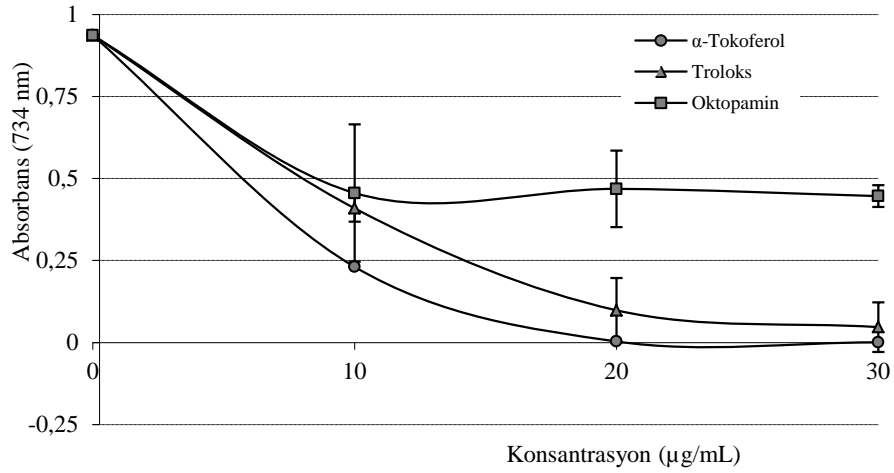
$ABTS^{+}$  giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan  $ABTS^{+}$  miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{734\text{nm}}) = 0,0016 \times [ABTS^{+}]$$

ABTS<sup>•+</sup> giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada  $\lambda_{734-N}$  ABTS<sup>•+</sup> çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{734-K}$  ise sadece ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak  $\alpha$ -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.9).



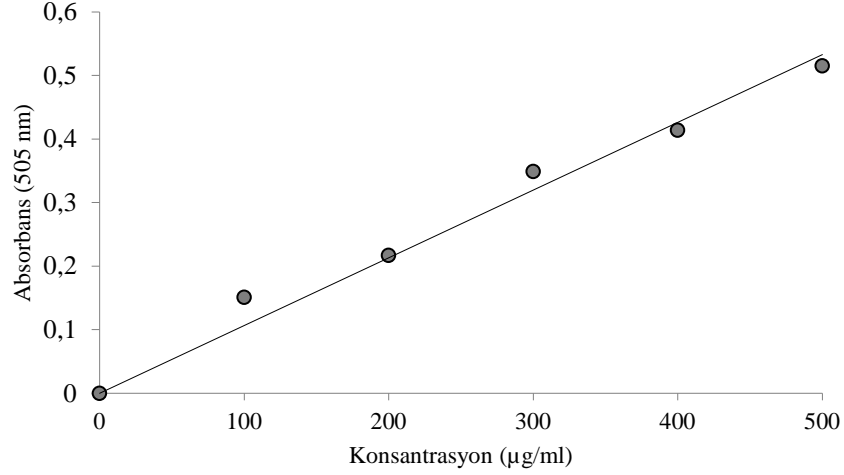
**Şekil 4.9.** Farklı konsantrasyonlardaki oktopaminin (10-30 µg/ml) ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Oktopamin ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS<sup>•+</sup> giderme aktiviteleri sırasıyla  $\alpha$ -tokoferol > troloks > oktopamin şeklinde olduğu gözlemlendi.

#### 4.1.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan oktopamin çözeltileri, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DMPD<sup>•+</sup> giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı

( $r^2$ : 0,9812; Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

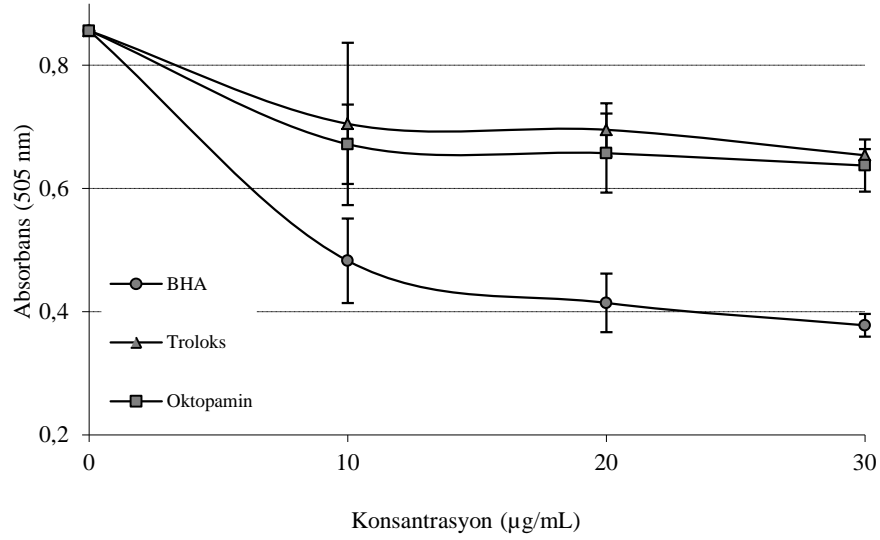
DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD<sup>+</sup> miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{505 \text{ nm}}) = 0,0005 \times [\text{DMPD}^{\bullet+}] + 0,0139$$

DMPD<sup>+</sup> miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

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

Burada  $\lambda_{505-N}$ , DMPD<sup>+</sup> çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{505-K}$  ise sadece DMPD<sup>+</sup> çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak  $\alpha$ -tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.11).



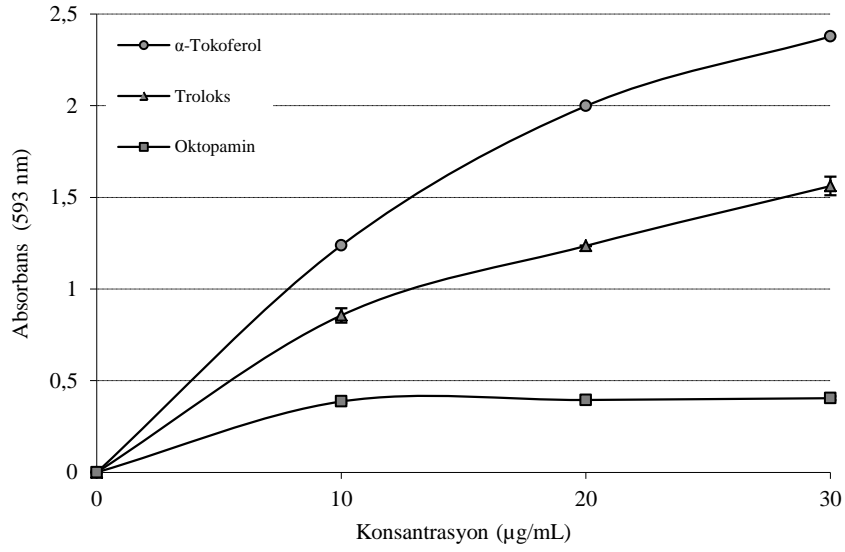
**Şekil 4.11.** Oktopaminin  $DMPD^{+}$  giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırması

Oktopamin ve kullanılan standart antioksidan moleküller  $DMPD^{+}$  giderme aktivitesi  $BHA > oktopamin > troloks$  şeklinde olduğu gözlemlendi.

#### 4.1.7. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottür. Bu metotta ferrik iyonları ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgenir. Oluşan ferröz ( $Fe^{2+}$ ) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluştur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans gösterir. Oktopaminin FRAP metoduna göre ferrik iyonları ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.12). Ayrıca oktopaminin standart antioksidanlarla FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin mukayesesi yapıldı:  $\alpha$ -tokoferol  $>$  troloks  $>$  oktopamin şeklinde bir sıralama gözlemlendi.



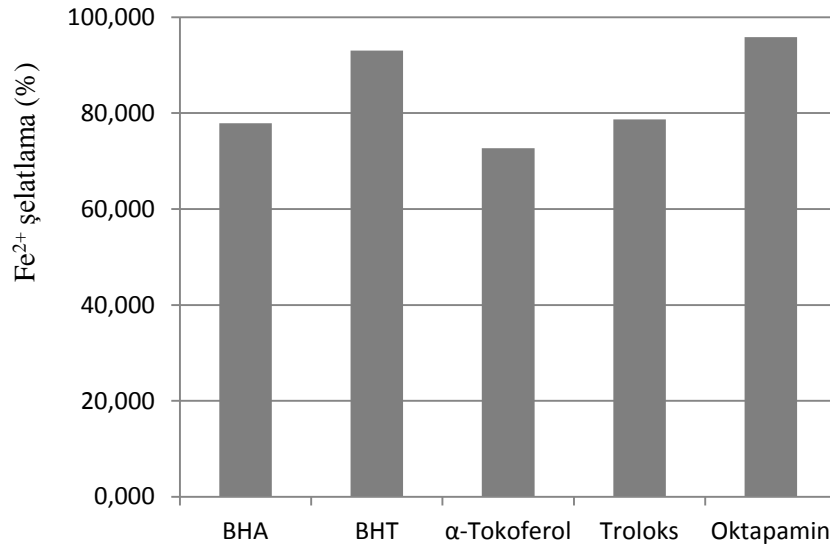


**Şekil 4.12.** Farklı konsantrasyonlardaki oktopaminin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin standart antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

#### 4.1.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi bulguları

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

Oktopamin ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil kullanılarak belirlendi. Bu tayinde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmedi 20  $\mu$ g/ml konsantrasyonlarına karşılık gelen metal şelatlama yüzdeleri Şekil 4.13'te verildi.



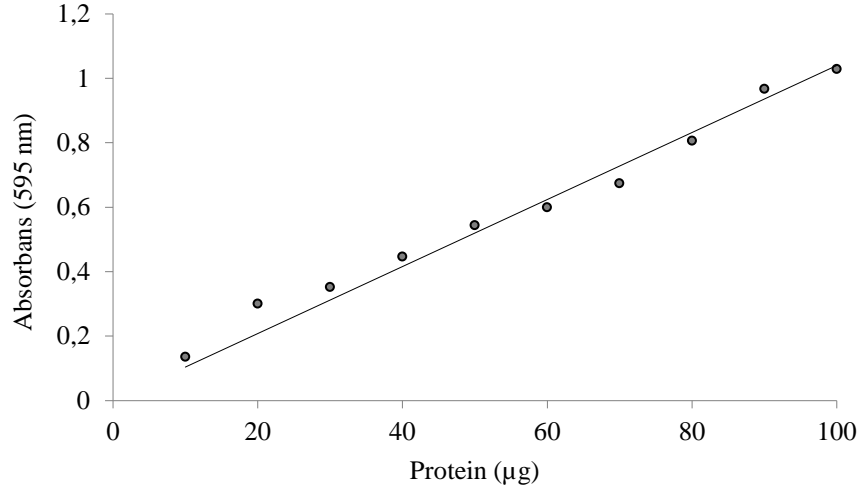
**Şekil 4.13.** Oktopaminin (20 µg/ml) bipiridil metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA BHT α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Aynı konsantrasyonda (20 µg/ml) oktopamin ve kullanılan standart antioksidan moleküller bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları Oktopamin > BHT > troloks > BHA > α-tokoferol şeklinde olduğu gözlemlendi.

