



**BAZI FLAVONLARIN ANTİOKSİDAN  
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN  
KARBONİK ANHİDRAZ I ve II İZOENZİMLERİ İLE  
ASETİLKOLİNESTERAZ, BÜTİRİLKOLİNESTERAZ  
ve LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE  
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Pınar KALIN**

**Doktora Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN**

**2017**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BAZI FLAVONLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I ve II  
İZOENZİMLERİ İLE ASETİLKOLİNESTERAZ,  
BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ve LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMLERİ  
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Pınar KALIN**

**KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM  
2017**

**Her hakkı saklıdır**



**T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TEZ ONAY FORMU**

**BAZI FLAVONLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I ve II İZOENZİMLERİ ile  
ASETİLKOLİNESTERAZ, BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ve LAKTOPEROKSİDAZ  
ENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Pınar KALIN tarafından hazırlanan bu çalışma 22/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/~~oy çokluğu~~ (...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ercan BURSAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28/12/2017 tarih ve 51/.../29 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Cavit KAZAZ  
Enstitü Müdürü**

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

## ÖZET

Doktora Tezi

### **BAZI FLAVONLARIN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I ve II İZOENZİMLERİ İLE ASETİLKOLİNESTERAZ, BÜTİRİLKOLİNESTERAZ ve LAKTOPEROKSİDAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Pınar KALIN

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Tez çalışması kapsamında 7-hidroksiflavon, 5-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, 4'-5-dihidroksiflavon, 5,7-dihidroksiflavon, 3',4'-dihidroksiflavonun insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri (hCA I ve II), asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve laktoperoksidaz enzimleri üzerine kinetik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla her bir enzim üzerine flavonların inhibisyon etkileri literatürdeki yöntemler kullanılarak araştırıldı. Her bir madde ve her bir enzim için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Çalışmamızın ikinci basamağında ise bu flavonların antioksidan ve antiradikal aktivitelerini belirlemek amacıyla  $Fe^{3+}$  (ferrik iyonu)- $Fe^{2+}$  (ferröz iyonu) indirgeyebilme aktivitesi, FRAP yöntemine göre indirgeme aktivitesi, kuprak metodu yöntemine göre kuprik iyonları ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$ ) serbest radikal giderme yöntemi, DMPD $^{++}$  radikal giderme yöntemi, ABTS $^{++}$  radikal giderme ve süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) giderme yöntemleri, ferrozin reaktifi kullanarak ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktiviteleri ve ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan tayin yöntemlerii kullanılmıştır. Tez çalışmaları esnasında BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks maddeleri standart olarak kullanıldı ve ilgili kıyaslamalar yapıldı. Sonuç olarak flavonların troloksa eşdeğer karakter gösterdiği gözlemlendi.

**2017, 153 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, Flavon, Karbonik anhidraz; Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, Laktoperoksidaz

## ABSTRACT

PhD Thesis

### DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITIES OF SOME FLAVONES AND INVESTIGATION OF THEIR INHIBITION EFFECTS ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES, ACETYLCHOLINESTERASE, BUTYRYLCHOLINESTERASE AND LACTOPEROXIDASE ENZYMES

Pınar KALIN

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Within the scope of the thesis study, kinetic studies of 7-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, 4'-5-dihydroxyflavone, 5,7-dihydroxyflavone on the human erythrocyte I and II isoenzymes (hCA I ve II), acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lactoperoxidase enzymes were performed. For this purpose, inhibition effects of flavones on each enzyme were investigated by using the methods given in literature.  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for each flavone against enzymes were calculated separately. In the second step of our study, in order to determine the antiradical and antioxidant activities of these flavones,  $Fe^{3+}$  (ferric ion) -  $Fe^{2+}$  (ferrous ion) reducing activity, FRAP reducing activity, cupric ions ( $Cu^{2+}$ ) reducing activity, DPPH free radical scavenging method, ABTS radical scavenging method,  $DMPD^{+}$  radical scavenging and superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) scavenging methods, ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ) chelating activities using ferrozine reagents method are used. and in the last step, total antioxidant determination method was used according to ferric thiocyanate method. BHA,  $\alpha$ -Tocopherol, Trolox, BHT were used as standard antioxidants during the studies and related comparisons were made. As a conclusion, it was observed that the flavones had similar activities to the Trolox.