## 4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

### 4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

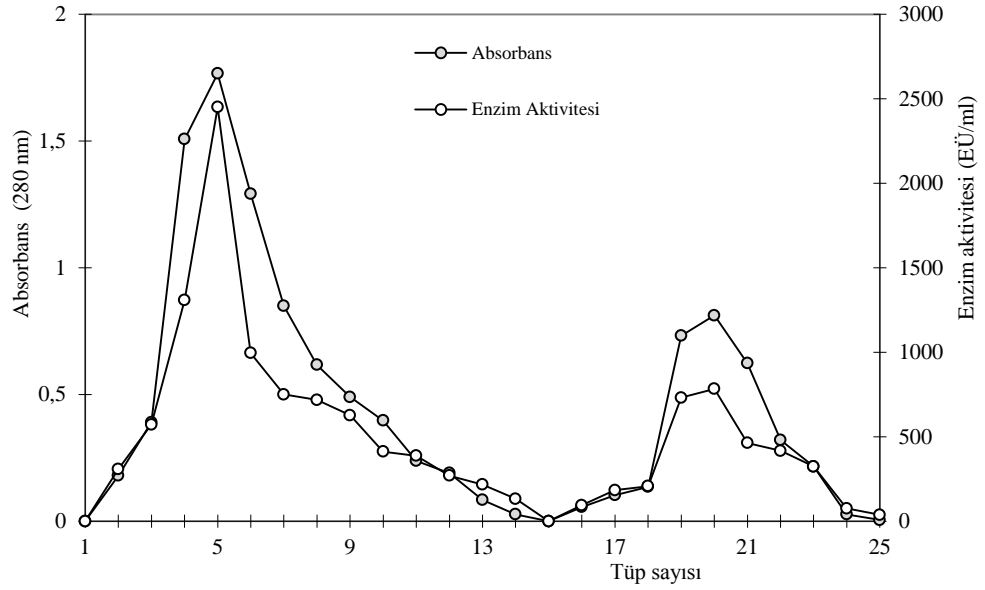
Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.14'ten elde edilen denklemden hesaplandı ( $r^2:0,9765$ ).



**Şekil 4.14.** Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

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

İnsan eritrositlerinden hCA I ve 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu geçirilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.15'da gösterildi.



**Şekil 4.15.** İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan absorbans grafiği (Kolon çapı 1,3 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml)

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

İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er ml numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizatın Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterildi.

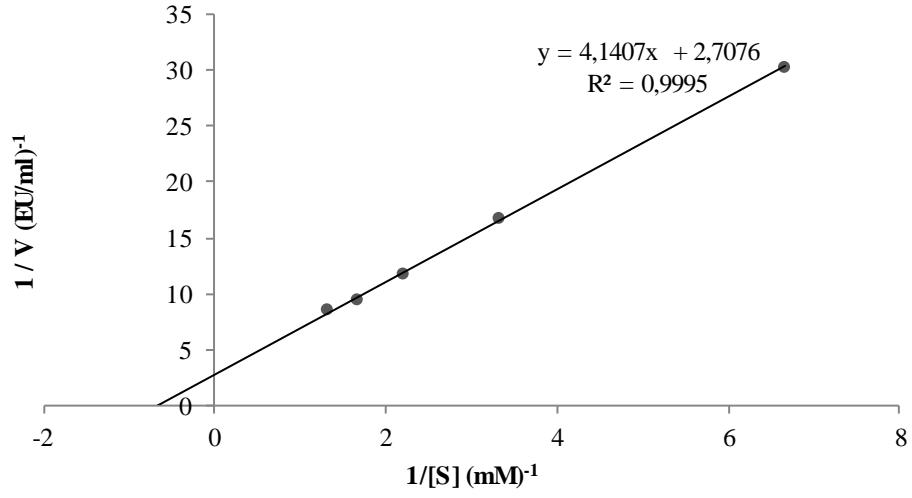
**Çizelge 4.2.** Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	1471,6	25	25,14	628,5	36790	58,54	100	1
Sepharose-4B-L-Tirozin Sülfanilamit afinite kolon kromatografisi	CA I 1852	4,75	0,28	1,33	8797	6614,3	23,91	113,0
	CA II 5377,2	2,5	0,19	0,48	13443	28006,3	36,54	478,4

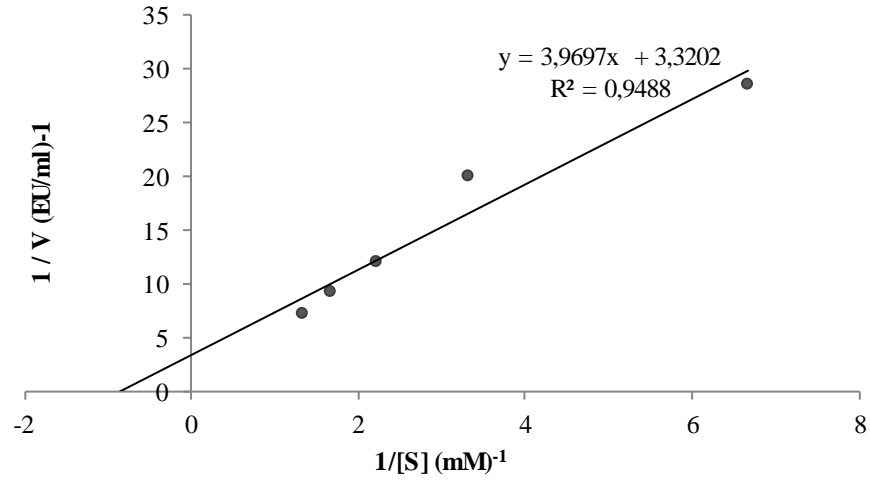
#### 4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları

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

İnsan kanından saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek ve bu grafiklerden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.16 ve 4.17).



**Şekil 4.16.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.17.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

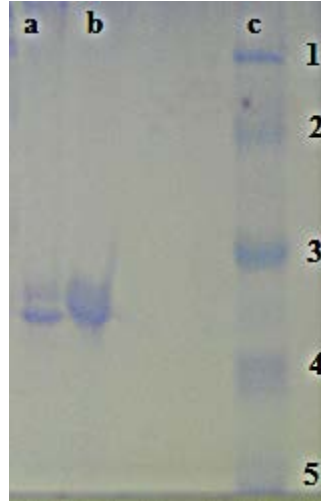
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak bulundu.

hCA I izoenzimi için  $K_m$  1,5293 mM,  $V_{max}$  0,3693 ise EU/ml.dak olarak hesaplandı.

hCA II izoenzimi için  $K_m$  1,196 mM,  $V_{max}$  0,301 ise EU/ml.dak olarak hesaplandı.

#### 4.2.5. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezine insandan saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.18).



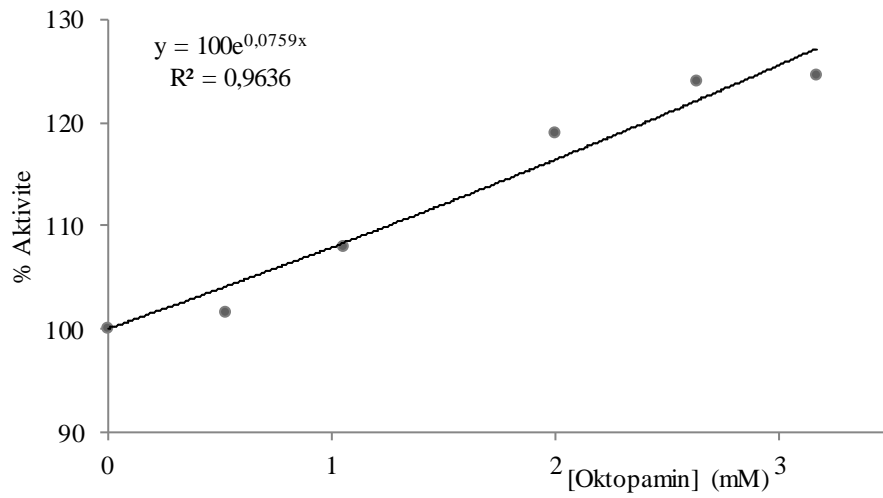
**Şekil 4.18.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı

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

#### 4.2.6. hCA I ve hCA II izoenzimleri aktiviteleri üzerine oktopamin etkisinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

#### 4.2.6.a. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren oktopamin ile ilgili sonuçları

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

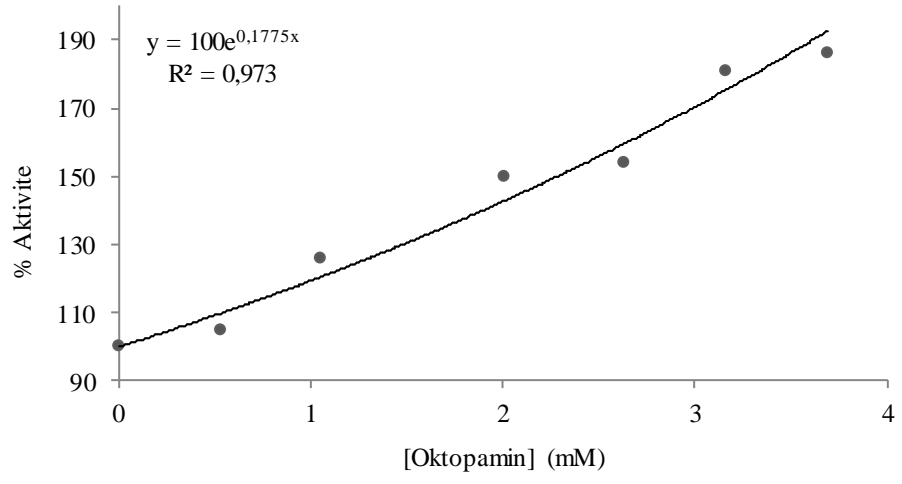


**Şekil 4.19.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan oktopamin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Oktopamin] grafiği

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

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





**Şekil 4.20.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan oktopamin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Oktopamin] grafiği

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

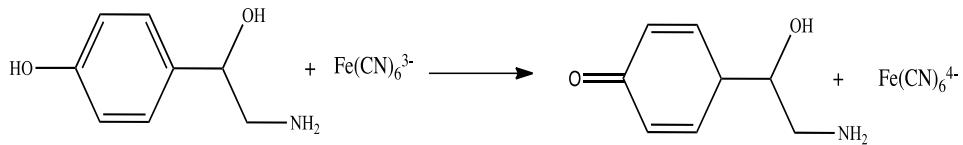
Birçok çalışmada oktopaminin eklem bacaklılar, bazı böcek türleri, arılar ve yumuşakçalar gibi birçok canlı organizmada belirli biyolojik rolleri olduğu, merkezi sinir sistemi üzerinde etkileri bulunduğu ve dopamine yapısal benzerliğinden dolayı Parkinson hastalığındaki rolü araştırılmıştır. Fakat antioksidan kapasitesi ile hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Oktopamin bir fenolik bileşik olduğu ve genelde fenolik bileşiklerin antioksidan özelliğine sahip olduğu düşünülerek çalışmamızda oktopaminin antioksidan kapasitesi ile hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine etkisi araştırıldı. Bu kapsamda oktopaminin antioksidan, antiradikal indirgeme kapasitesi ve metal şelatlama özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda,  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre  $Cu^{2+}$ - $Cu^{+}$  indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre  $Fe^{3+}$ -TPTZ indirgeme kapasitesi, bipiridil reaktifi kullanarak ferröz iyonlarını ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi, DMPD<sup>+</sup> giderme aktivitesi ile riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak belirlendi. Çalışılan bütün yöntemlerde bulunan aktiviteler gıda ve farmokoloji sanayisinde yaygın olarak kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve  $\alpha$ -tokoferolün suda çözünen türevi olan troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile mukayeseleri yapıldı. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir.

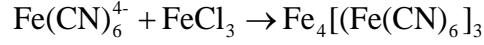
Oktopaminin çalışılan konsantrasyonlarda (10-30  $\mu$ g/ml), artan konsantrasyon paralel olarak indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamalarda, DPPH ve ABTS, giderme aktivitelerinde de düşük bir artış gözlenmiştir. Ancak bipiridil kullanarak ferröz iyonlarını ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi ve süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde ise konsantrasyon ile doğru orantılı pozitif bir korelasyon gözlenmemiştir.

Pek çok antioksidan analizinde aynı konsantrasyonlardaki oktopamin ve standart antioksidanların aktiviteleri karşılaştırıldığında oktopaminin nisbeten daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca üç farklı metot ile yapılan indirgeme kapasitesi tayinlerinde oktopaminin indirgeme kapasitesinin artan konsantrasyonla arttığı, fakat bu aktivitenin kullanılan standartlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Bir bileşiğin antioksidan aktiviteye sahip olması o bileşiğin indirgeme kapasitesi ile doğrudan ilişkilidir (Meir *et al.* 1995). Saf maddelerin antioksidan özellikleri farklı mekanizmalar üzerinden yürüyebilir. Örneğin, geçiş metalleri tarafından oksidasyonun hızlandırıldığı bir sistemde antioksidan özellikteki bir bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. Ancak bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile böyle bir sistemde oksidasyonu durduracak veya hızını yavaşlatacaktır (Halliwell and Gutteridge 1989).

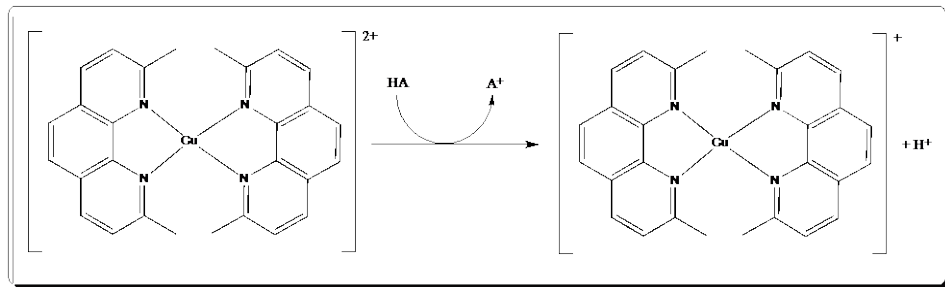
Antioksidan bileşikler, aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu önleme, radikal giderme gibi farklı mekanizmalar ile sağlayabilirler (Diplock 1997; Gülçin 2002). Bir bileşiğin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bilinmektedir (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006). Antioksidanlar, indirgeyici ve redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi farklı metotlar ile ölçülebilir. Bu amaçla en fazla kullanılan metotlardan biri  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3+}$ 'nin  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{2+}$ 'ye indirgenmesidir. Oktopamin ilavesiyle  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3+}$ 'den  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{2+}$ 'e indirgenen Prussian mavisi komplekse  $\text{Fe}^{3+}$ 'in ilave edildiğinde 700 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Absorpsiyondaki artış, artan indirgeme aktivitesini göstermektedir.





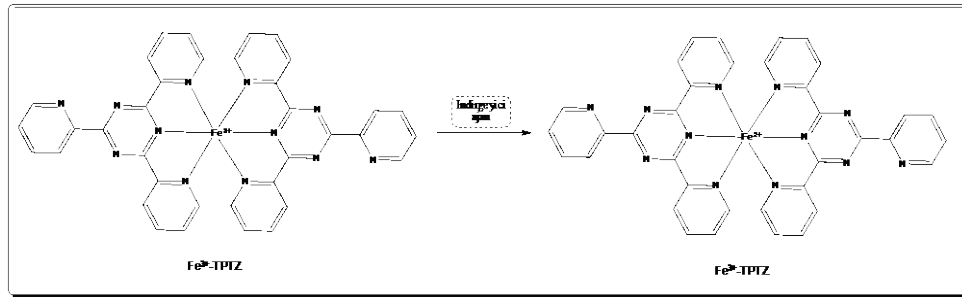
Bu aktivite tayininde test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Benzie and Strain 1996). İndirgeme potansiyelini ölçmek için tasarlanmış pek çok sayıda analiz modeli vardır (Wood *et al.* 2006). Mevcut çalışmada ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin yanı sıra kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $\text{Cu}^+$ ) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduyla  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ indirgeme kapasitesi de çalışıldı.

Kuprak metodu son yıllarda Apak ve grubu (2004) tarafından indirgeme gücü analizi için geliştirilen oldukça önemli bir yöntemdir. Aynı zamanda son yıllarda oldukça yaygın bir kullanım alanı kazanmıştır (Gülçin 2008; 2010; 2012 Gülçin *et al.* 2010). Bu yöntem, düşük maliyeti ile beraber hızlı, kararlı ve rahat uygulanabilir bir yöntemdir. Ayrıca indirgeyici maddenin türüne veya hidrofiliğine dikkat edilmeden farklı antioksidanlar için uygulanabilir. Kuprak metodu bir kromojenik redoks reaksiyonu olup fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7,0) gerçekleştirilir (Apak *et al.* 2004; Gülçin 2008; Köksal *et al.* 2009). Kuprak metodu; antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $\text{Cu}^+$ ) indirgenmesi esasına dayanır. Neokuprinin varlığında  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ 'e indirgenir. Oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorbans verir (Şekil 5.1). Kuprak metodunda  $\text{CuCl}_2$  ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Neokuprin heterosiklik organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır.



**Şekil 5.1.** Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu

Hazırlanan çözeltilerin 450 nm'deki absorbans artışı gözlemlenir. Bu artış indirgenme miktarının, yani nümunenin antioksidan kapasitesinin bir ölçütü olarak değerlendirilir. FRAP metodu  $Fe^{3+}$ -TPTZ kompleksinin  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksine indirgendiği metottur. Düşük pH'da  $Fe^{3+}$ 'ün  $Fe^{2+}$ 'ye indirgenmesi renkli  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksinin oluşmasına sebep olur. Oluşan bu demir kompleksi oksidan olarak kullanılır ve bu demir kompleksin redoks potansiyeli 0.70 V'tur (Benzie and Strain 1996). Bu değer  $ABTS^{+}$ 'nin redoks potansiyeline (0.68 V) yakındır.  $ABTS^{+}$  ve FRAP arasındaki tek fark, FRAP metodunun daha asidik pH'da (pH:3.6) gerçekleşiyor olmasıdır (Huang *et al.* 2005). Asidik ortam ve antioksidanların varlığında  $Fe^{3+}$ -TPTZ kompleksi  $Fe^{2+}$ -TPTZ kompleksine indirgenir. Oluşan renkli kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir.



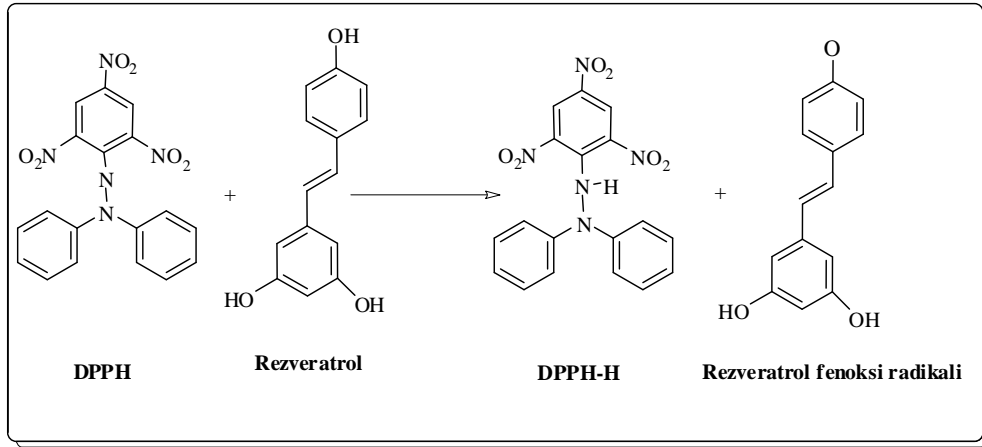
**Şekil 5.2.** FRAP metoduna göre ferrik iyonlarının ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgenme reaksiyonu (Gülçin 2012)

**Çizelge 5.1.** Çalışmada kullanılan oktopaminin 20  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ), kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) ve FRAP metoduna göre indirgeme kapasiteleri

Antioksidanlar	$Fe^{3+}$ indirgeme (700 nm)	$Cu^{2+}$ indirgeme (450 nm)	FRAP metodu (593 nm)
$\alpha$ -Tokoferol	1,174	0,576	2,141
Trolöks	1,105	0,572	1,237
Oktopamin	0,306	0,195	0,397

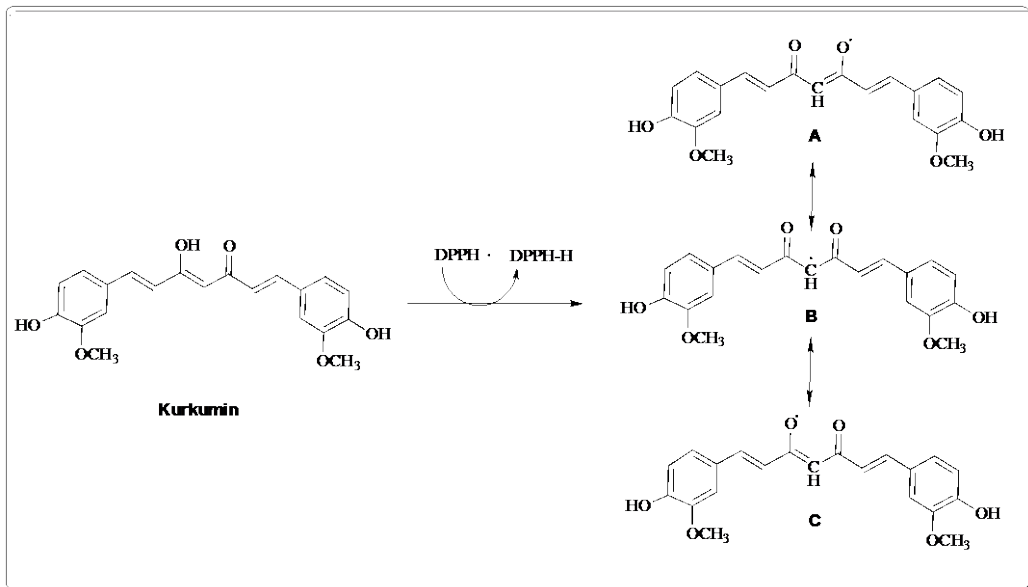
Oktopaminin radikal giderme kapasitesi daha önce literatürde belirtilen en önemli dört metot kullanılarak belirlendi. Bu amaçla en çok kullanılan metot DPPH radikali giderme metodudur (Gülçin 2012). DPPH radikali 1950'li yıllarda keşfedilen