**2017, 153 pages**

**Keywords:** Antioxidant activity; Flavones; Carbonic anhydrase; Acetylcholinesterase; Butyrylcholinesterase, Lactoperoxidase

## TEŞEKKÜR

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

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

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin ve bölümümüzün bütün imkânlarını esirgemeyen dekanımız Sayın Prof. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e ve Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nihat AKBULUT'a, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında her türlü yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sayın Yeliz DEMİR, Sayın Dr. Parham TASLİMİ, Sayın Serpil GERNİ başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Çalışmalarımda beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme, yoldaşım, hayat arkadaşım canım eşim Arş. Gör. Ramazan KALIN'a,

Başına hangi sıfatı getirsem eksik kalacak bana tarifsiz annelik duygusunu tattıran canım oğlum Ali Hamza'ma teşekkürü bir borç bilirim.

**Pınar KALIN**

**Aralık 2017**

## İÇİNDEKİLER

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                             | i         |
| ABSTRACT.....                                         | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                         | iii       |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                  | vii       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                  | viii      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                               | xv        |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                  | <b>1</b>  |
| 1.1. Enzimler.....                                    | 1         |
| 1.1.1. Karbonik anhidraz (hCA) .....                  | 2         |
| 1.1.2. Asetilkolinesteraz (AChE).....                 | 8         |
| 1.1.3. Bütilkolinesteraz (BChE) .....                 | 12        |
| 1.1.4. Laktoperoksidaz (LPO).....                     | 14        |
| 1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....        | 16        |
| 1.2.1. Serbest radikaller ve oksidatif stress.....    | 16        |
| 1.2.2. Serbest radikallerin lipitlere etkileri.....   | 22        |
| 1.2.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri..... | 23        |
| 1.2.4. Antioksidanlar.....                            | 24        |
| 1.2.5. Natural fenolik antioksidanlar.....            | 28        |
| 1.2.6. Sinerjik antioksidanlar .....                  | 31        |
| 1.2.7. Şelatlayıcı ajanlar.....                       | 31        |
| 1.2.8. Oksijen/ROS temizleyici ajanlar.....           | 32        |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>                       | <b>34</b> |
| 2.1. Çalışmanın Amacı.....                            | 43        |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>                    | <b>46</b> |
| 3.1. Materyal .....                                   | 46        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....             | 46        |
| 3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar.....              | 46        |
| 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....     | 47        |
| 3.2. Yöntemler .....                                  | 54        |

|                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1. hCA I-II ve LPO enzimleri saflaştırma çalışmaları .....                                                                        | 54        |
| 3.2.1.a. hCA enzim hemolizatinin hazırlanması .....                                                                                   | 54        |
| 3.2.1.b. LPO enzim homojenatının hazırlanması .....                                                                                   | 54        |
| 3.2.2. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanması .....                                                         | 55        |
| 3.2.2.a. CNBr aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması .....                                                                | 55        |
| 3.2.2.b. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye sülfanilamid kenetlendirilmesi ..                                                  | 55        |
| 3.2.3. Afinite jelinin kolona paketlenmesi .....                                                                                      | 56        |
| 3.2.4. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu .....                                                                              | 56        |
| 3.2.4.a. hCA enzimi için numune tatbiki ve elüsyonu .....                                                                             | 56        |
| 3.2.4.b. LPO enzimi için numune tatbiki ve elüsyonu .....                                                                             | 56        |
| 3.2.5. Enzimlerin aktivite tayin yöntemleri .....                                                                                     | 57        |
| 3.2.5.a. hCA enzimi için esterase aktivitesi .....                                                                                    | 57        |
| 3.2.5.b. AChE enzim aktivitesi.....                                                                                                   | 57        |
| 3.2.5.c. BChE enzim aktivitesi .....                                                                                                  | 58        |
| 3.2.5.d. LPO enzim aktivitesi .....                                                                                                   | 59        |
| 3.2.6. hCA I-II izoenzimleri, LPO, AChE, BChE enzimleri üzerine bazı flavon<br>türevlerinin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi ..... | 59        |
| 3.2.7. Antioksidan çalışmaları .....                                                                                                  | 60        |
| 3.2.7.a. $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi.....                                                                              | 60        |
| 3.2.7.b. $Cu^{2+}$ - $Cu^{+}$ indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu).....                                                               | 60        |
| 3.2.7.c. FRAP indirgeme kapasitesi .....                                                                                              | 60        |
| 3.2.7.d. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme aktivitesi .....                                               | 61        |
| 3.2.7.e. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali<br>giderme aktivitesi .....                            | 61        |
| 3.2.7.f. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme<br>aktivitesi .....                                       | 62        |
| 3.2.7.g. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ ) giderme aktivitesi.....                                                                | 62        |
| 3.2.7.h. Ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi.....                                                                      | 63        |
| 3.2.7.i. Total antioksidan aktivitesi .....                                                                                           | 63        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                                                   | <b>64</b> |
| 4.1. Enzimler Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmalarının Sonuçları.....                                                                | 64        |
| 4.1.1. hCA I izoenzimi için bulunan inhibisyon sonuçları .....                                                                        | 64        |

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.2. hCA II izoenzimi için bulunan inhibisyon sonuçları .....                     | 71         |
| 4.1.3. AChE için bulunan inhibisyon sonuçları .....                                 | 78         |
| 4.1.4. BChE için bulunan inhibisyon sonuçları .....                                 | 85         |
| 4.1.5. LPO için bulunan inhibisyon sonuçları.....                                   | 92         |
| 4.2. Antioksidan Kapasite Tayini Bulguları .....                                    | 99         |
| 4.2.1. $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$ iyonları indirgeme kapasitesi bulguları.....           | 99         |
| 4.2.2. $Cu^{2+}$ - $Cu^{+}$ indirgeme (Kuprak metodu) bulguları .....               | 99         |
| 4.2.3. FRAP yöntemi bulguları .....                                                 | 100        |
| 4.2.4. DPPH giderme kapasitesi bulguları .....                                      | 101        |
| 4.2.5. ABTS radikali süpürme kabiliyeti bulguları .....                             | 103        |
| 4.2.6. DMPD radikali süpürme kapasitesi bulguları .....                             | 105        |
| 4.2.7. Süperoksit radikali süpürme kapasitesi bulguları .....                       | 107        |
| 4.2.8. Ferröz iyonları ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi ile ilgili bulgular ..... | 108        |
| 4.2.9. Total antioksidan aktivite bulgular .....                                    | 109        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                   | <b>113</b> |
| KAYNAKLAR .....                                                                     | 137        |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                      | 154        |