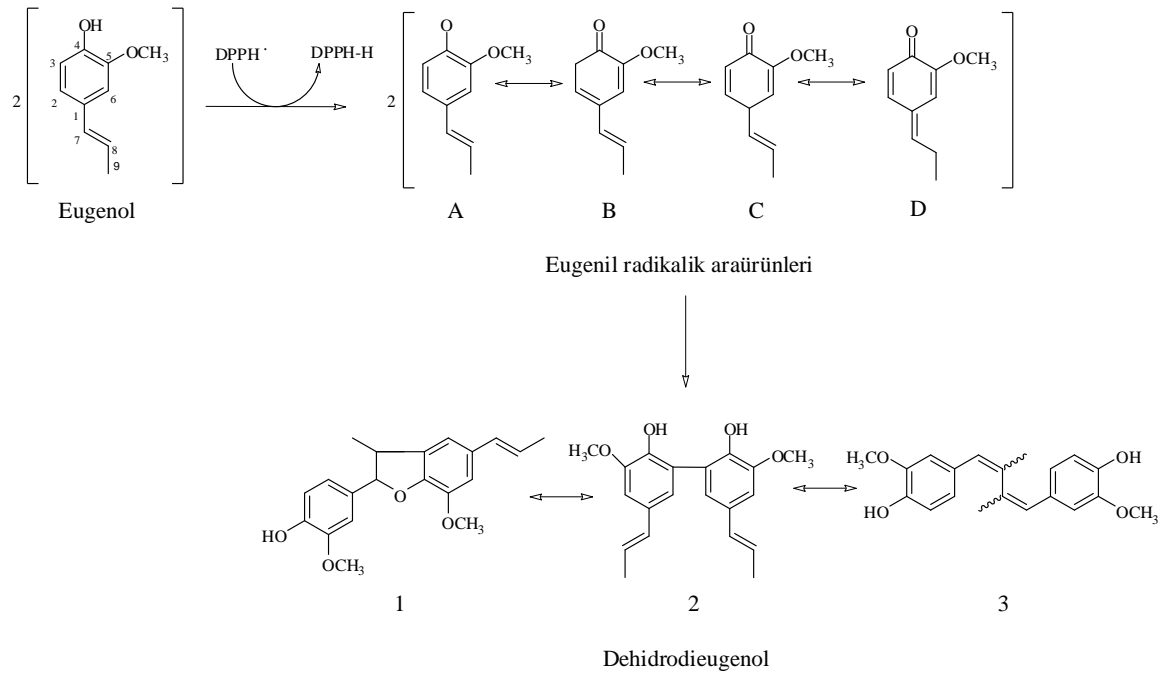
**Şekil 5.4.** Bir rezveratrol molekülünün DPPH· serbest radikalini söndürmesi ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluşumu

Kurkuminde ise bunda farklı olarak fenolik halkalardaki metoksi ve hidroksi gurupları moleküler içi H-bağı yaparak radikaller ile etkileşmeyecek şekilde kapalı bir konumdadır. Bunun yerine kurkumin molekülüne bu özellikleri kazandıran grup ortadaki hidrokarbon konjuge çift bağları ile enol keto tautomeri formlarıdır (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2012).



**Şekil 5.5.** Bir kurkumin molekülünün DPPH· radikalini gidermesi

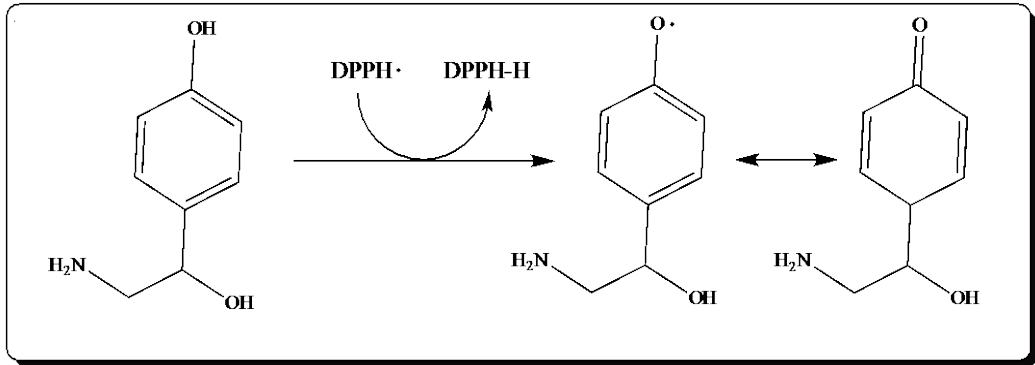
Gülçin tarafından yapılan başka bir çalışmada karanfil (*Eugenia caryophyllata*) bitkisinin etken maddesi olan eugenol üzerinde farklı özelliklerin belirlenmesidir. Bu çalışmada eugenol ve izoeugenol karmaşık yapıdaki dimerik türlerini içeren kompleks reaksiyon mekanizmaları aydınlatılmıştır. Özellikle, eugenol molekülünün yan zincirinin rolü üzerinde durulmuştur. Bu yan zincirdeki konjügasyon sayesinde eugenolün antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin daha da arttığı ileri sürülmüştür. Eugenolün sadece bir adet aromatik hidroksil grubu olmasına rağmen bu çalışmada eugenol molekülünün iki veya daha fazla DPPH serbest radikalini giderdiği bildirilmiştir. Şekil 5.6’de görüldüğü gibi A, B ve C molekülleri iki fenolik hidroksil grupları üzerinde dimerleşir ve bütün bu bileşikler C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> ve C<sub>5</sub>-C<sub>5</sub> arasındaki kapling reaksiyonları sonucu oluşur (Gülçin 2012).



**Şekil 5.6.** Eugenol molekülünün DPPH· serbest radikalini gidermesi ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu

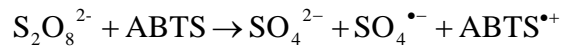
Biz bu çalışmada oktopaminin rezveratrole benzer şekilde DPPH· serbest radikalini giderme mekanizmasını sergileyeceğini tahmin etmekteyiz. Oktopamin halkasında bulunan fenolik halka rezonans kararlılığı etkisiye radikali gidereceğini ve kendisinin de radikalik olmayan bir forma düzenleneceğini söyleyebiliriz. Oktopaminin DPPH· serbest radikalini giderme mekanizması Sekil 5.7’deki gibi özetlenebilir.



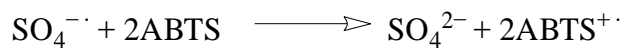


Şekil 5.7. Oktopaminin muhtemel DPPH· serbest radikalini giderme mekanizması

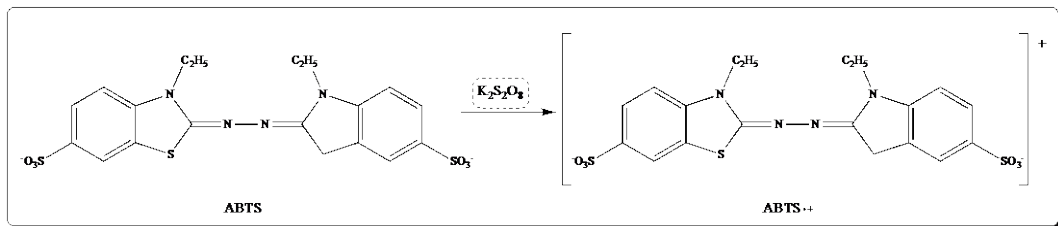
ABTS metodunda, ABTS oksidanlar tarafından yükseltgenir ve  $ABTS^{+\cdot}$  radikali oluşur. Yoğun renkli  $ABTS^{+\cdot}$  radikal katyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak  $K_2S_2O_8$  veya  $Mn_2O_3$  kullanılabilir. ABTS oluşumu için geliştirilen metot, ABTS ve potasyum persülfat ( $K_2S_2O_8$ ) arasındaki reaksiyon sonucu mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Bu metotta oluşturulan  $ABTS^{+\cdot}$  katyonu 734 nm'de maksimum absorbans gösterir.



Aşırı ABTS olduğunda, sülfat radikali aşağıdaki reaksiyona göre tepkime verir.

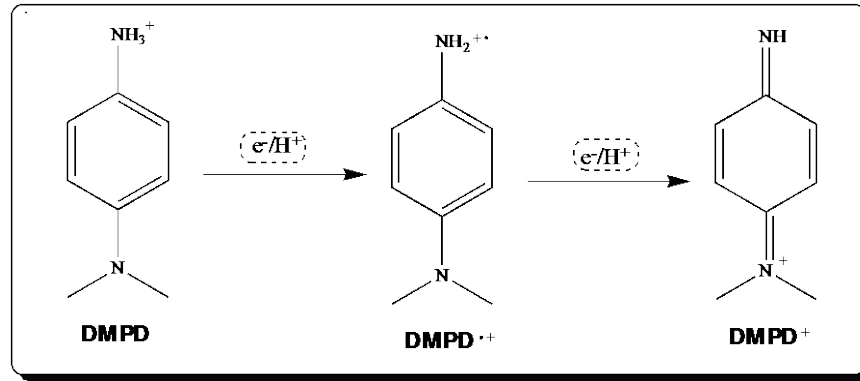


Toplamdaki net reaksiyon ise aşağıdaki şekilde olur.



Şekil 5.8.  $K_2S_2O_8$  ile ABTS'nin yükseltgenmesi ve  $ABTS^{+\cdot}$ 'nin kimyasal yapısı

Radikal giderme kapasitesi belirlemek amacıyla yapılan ABTS<sup>•+</sup> giderme metoduna benzeyen bir diğer radikal giderme metodu ise DMPD<sup>•+</sup> giderme metodudur. DMPD<sup>•+</sup> giderme metodunun esası, asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu olan DMPD<sup>•+</sup>'nin oluşmasını sağlar. DMPD<sup>•+</sup> ise 505 nm'de maksimum absorbanı gösterir. DMPD<sup>•+</sup>'ye bir H atomu transfer eden antioksidan madde rengi söndürür ve çözeltide bir renksizleşme meydana gelir. Reaksiyon on dakikadan daha kısa zamanda gerçekleşir. Bunun için yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar, son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk solüsyonu veren FeCl<sub>3</sub> çözeltisiyle olur. Bu metot diğer radikal giderme metotları gibi düşük maliyet ve yüksek tekrarlanabilirlik fırsatı sunar. DMPD metodu genelde hidrofilik antioksidanlar için uygundur. Çünkü metodun hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği hidrofobik bileşenler için azalmaktadır (Gülçin 2008; 2012).