## 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 |
| AChE               | Asetilkolinesteraz                                            |
| ACh                | Asetilkolin                                                   |
| BHA                | Bütillenmiş hidroksianisol                                    |
| BHT                | Bütillenmiş hidroksitoluen                                    |
| BChE               | Bütirilkolinesteraz                                           |
| 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                     |
| DTNB               | 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)                         |
| E.C.               | Enzim kod numarası                                            |
| hCA I              | İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi                           |
| hCA II             | İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi                          |
| I                  | İnhibitör                                                     |
| IC <sub>50</sub>   | Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu         |
| K <sub>i</sub>     | Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti                   |
| LOO <sup>•</sup>   | Lipit peroksit radikali                                       |
| LOOH               | Lipit hidroperoksit                                           |
| LPO                | Laktoperoksidaz                                               |
| MDA                | Malondialdehit                                                |
| NBT                | Nitroblue tetrazolium                                         |
| ROS                | Serbest oksijen radikali                                      |
| TCA                | Triklorasetik asit                                            |
| Tris               | Trihidroksimetil amino metan                                  |
| Troloks            | 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit       |
| V                  | Enzimatik reaksiyon hızı                                      |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Bir enzimin $\Delta S^\ddagger$ bariyerini azaltma yolları .....                                                                             | 1  |
| Şekil 1.2. hCA izoenzimlerinin X-ray görüntüsü .....                                                                                                    | 4  |
| Şekil 1.3. hCA'nın aktif bölgesi .....                                                                                                                  | 5  |
| Şekil 1.4. Gülçin ve ekibi tarafından çalışılan bir grup benzilsülfamid türevinin<br>sırasıyla hCA I ve II enzimlerine üst kenetlenme görüntüleri ..... | 8  |
| Şekil 1.5. AChE'nin biyolojik etkinliği .....                                                                                                           | 9  |
| Şekil 1.6. AChE'nin X-ray difraksiyonu .....                                                                                                            | 10 |
| Şekil 1.7. AChE'nin aktif bölgesi .....                                                                                                                 | 10 |
| Şekil 1.8. AChE'nin bağlanma bölgesinin şematik gösterimi .....                                                                                         | 11 |
| Şekil 1.9. BChE'nin 3 boyutlu kristal yapısı .....                                                                                                      | 12 |
| Şekil 1.10. Bütirilkolin esteraz için homolog rezidülerle gösterilen aktif bölge geçidi .                                                               | 12 |
| Şekil 1.11. Laktoperoksidazın yapısı ve aktif merkezi .....                                                                                             | 14 |
| Şekil 1.13. Ksantin oksidaz reaksiyonu .....                                                                                                            | 19 |
| Şekil 1.14. Katalaz'ın katalizlediği reaksiyon .....                                                                                                    | 19 |
| Şekil 1.15. Lipit peroksidasyon reaksiyonu .....                                                                                                        | 21 |
| Şekil 1.16. Fenolik antioksidanların reaksiyon mekanizması.....                                                                                         | 25 |
| Şekil 1.17. Fenolik bileşiklerin metal kompleksi.....                                                                                                   | 27 |
| Şekil 1.18. BHA, BHT, Trolox ve TBHQ açık formülleri .....                                                                                              | 28 |
| Şekil 1.19. Gallatların genel formülleri .....                                                                                                          | 28 |
| Şekil 1.20. $\alpha$ -Tokoferolün radikal giderme mekanizması.....                                                                                      | 30 |
| Şekil 1.21. $\beta$ -karotenin açık yapısı.....                                                                                                         | 31 |
| Şekil 1.22. EDTA'nın $Fe^{2+}$ ile metal şelatlama reaksiyonu .....                                                                                     | 32 |
| Şekil 4.1. hCA I enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda<br>çizilen Aktivite (%) - [3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği .....         | 64 |
| Şekil 4.2. hCA I enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen<br>Aktivite (%) - [6-Hidroksiflavon] grafiği.....                      | 65 |
| Şekil 4.3. hCA I enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen<br>Aktivite (%) - [7-Hidroksiflavon] grafiği.....                      | 65 |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.4.</b> hCA I enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[5-Hidroksiflavon] grafiği.....                | 66 |
| <b>Şekil 4.5.</b> hCA I enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği .....     | 66 |
| <b>Şekil 4.6.</b> hCA I enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği .....       | 67 |
| <b>Şekil 4.7.</b> hCA I enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                              | 68 |
| <b>Şekil 4.8.</b> hCA I enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                    | 68 |
| <b>Şekil 4.9.</b> hCA I enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                    | 69 |
| <b>Şekil 4.10.</b> hCA I enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                   | 69 |
| <b>Şekil 4.11.</b> hCA I enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                              | 70 |
| <b>Şekil 4.12.</b> hCA I enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 70 |
| <b>Şekil 4.13.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği ..... | 71 |
| <b>Şekil 4.14.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[6-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 72 |
| <b>Şekil 4.15.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[7-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 72 |
| <b>Şekil 4.16.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[5-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 73 |
| <b>Şekil 4.17.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği .....   | 73 |
| <b>Şekil 4.18.</b> hCA II enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)ate-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği.....      | 74 |
| <b>Şekil 4.19.</b> hCA II enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                            | 75 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.20.</b> hCA II enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                             | 75 |
| <b>Şekil 4.21.</b> hCA II enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                             | 76 |
| <b>Şekil 4.22.</b> hCA II enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                             | 76 |
| <b>Şekil 4.23.</b> hCA II enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini<br>gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                        | 77 |
| <b>Şekil 4.24.</b> hCA II enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini<br>gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                         | 77 |
| <b>Şekil 4.25.</b> AChE enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda<br>çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği ..... | 78 |
| <b>Şekil 4.26.</b> AChE enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen<br>Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 79 |
| <b>Şekil 4.27.</b> AChE enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen<br>Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 79 |
| <b>Şekil 4.28.</b> AChE enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen<br>Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 80 |
| <b>Şekil 4.29.</b> AChE enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda<br>çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği .....   | 80 |
| <b>Şekil 4.30.</b> AChE enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda<br>çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği.....      | 81 |
| <b>Şekil 4.31.</b> AChE enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini<br>gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                         | 82 |
| <b>Şekil 4.32.</b> AChE enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 82 |
| <b>Şekil 4.33.</b> AChE enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 83 |
| <b>Şekil 4.34.</b> AChE enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren<br>Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 83 |
| <b>Şekil 4.35.</b> AChE enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini<br>gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                          | 84 |