**Şekil 5.9.** Kararlı bir radikal olan DMPD<sup>•+</sup>'nin oluşum ve giderilme mekanizması

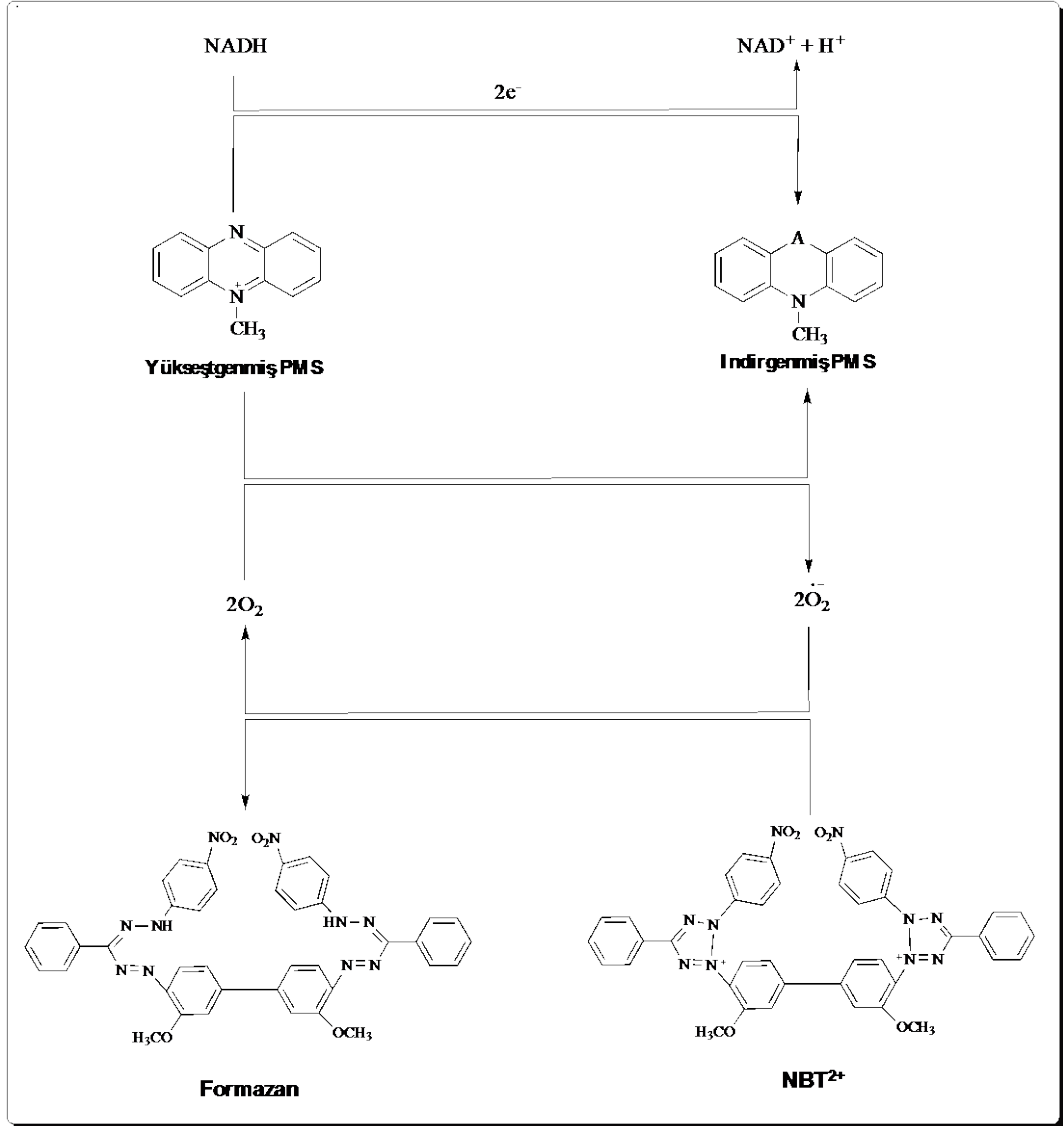
Sonuçlara bakıldığında ise oktopaminin DMPD<sup>•+</sup> giderme kapasitesinin kullanılan standartlardan daha düşük olduğu gözlenmektedir.

Süperoksit anyon radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatan oksijen merkezli radikaller olup, biyolojik makromoleküller ile etkileşip doku hasarına neden olan radikallerdir (Gülçin 2012). Süperoksit anyon radikalleri çok reaktif değildirler. Süperoksit anyon radikalleri katalaz ve peroksidaz enzimlerini inaktive edebilir, oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranını

parçalayabilir (Fridovich 1983; Mavi 2005). Lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynarlar. Ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ), Sitokrom c gibi bazı demir komplekslerini de kolaylıkla indirgeyebilir (Gülçin 2012).

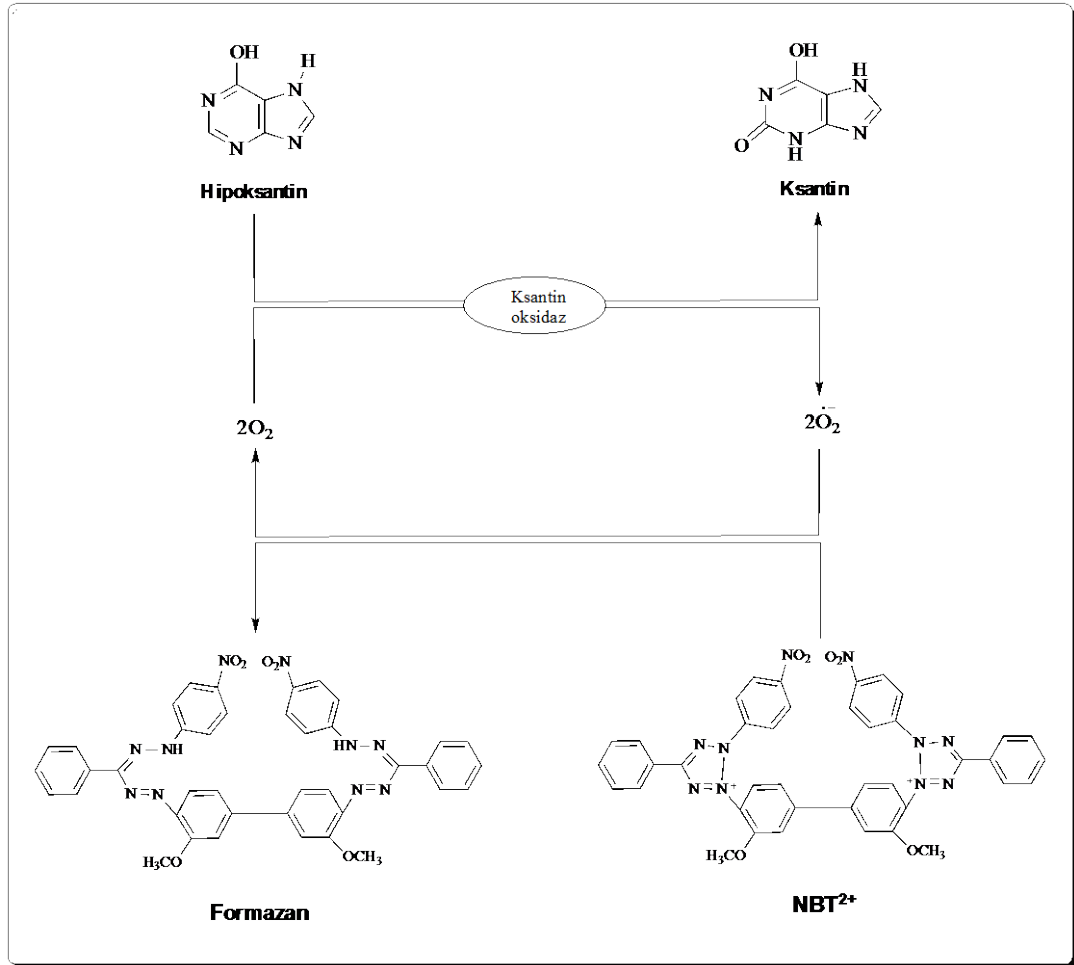
Bu çalışmada süperoksit anyon radikali oluşturmak için riboflavin/metiyonin/ışık sisteminde çalışıldı. Böylece riboflavin/metiyonin/ışık sisteminde çözünen moleküler oksijenden süperoksit anyon radikali elde edilir. Elde edilen süperoksit anyon radikali  $NBT^{2+}$ 'yi formazana yükseltir. Bu metotta, süperoksit anyonunun yeşil rengi spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçülebilen formazanın mavi rengine dönüşür. Antioksidan maddeler NBT'nin mavi renkli formunun oluşmasını inhibe ederler. Antioksidan bir madde sayesinde gerçekleşen 560 nm'deki absorbans azalışı, reaksiyon ortamındaki süperoksit anyonunun giderildiğinin bir göstergesidir (Gülçin 2012).

Şekil 5.10 ve 5.11'da da görüldüğü gibi NADH/PMS ortamında üretilen süperoksit radikallerinin  $NBT^{2+}$ 'yi formazana yükseltmesi görülmektedir.



**Şekil 5.10.** NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT<sup>2+</sup>'yi formazana yükseltmesi

Yine süperoksit anyon radikalleri benzer şekilde ksantin/ksantin oksidaz sisteminde de üretilebilir. Bu sistemde üretilen süperoksit anyon radikalleri Şekil 5.11'da gösterilen benzer mekanizma ile NBT<sup>2+</sup>'yi formazana yükseltir.

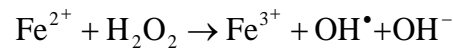


**Şekil 5.11.** Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin  $NBT^{2+}$ 'yi formazana yükseltgemesi

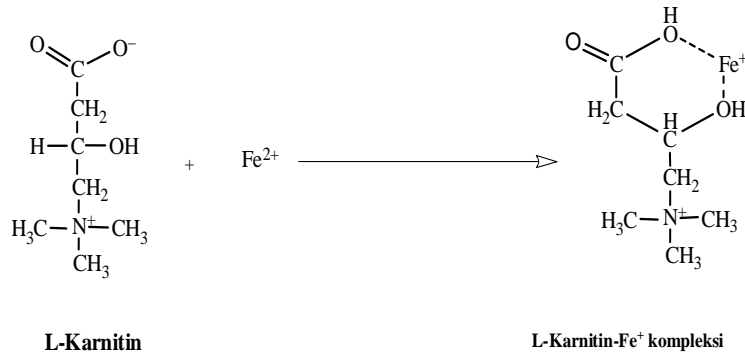
Demir, en çok kullanılan metal olmakla beraber dünyada üretilen toplam metallerin ağırlıkça %95'ini oluşturur. Demir, bakır ve kalsiyum gibi bazı minerallerin emilimi ve kanda oksijeni taşıyan kırmızı kan hücrelerinin ve çeşitli enzimlerin üretimi için gereklidir. Ayrıca, bağışıklık sistemini de güçlendirir. *In vivo* şartlarda serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları ( $Fe^{3+}$ ) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınarak ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şeklinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanır. Bir ferritin proteininin bu şekilde 4500 adet ferröz iyonlarını ( $Fe^{2+}$ ) bağladığı bilinmektedir. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer “demir havuzu” görevi yapan ferritin ve hemosferinde depolanır. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir

kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formda olup, seruloplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidroksil radikali oluşur. Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya parçalanmış hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu da hücre ve doku hasarını hızlandırır. Örnek olarak travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar oluşabilir. Parkinson hastalığı, beyinde substantia nigra'da mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır. Sonuç olarak serbest radikaller oluşur. Bu durumda serbest radikaller zincirleme radikalik reaksiyonlar ile substantia nigra'nın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan aminoasitlerin tiyol gruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Diğer bir taraftan ise hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek önemli ölçüde hücre hasarlarına da neden olmaktadır (Nar 2011 ).

Ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) gibi iyonik türler, organizmada serbest oksijen radikalleri üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını önlemek veya geciktirmek amacıyla kullanılan önemli bir antioksidan yöntemidir. Demir, organizmalar için önemli bir mineraldir. Fakat aşırısı hücre hasarına neden olabilir. Geçiş metalleri içerisinde demir yüksek aktiviteye sahip olduğu için önemli bir lipid oksitleyici metaldir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ), bilinen en önemli prooksidan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar ( $Fe^{3+}$ ) da oluşabilir. Ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ), ferrik iyonlarından ( $Fe^{3+}$ ) 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 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) konsantrasyonunu en aza indirmekte ve oksidatif hasara neden olan serbest radikal oluşumu inhibe etmektedir (Gülçin 2007b). Ferrozin, ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) gibi iki değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli metal-ferrozin kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında metal-ferrozin kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesidir. Bu anlamda daha önce Gülçin (2006b) tarafından L-Karnitin'in metal şelatlama aktivitesinin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada L-Karnitin'in ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) konsantrasyona bağlı olarak şelatladığı gözlenmiş ve Şekil 5.12'de gösterildiği şekilde L-Karnitin ile ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) arasındaki olası metal şelatlama mekanizması aydınlatılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi bir L-Karnitin molekülünün karboksil grubu ile yine aynı L-Karnitin molekülünün  $\gamma$ -karbonuna bağlı hidroksil grubu arasında bir metal köprüsü oluşarak bir ferröz iyonu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlanır.

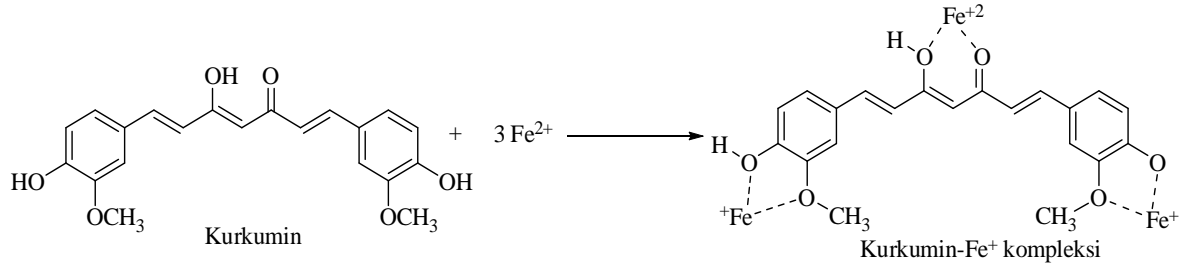


**Şekil 5.12.** L-Karnitin ile  $\text{Fe}^{2+}$  arasında öne sürülen metal şelatlama mekanizması

Aynı şekilde L-Adrenalin ile ilgili çalışmaya bakıldığında bir L-Adrenalin molekülünün amin grubu ile aynı molekülün OH grubunun bir ferröz iyonu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ile bağlanarak L-Adrenalin- $\text{Fe}^{2+}$  kompleksi oluşturduğu gözlenmektedir (Gülçin 2009).

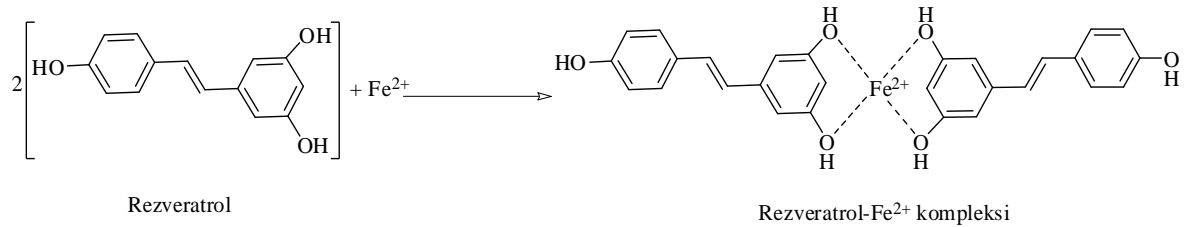






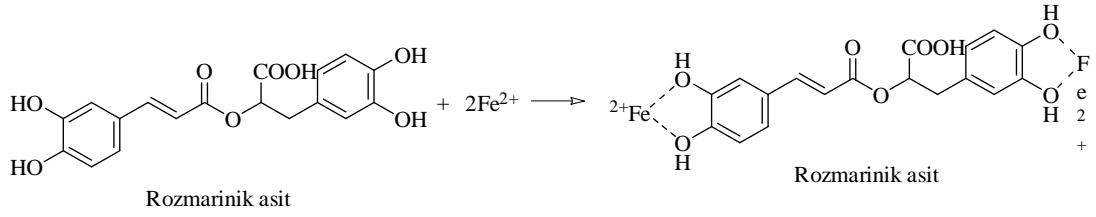
**Şekil 5.14.** Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile bağlanarak kurkumin- $Fe^{2+}$  kompleksi oluşması

Son yıllarda yapılan başka bir çalışmada da üzüm ve üzüm ürünlerinde oldukça fazla miktarda bulunan trifenolik bir bileşik olan rezveratrolün ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi için mümkün olan mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır (Gülçin 2009b). İki rezveratrol molekülünün ihtiva ettiği her iki difenolik aromatik halkalar arasında bir adet ferröz iyonunun ( $Fe^{2+}$ ) şelatladığı gözlenmiştir.



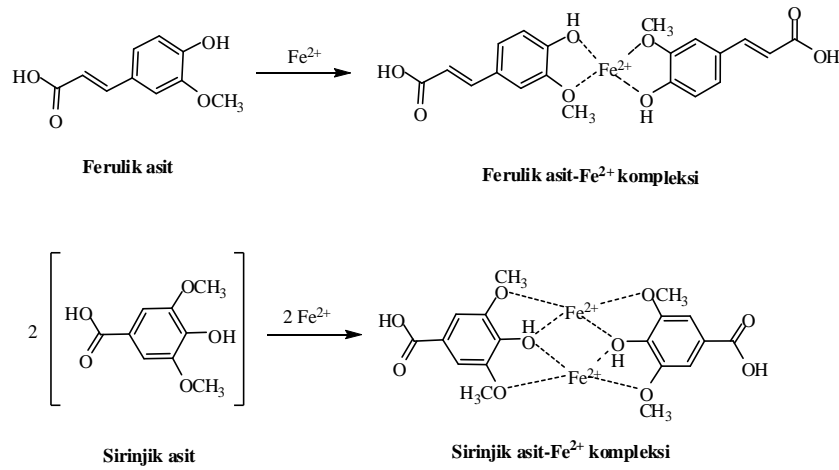
**Şekil 5.15.** İki molekül rezveratrolün iki adet ferröz iyonu ( $Fe^{2+}$ ) ile bağlanarak Resveratrol- $Fe^{2+}$  kompleksi oluşması

Metal şelatlama ile ilgili verilen bilgiler değerlendirildiğinde çalışmamız kapsamında metal şelatlama özellikleri incelenen rozmarinik asitin metal şelatlama kapasitesi ile ilgili olarak muhtemel bağlanma modeli Şekil 5.16'da gösterilmiştir. Rozmarinik asitin metal şelatlama kapasitesi kurkuminin karakteristik metal şelatlama kapasitesine benzediği görülmektedir.



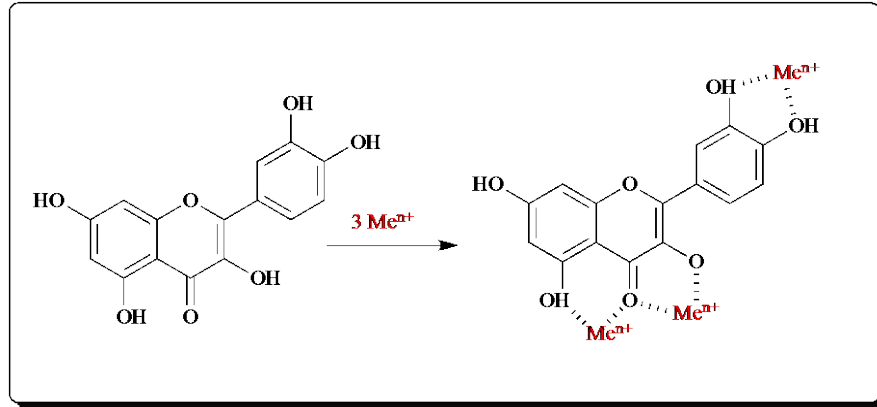
**Şekil 5.16.** Rozmarinik asitin ferröz iyonu (Fe<sup>2+</sup>) ile oluşturduğu muhtemel kompleks

Ferulik asit ve sirinjik asitlerin de benzer mekanizmalar ile metal iyonlarını bağladığı bildirilmiştir (Öztürk Sarıkaya 2009). Diğer fenolik asitlerin de benzer mekanizmalar ile metal şelatladıkları tahmin edilmektedir.



**Şekil 5.17.** Sirinjik asit ve ferulik asitin ferröz iyonu (Fe<sup>2+</sup>) ile bağlanarak kompleks oluşturmaları

Daha önce bahsedilen fenolik bileşiklerde olduğu gibi Şekil 5.18’de görüldüğü gibi bir flavonoit molekülü toplam üç metal iyonunu bağlayarak kompleks oluşturabilir.



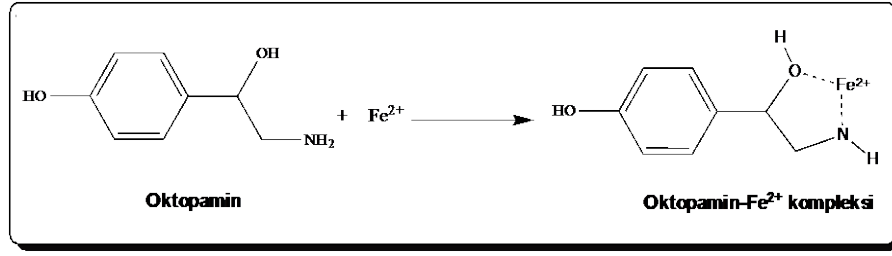
**Şekil 5.18.** Bir flavonoit molekülünün metal iyonlarını iyonları ( $Me^{n+}$ ) ile bağlanarak kompleks oluşturması

Çalışmada kullanılan oktopaminin metal şelatlama aktivitesinin  $IC_{50}$  değerleri ile standart antioksidanların  $IC_{50}$  değerleri karşılaştırıldığında ise oktopamin için 10,44  $\mu g/ml$  iken (Çizelge 5.2) bu değerler  $\alpha$ -Tokoferol ve trolox için sırasıyla 13,75 ve 12,70  $\mu g/ml$  olarak bulunmuştur. Oktopamin kullanılan ver iki standarda ( $\alpha$ -Tokoferol ve trolox) göre nispeten daha düşük  $IC_{50}$  değerine sahip olduğu gözlemlendi.