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.36.</b> AChE enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                           | 84 |
| <b>Şekil 4.37.</b> BChE enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği ..... | 85 |
| <b>Şekil 4.38.</b> BChE enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 86 |
| <b>Şekil 4.39.</b> BChE enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 86 |
| <b>Şekil 4.40.</b> BChE enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği.....              | 87 |
| <b>Şekil 4.41.</b> BChE enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği .....   | 87 |
| <b>Şekil 4.42.</b> BChE enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği.....      | 88 |
| <b>Şekil 4.43.</b> BChE enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                         | 89 |
| <b>Şekil 4.44.</b> BChE enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 89 |
| <b>Şekil 4.45.</b> BChE enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 90 |
| <b>Şekil 4.46.</b> BChE enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                               | 90 |
| <b>Şekil 4.47.</b> BChE enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                          | 91 |
| <b>Şekil 4.48.</b> BChE enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                           | 91 |
| <b>Şekil 4.49.</b> LPO enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği .....  | 92 |
| <b>Şekil 4.50.</b> LPO enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği.....               | 93 |
| <b>Şekil 4.51.</b> LPO enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği.....               | 93 |

|                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.52.</b> LPO enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği.....                                                                                                | 94  |
| <b>Şekil 4.53.</b> LPO enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği.....                                                                                      | 94  |
| <b>Şekil 4.54.</b> LPO enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği .....                                                                                       | 95  |
| <b>Şekil 4.55.</b> LPO enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                           | 96  |
| <b>Şekil 4.56.</b> LPO enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                                 | 96  |
| <b>Şekil 4.57.</b> LPO enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                                 | 97  |
| <b>Şekil 4.58.</b> LPO enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                                 | 97  |
| <b>Şekil 4.59.</b> LPO enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                            | 98  |
| <b>Şekil 4.60.</b> LPO enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                                                             | 98  |
| <b>Şekil 4.61.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) flavonların ferrik ( $Fe^{3+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan bileşikler (BHT, BHA, Troloks ve $\alpha$ -Tokoferol) ile mukayesesi ..... | 99  |
| <b>Şekil 4.62.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) flavonların kuprik ( $Cu^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan bileşikler (BHT, Troloks, BHA ve $\alpha$ -Tokoferol) ile mukayesesi ..... | 100 |
| <b>Şekil 4.63.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) flavonların FRAP yöntemine göre araştıma bulguları ve sonuçların standart antioksidanlarla mukayesesi .....                                                           | 101 |
| <b>Şekil 4.64.</b> DPPH radikali giderme kapasitesi için hazırlanan standart grafik .....                                                                                                                                          | 102 |
| <b>Şekil 4.65.</b> Flavonların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH radikali süpürme kabiliyetlerinin grafiksel sunumu .....                                                                                             | 103 |
| <b>Şekil 4.66.</b> ABTS <sup>•+</sup> giderme kapasitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....                                                                                                                               | 104 |

|                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 4.67.</b> Flavonların ABTS <sup>•+</sup> radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (BHT, BHA, Troloks ve $\alpha$ -Tokoferol) mukayesesi .....                                                                       | 105 |
| <b>Şekil 4.68.</b> DMPD <sup>•+</sup> radikali süpürme kapasitesi için çizilen standart grafik.....                                                                                                                                            | 106 |
| <b>Şekil 4.69.</b> Flavonların (10-30 $\mu$ g/mL) konsantrasyonlarındaki DMPD <sup>•+</sup> giderme aktivitelerinin grafiksel sunumu.....                                                                                                      | 107 |
| <b>Şekil 4.70.</b> Flavonların süperoksit anyon radikalleri süpürme kapasitelerinin grafiksel sunumu .....                                                                                                                                     | 108 |
| <b>Şekil 4.71.</b> Farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu$ g/mL) flavonların ( $Fe^{2+}$ ) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması. ....                           | 109 |
| <b>Şekil 4.72.</b> 1,3,6 maddelerinin (10 $\mu$ g/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.....                                                                 | 110 |
| <b>Şekil 4.73.</b> 1,3,6 maddelerinin (10 $\mu$ g/mL) lipid peroksidasyonu % giderme aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması .....                                                   | 111 |
| <b>Şekil 4.74.</b> 2,4,5 maddelerinin (20 $\mu$ g/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.....                                                                 | 111 |
| <b>Şekil 4.75.</b> 2,4,5 maddelerinin (20 $\mu$ g/mL) lipid peroksidasyonu % giderme aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması .....                                                   | 112 |
| <b>Şekil 5.1.</b> FRAP yönteminde deney ortamında gerçekleşen ferrik iyonlarının ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgenme reaksiyonu.....                                                                                      | 116 |
| <b>Şekil 5.2.</b> Antioksidan etkiye sahip olduğu düşünülen bir bileşik ile neokuprin arasında oluşan reaksiyon. Bu reaksiyon sonucu oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorbands verir. Bu yöntemde absorbands artışı esas alınmaktadır..... | 116 |
| <b>Şekil 5.3.</b> DPPH <sup>•</sup> serbest radikalinin giderilmesi mekanizması.....                                                                                                                                                           | 118 |
| <b>Şekil 5.5.</b> DPPH serbest radikali ile kurkumin arasındaki ön görülen mekanizma .....                                                                                                                                                     | 119 |

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 5.6.</b> Mono fenoller için muhtemel DPPH· serbest radikali giderme mekanizması                                                             | 119 |
| <b>Şekil 5.7.</b> Gallik asit molekülünün birebir DPPH· serbest radikalini söndürmesi ve radikalik galoil ara ürününün önerilen oluşum mekanizması   | 120 |
| <b>Şekil 5.8.</b> Eugenol molekülünün DPPH· serbest radikalini söndürmesi ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu mekanizması                   | 120 |
| <b>Şekil 5.9.</b> ABTS <sup>++</sup> 'nin kimyasal yapısı ve K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ile ABTS'nin yükseltgenmesi mekanizması    | 121 |
| <b>Şekil 5.10.</b> Kararlı DMPD <sup>+</sup> radikalinin oluşum ve giderilme mekanizması                                                             | 122 |
| <b>Şekil 5.11.</b> NADH/PMS sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin NBT <sup>2+</sup> 'yi formazana yükseltmesi                            | 123 |
| <b>Şekil 5.12.</b> NADH/PMS sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin NBT <sup>2+</sup> 'yi formazana yükseltme mekanizması                  | 123 |
| <b>Şekil 5.13.</b> Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin NBT <sup>2+</sup> 'yi formazana yükseltmesi             | 124 |
| <b>Şekil 5.14.</b> Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT <sup>2+</sup> 'yi formazana yükseltme mekanizması | 124 |
| <b>Şekil 5.15.</b> Ferrozinin molekülünün yapısı                                                                                                     | 125 |
| <b>Şekil 5.16.</b> Kurkuminin ferröz iyonlarını (Fe <sup>2+</sup> ) şelatlama reaksiyonu                                                             | 125 |
| <b>Şekil 5.17.</b> Sirinjik asit ve ferulik asitin ferröz iyonu (Fe <sup>2+</sup> ) ile bağlanma mekanizmaları                                       | 126 |
| <b>Şekil 5.18.</b> α-Linoleik asitten otooksidasyon sonucu endoperoksite dönüşümü                                                                    | 127 |
| <b>Şekil 5.19.</b> Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn <sup>2+</sup> iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli                | 131 |
| <b>Şekil 5.20.</b> AD hastalarının beyinlerinde dil ve hafıza kısımlarında meydana gelen bozukluklar ve PET görüntüleri                              | 133 |