**Çizelge 5.2.** Oktopamin ve standart antioksidanlara ait DPPH $\cdot$ , ABTS $^{+\cdot}$ , DMPD $^{+\cdot}$ ,  $O_2^{\cdot-}$  giderme ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili  $IC_{50}$  ( $\mu g/ml$ ) değerleri

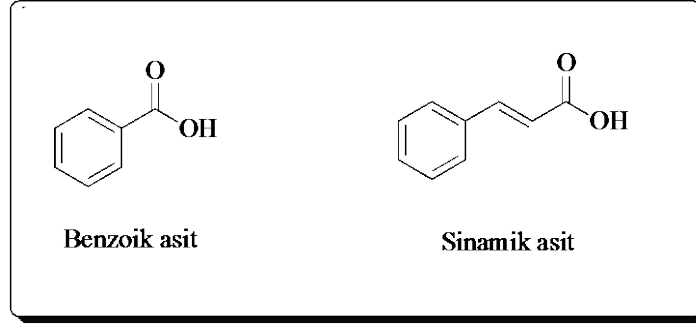
Antioksidanlar	$Fe^{2+}$ şelatlama	$O_2^{\cdot-}$ giderme	DPPH $\cdot$ giderme	ABTS $^{+\cdot}$ giderme	DMPD $^{+\cdot}$ giderme
$\alpha$ -Tokoferol	13,75	25,66	7,7	2,82	-
Troloks	12,70	43,30	19,8	6,79	69,30
Oktopamin	10,44	13,86	138,6	22,35	57,75

Oktopamini muhtemel metal şelatlama mekanizması Şekil 5.19’da görüldüğü gibi oktopaminde bulunan fenolik halkaya bağlı para pozisyonundaki hidroksil gurubu (-OH) ile amin gurubu (-NH $_2$ ) arasında bir demir iyonu bağlanarak kompleks oluşur.



**Şekil 5.19.** Bir oktopamin molekülünün bir demir iyonunu ( $\text{Fe}^{2+}$ ) muhtemel bağlama mekanizması

Fenolik bileşiklerin ve onların da türevlerinin antioksidan kapasiteleri aromatik halkaya bağlı hidrpkxil gurubunun (-OH) sayısına, grubunun pozisyonuna, bu gurubun karşılıklı bağlandığı gruba ve sübstüentın de tipine bağlıdır (Rice-Evans *et al.* 1996; Gülçin 2012) bağlı olduğu bilinmektedir. Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Hidroksisinamik asit ve türevlerinin hidroksibenzoik asit ve türevlerinden daha kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip oldukları da bilinmektedir. Hidroksisinamik asit ve türevlerinde bulunan  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$  gurubu hidroksibenzoik asit ve türevlerinde bulunan  $-\text{COOH}$  gurubundan daha fazla antioksidan aktivite sağlar (Cuppett *et al.* 1997; Gülçin 2012). Fenol omurgasında bulunan farklı sübstitüe gurupların varlığı onların antioksidan kapasitelerini özellikle de hidrojen verme kapasitelerini modüle eder. Genelde sübstitüe olmayan fenol, hidrojen verici olarak daha inaktiftir. Diğer taraftan, antioksidan aktivite açısından mono fenoller, difenollere göre daha az etkilidirler. *orto-* veya *para-* pozisyonunda hidroksil grubu gibi elektron verici bir gurubun varlığı fenol antioksidan molekülünün antioksidan aktivitesini artırır (Pokorny 1988; Chimi *et al.* 1991). Ayrıca, fenolik halkada aromatik asit, ester veya lakton gibi karbonil bir grubun varlığında antioksidan aktiviteyi artırır. Bir molekülün antioksidan aktivitesi karbonil gurubu hlkadan ayrıldığında da artar. Bundan dolayı, sinamik asit benzoik asitten daha etkili antioksidan aktiviteye sahiptir.



**Şekil 5.20.** Benzoik asit ve sinamik asidin formülü

Fenolik halkada bulunan metoksil grupları gibi sterik engel teşkil eden bir komşu inert grup tarafından fenolik antioksidan aktivitesini artırır (Dziedzic and Hudson 1984; Göçer and Gülçin 2011).

Daha önce yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin hidroksilasyon derecesi ve konumu antioksidan aktiviteyi belirleyen temel faktörler olduğu bildirilmiştir (Dziedzic and Hudson 1984; Chen and Ho 1997). Birçok fenolik bileşiğin antioksidan aktivitesi ile yapısı arasındaki ilişki daha önceden belirlenmiştir (Chen and Ho 1997; Gülçin 2006b; Göçer and Gülçin 2011). Monofenollerin difenol ve polifenollere göre daha az antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan aktivite-yapı çalışmalarında L-Dopa'nın tirozinden daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Gülçin 2007). Bu çalışma antioksidan aktivitenin fenolik hidroksil gurupları tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Monofenollerin oksidasyon engellemesi bir veya iki metoksi grubunun varlığında önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca iki fenolik asidin birleşmesiyle elde edilen ürünün monomerlerden daha etkili olduğu gözlenmiştir. 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).

Butün bu çalışmaların ışığında Oktopamin molekülünün çalışılan metotlarla antioksidan aktivitesi değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan  $\alpha$ -tokoferol ve trolokstan daha düşük antioksidan aktivite sergilemesi daha net anlaşılmaktadır. Oktopamin

molekülünün monofenolik yapıda olması, bir inert komşu grubu bulundurmaması, hidroksil (-OH) ve amin guruplarının (-NH<sub>2</sub>) fenolik halkaya bağlı para pozisyonunda bağlanmış olması daha az antioksidan aktivite sergilemesinde etkili olabilir.

Karbonik anhidraz enziminin hidratasyon reaksiyonları için turnover sayısı ( $k_{cat}$ ) 400,000-600,000 s<sup>-1</sup> (Lindskog and Coleman, 1973; Roy, 2010) arasındadır. Yapılan kristal yapı analizleri bazı moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanarak reaksiyon ortamında enzimin aktif bölgesinde bazı konformasyonel değişikliklere sebep olarak, proton transfer prosesini kolaylaştırdığı ve bu şekilde enzimi aktive ettiği bildirilmiştir (Supuran *et al.* 2004; Hassan *et al.* 2013). CA izoenzimlerinin katalitik bölgelerinin yapısal analizleri, Thr-199 rezidüsünün doğusundaki ana zincir CO<sub>2</sub> molekülünü polarize ettiği göstermiştir. OH<sup>-</sup> bağlı Zn<sup>2+</sup>'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> oluşturmak üzere CO<sub>2</sub>'e saldırır ve bir su molekülü oluşan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ile yer değiştirir (Mikulski and Silverman, 2010). Sudan ayrılan proton üç basamakta His-64'e aktarılır (Shimahara *et al.* 2007). Böylece enzim bir sonraki katalitik döngü için hazır olmuş olur (Maupin *et al.* 2009). CA enzimi suya proton transfer oranından daha yüksek bir turnover sayısına sahiptir (Lindskog and Coleman 1973; 2000). Bu yüksek oran çözücü sistemlerine ani proton transferinden dolayı daha hızlıdır.

Lokal immün cevaplara aracılık eden histamin azot içeren bir organik bileşiktir ve bir nörotransmitter olarak görev yapar. Histamin, proton üretim proseslerinde aktif olarak rol oynayan CA'yı aktivite ettiği gözlemlenmiştir. CA aktivatörleri enzimin aktif bölgesinin girişine bağlanır. Aktif bölge ile çözücü sistemleri arasında proton transfer işlemini kolaylaştırır. Histidin CA I, CA VA ve CA VII izoenzimlerinin güçlü aktivatörleri iken, CA XIV için normal, CA II ve CA IV izoenzimleri için zayıf aktivatördür (Supuran *et al.* 2004; Temperini *et al.* 2006).

Ayrıca fenilalanin CA I, CA II ve CA XIV için güçlü bir aktivatör iken, CA VA ve CA VII için zayıf aktivatör, CA IV için ise oldukça etkisizdir (Çoban *et al.* 2009). Kan ve beyinde fenilalanin konsantrasyonu oldukça değişkendir ve 30-73 µM arasında değişir. Bu dokularda bazı beyin CA enzim aktiviteleri, aktivatörlerin konsantrasyonları

tarafından kuvvetli bir şekilde aktivatör seviyeleri tarafından değişikliğe uğrar. Sildenafil sitrat'ın CA I, CA VA ve CA VI içeren tüm CA izoenzimleri için bir potansiyel aktivatör olduğu belirtilmiştir (Çoban *et al.*2009). Dahası, Sildenafil sitrat'ın CA III, CA IV ve CA VA izoenzimlerini 13,4-16,8 µM aralığında, CA II, CA IX, CA XIII ve CA XIV izoenzimlerini ise 27,5–34,0 µM aralığında ve son olarak CA VII ve CA XII izoenzimlerini ise 72,9–73,0 µM aralığı gibi dar aralıklarda aktive ettiği bildirilmiştir (Dessirier *et al.* 2000).

Benzer şekilde bir seri amin ve amino asidin de CA izoenzimleri için aktivatör olarak etki ettiği bilinmektedir. L-Histidin, L-Triptofan ve dopamin, salgısal CA VI için zayıf aktivasyon etkisi gösterirken, L-Fenilalanin, D-DOPA, L-Tirozin, 4-amino-L-Fenilalanin ve histamin amino asitleri aynı enzimler için bire mükemmel aktivatör olarak rol oynarlar (Dessirier *et al.* 2000).

Literatürde belirtilen CA aktivatörlerine bakıldığında oktopamin molekülünün hCA I ve hCA II izoenzimlerini aktive etmesi net bir şekilde anlaşılmaktadır. Oktopamin yan zincirde para pozisyonunda bir amin grubu içermektedir. Amin grubu içeren amin ve amino asitler gibi hCA I ve hCA II izoenzimlerini aktive etmesi gayet normaldir.

CA'nin fizyolojik ilişkilerinden dolayı, aktivasyonu ilaç geliştirme ve dizaynında potansiyel bir hedef olabilir (Supuran *et al.* 2004). CA aktivatörleri yaşlanma ve diğer hastalıkların yanısıra Alzheimer hastalığı tedavisi için konseptik yeni yaklaşımlar sunan sinaptik etkiyi artırmak için kullanışlı birer türev olarak dizayn edilebilirler (Hassan *et al.* 2013).

## 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.
- Adamo, S.A., Baker, J.L., 2011. Conserved features of chronic stress across phyla: The effects of long-term stress on behavior and the concentration of the neurohormone octopamine in the cricket, (*Gryllus texensis*). *Hormones and Behavior* 60 478–483.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *chemico-biological. Interaction*, 174, 27-37.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T. (2013). Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, DOI:10.1016/j.bmc.2013.01.019.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, Kuzucular Ofset, Konya, s106-111.
- Alho, H., Leinonen, J., 1999. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Method Enzymol* 299:3–15
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915–7922
- 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.
- 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.
- 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.
- Arslan, N., 2013. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezzit (*Merlangius merlangus euxinus*) balıklarının solungaç dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., A new Method for the purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26:163-166,1996.



- Atasaver, A., Özdemir, H., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136(2), 864-870.
- Axelrod, J., Saavedra, J.M., 1977. Octopamine. *Nature*, 265,501-504.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products. Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Beckman, J.S., 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9:836–844.
- 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.
- 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.
- 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.
- Braun, G., Bicker, G., 1992. Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *JNeurophysiol.* 67, 588–598.
- Burrell, B.D., Smith, B.H., 1995. Modulation of the honeybee (*Apis mellifera*) sting response by octopamine. *J. Insect Physiol.* 41, 671–680.
- 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 Rersearch International*, 51(1), 66-74
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1981. Autoxidation of biological molecules. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J Am Chem Soc* 103:6472–6477.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Cadenas, E., Packer, L., 1996. Handbook of antioxidants. Marcel and Dekker Inc, 23-25, New York.
- Chen JH, Ho CT 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45:2374–2378
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 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.
- Çoban T.A., Beydemir, S., Gücin, İ., Ekinci, D., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., 2009. Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I–XIV. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5791-5795.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 266-270.

- 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. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 324-325
- Davies, K., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-31.
- Davies, K., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61, 1-31.
- Dawes, H.W., Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwi fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2398-2403.
- Dessirier, J.M., Simons, C.T., Carstens, M.I., O'Mahony, M., Carstens, E. 2000. The Oral Sensation of Carbonated Water: Cross-desensitization by Capsaicin and Potentiation by Amiloride *Chem. Senses*, 25, 277.
- 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. *Brit J Nut* 80:77-112
- 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.
- Dudai, Y., Buxbaum, J., Corfas, G., Ofarim, M., 1987. Formamidines interact with *Drosophila* octopamine receptors, alter the flies' behavior and reduce learning ability. *J Comp Physiol A* 161:739-746.
- Duh, P.D., 1998. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *JAm Oil Chem Soc* 75:455-465.
- Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.f., 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* 14:45-51.
- Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H., 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405:903 904
- Elmastas, M., Türkecul, İ. Öztürk, L. Gülçin, İ., Işıldak Ö. Aboul-Enein, H.Y., 2006. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- Elmastas, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoglu, K., Aboul-Enein, H.Y., 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 258-266.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148.
- 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.
- Erspamer, V., Boretti, G., 1951. Identification and characterization by paper chromatography of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of Octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn* 88:296–332.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 13:341–390.
- Ewald, C., Fjellkner-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.
- Farooqui, T., 2007. *Octopamine-Mediated Neuromodulation of Insect Senses*. Springer Science Business Media, LLC.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23, 239-257.
- Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol* 58:61–97.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Ganesan, K., Kumar, K.S., Rao, P.V.S., 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed. *Innov Food Sci Emerg* 12:73–78
- Giebultowicz, J.M., Raina, A.K., Uebel, E.C., 1990. Mated-like behavior in senescent virgin females of gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* 36, 495–498.
- 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.
- Giovanni, A., Gianpietro, N., Gilberto, P., Andrea, B., Davide, C., Raffaella, F., Alberta, L., 2009. Trace amine metabolism in Parkinson's disease: Low circulating levels of octopamine in early disease stages. *Neuroscience Letters* 469 348–351
- 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.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23, 85-89.
- Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 539-46.
- Gülçin İ., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 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., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. *Chemico-Biological Interaction*, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 287-293.
- Gülçin, İ., Beydemir, S. 2013. Fenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, in press.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004e. *In vitro* antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., 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., 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*, 10, 3109
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C.KOCH var. *joannis*. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004c. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy:  $\alpha$ -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-( $\beta$ -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., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003a. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., 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.
- Gutierrez, F., Albi M.A., Palma R., Rios J.L., Olias J.M., 1989. Bitter taste of virgin olive oil; correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis. *Journal of Food Science*, 54, 68-70.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 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.
- Halliwell, B., 1997. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nut* 16:33–50.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Oxford, pp 543.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Han, H., 2012 Altın çilek (*physalis peruviana*) ve keten (*linum usitatissimum*) tohumunun antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Harborne, J.B., 1986. In: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., Alan, R.,(eds) *Plant flavonoids in biology and medicine*. Liss, New York, pp 15–24.
- Hassan, Md. I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad. F., Sly, W.S., 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.044.

- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, P., Hänninen, M., Hämäläinen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392, 83-92.
- Hou, Y.C., Janczuk, A., Wang, P.G., 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des* 5:417–441.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Hudson, J.F., 1990. *Food antioxidants*. Elsevier Applied Science, London.
- 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.
- İşbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne.
- Kakimoto, Y., Armstrong, M.D., 1961. On the identification of octopamine in mammals from the fels. Research Institute, Yellow Springs, Ohio. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 237, No. 2.
- Katiyar, S.K., Mukhtar, H., 1997. Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 27, 59-67.
- Kazazica, S.P., Butkovic, V., Srazica, D., Klasinc, L., 2006. Gas-phase ligation of Fe<sup>+</sup> and Cu<sup>+</sup> ions with some flavonoids. *J Agric Food Chem* 54:8391–8396.
- 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., 2009d. On the *in vitro* antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 395–405.
- Küfrevioğlu, Ö.İ., Keha, E., 2004. *Biyokimya. Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Laemmler, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685
- Lai, L.S., Chou, S.T., Chao, W.W., 2001. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens Hemsl*) leaf gum. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49, 963–968.
- Leppilampi, M., 2006. “Functional And Immunohistological Studies On Cancer Associated Carbonic Anhydrase IX.” Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University Of Oulu.
- Lesburg, C.A., Christianson, D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies oengineered hydrogen-bond networks in a protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117 (26) 6838-6844.
- Lindskog, S., Coleman, J.E. 1973. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*;70, 2505-2508.
- Lindskog, S.; Silverman, D.N. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. *EXS* 2000, 175
- Livingstone, M., Harris-Warrick, R., Kravitz E., 2012. Serotonin and octopamine produce opposite oostures in lobsters. *Science*, 208, 76-79.

- Long, T.F., Edgecomb, R.S., Murdock, L.L., 1986. Effects of substituted phenylethylamines on blowfly feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol. C* 201–209.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric* 86:2046–2056.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126-130.
- Maren, TH., 1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiological Reviews*, 47, 595-781.
- Maupin, C.M.; McKenna, R.; Silverman, D.N.; Voth, G.A. 2009. Elucidation of the Proton Transport Mechanism in Human Carbonic Anhydrase II, *J.Am. Chem. Soc.*, 131, 7598
- 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.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Mikulski, R.L.; Silverman, D.N. 2010. Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase, *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 422-426.
- Miller, D.D., 1996. *Mineral. Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, pp. 618-649.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual source. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A, Rodwell, V.W., 1996. *Harper'ın Biyokimyası* 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgönen T.), Barış Kitabevi, İstanbul
- Nar, M., 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of ısgın (*Rheum ribes L.*). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047- 3055.
- 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. *J Amer Oil Chem Soc* 72:1565–1570
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Ed. 2002. *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J. Nut.* 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.
- Packer, L., 1996. Nitric oxide. Part A: sources and detection of NO; NO synthase. *Method Enzymol* 268:331–340.
- 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.
- Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J F.; Ed.; Elsevier; Amsterdam, 17-192
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reaven, P.D., Witztum, J.L., 1996. Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Ann Rev Nut* 16:51–71.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 81-86.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 20:933–956
- Rimm, E.B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M., Willett, W., 1996a. Vegetable, fruits, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *JAMA-J Am Med Assoc* 275:447–451.
- Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J, Willett, W., 1996b. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 125:384–389.
- Roeder, T., Seifert, M., Kähler, C., Gewecke, M., 2003. Tyramine and Octopamine: Antagonistic Modulators of Behavior and Metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54:1–13
- Roy, A., Taraphder, S. Role of protein motions on proton transfer pathways in human carbonic anhydrase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 2010, 352-361.
- 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.
- Salomon, M., Malka, O., Vander Meer, K.R., Hefetz, A., 2011. The role of tyramine and octopamine in the regulation of reproduction in queenless worker honeybees. *Naturwissenschaften* (2012) 99:123–131.
- Scandalios, J.G., 1994. Regulation and properties of plant catalases, in: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–316.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.



- 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.
- Seven, A., Candan, G. 1996. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Technology*, 13, 281-297
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nut* 32:67–103.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Sherwin, E.R., 1972. Antioxidants for food fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 49:468-472.
- Shimahara, H.; Yoshida, T.; Shibata, Y.; Shimizu, M.; Kyogoku, Y.; Sakiyama, F.; Nakazawa, T.; Tate, S.; Ohki, S. Y.; Kato, T.; Moriyama, H.; Kishida, K.; Tano, Y.; Ohkubo, T.; Kobayashi, Y. J. 2007. Tautomerism of Histidine 64 Associated with Proton Transfer in Catalysis of Carbonic Anhydrase *Biol. Chem.* 282, 9646.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91:31–39.
- Simic, M.G., 1981. Free radical mechanism of autoxidation process. *J Chem Educ* 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.
- Sinakevitch, I., Strausfeld, N.J. 2006. Comparison of Octopamine-Like Immunoreactivity in the Brains of the Fruit Fly and Blow Fly *The journal of comparative neurology*, 494:460–475.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., 2007. Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 28:R41–R55.
- Stahl, W., Sies, H., 1993. Physical quenching of singlet-oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 691:10–19.
- Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Asp Med* 24:345–351.
- 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.; Vullo, D.; Manole, G.; Casini, A.; Scozzafava, A. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2004, 2, 51.
- Supuran, C. T.; Vullo, D.; Manole, G.; Casini, A.; Scozzafava, A. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2004, 2, 49.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.
- Tanizawa, H., Ohkawa, Y., Takino, Y., Ueno, A., Kageyama, T., Hara, S., 1992. Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidant activities of citrus fruits. *Chem Pharm Bull* 40:1940–1942.
- Temperini, C.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T. 2006. Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-Phenylalanine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isozyme II:

- Stereospecific Recognition within the Active Site of an Enzyme and Its consequences for the Drug Design. *Chemistry*, 12,7057
- Thevis, M., Koch, A., Gerd, S., Schänzer, W., 2011. Analysis of octopamine in human doping control samples. *Biomed. Chromatogr.* 2012; 26: 610–615
- Uçar, E.Ö., Karagöz, A., Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album ssp. album*. *Fitoterapia*, 77, 556-560.
- Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 46:4113–4117.
- 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.
- Wagener-Hulme, C., Kuehn, J.C., Schulz, D.J., Robinson, G.E., 1999. Biogenic amines and division of labor in honeybee colonies. *J CompPhysiol A* 184:471–479. doi:10.1007/s003590050347
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, DL., 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62, 294-296.
- Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2959-2962.
- Whitaker, J. R., Dekker, E.d., *Food Sciences*,: New York, 1994, pp 565-578.
- Wichi, H.P., 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol* 26:717–723.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wood, L.G., Gibson, P.G., Garg, M.L., 2006. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. *Journal of Sciences of Food and Agriculture*, 86, 2057-2066.
- Yazıcı, C., Köse, K., 2004. “Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü.” *Erciyes Üniv Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2), 56-65
- 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*, 2001, 49, 4083-4089.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. *Food Chemistry* 64, 555-559.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Muş'un Bulanık ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Bulanık'ta tamamladı. 2006 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya bölümünden 2010 yılında dereceyle mezun oldu. 2010-2011 Eğitim-öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.