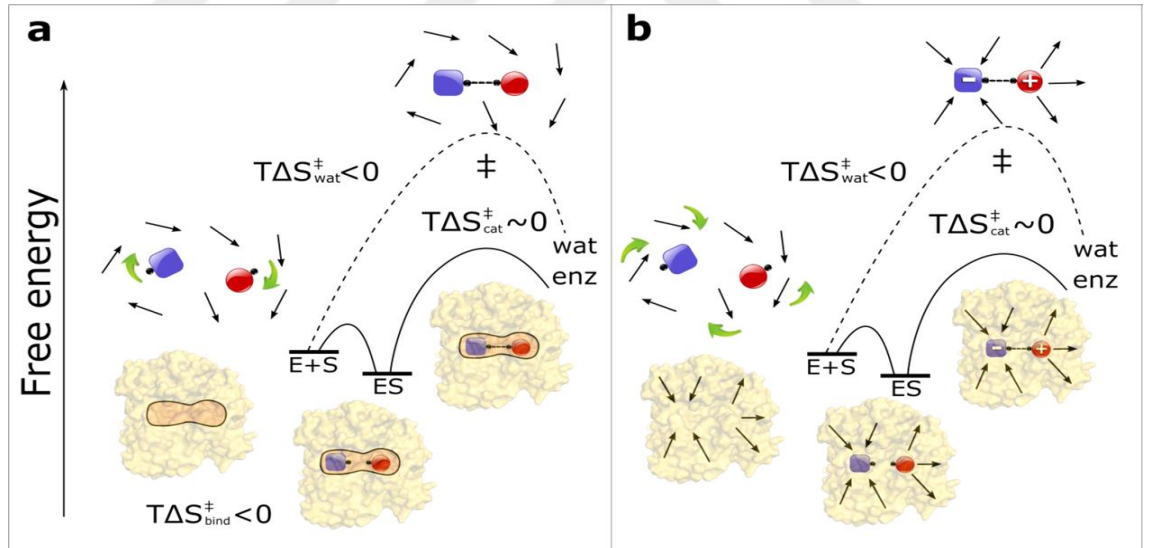
## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 1.1. hCA izoenzimlerinin fonksiyonları ve ekspresyon bölgeleri .....                                                                                                                                          | 6   |
| Çizelge 1.2. Serbest radikal kaynakları.....                                                                                                                                                                          | 17  |
| Çizelge 1.3. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest olmayan radikaller.....                                                                                                                                         | 17  |
| Çizelge 1.4. Benzoik asit ve Sinamik asit türevleri olarak fenolik bileşiklerin<br>sınıflandırılması .....                                                                                                            | 26  |
| Çizelge 1.5. Tokoferllerin sınıflandırılması.....                                                                                                                                                                     | 29  |
| Çizelge 2.1. Flavon türevlerinin numaralandırılması ve açık yapıları.....                                                                                                                                             | 45  |
| Çizelge 3.1. hCA enzimi için esterase aktivitesi pipetleme prosedürü .....                                                                                                                                            | 57  |
| Çizelge 3.2. AChE enzim aktivitesi pipetleme prosedürü .....                                                                                                                                                          | 58  |
| Çizelge 3.3. BChE enzim aktivitesi pipetleme prosedürü .....                                                                                                                                                          | 58  |
| Çizelge 3.4. LPO enzim aktivitesi pipetleme prosedürü.....                                                                                                                                                            | 59  |
| Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan flavonların 20 µg/mL konsantrasyonda ferrik<br>(Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik iyonlarının (Cu <sup>2+</sup> ) indirgeme kapasitelerini standart<br>antioksidanlarla mukayesesi ..... | 117 |
| Çizelge 5.2. Çalışmada kullanılan flavonlara ve standart antioksidanlara ait radikal<br>giderme ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili IC <sub>50</sub> (µg/mL)<br>değerleri .....                                | 126 |
| Çizelge 5.3. hCA I ve II izoenzimlerinin esterase aktivitesi üzerinde inhibisyon<br>etkisi gösteren flavon türevlerinin ortalama K <sub>i</sub> ve IC <sub>50</sub> değerleri .....                                   | 130 |
| Çizelge 5.4. Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz enzim aktiviteleri üzerine<br>inhibisyon etkisi gösteren flavon türevlerinin K <sub>i</sub> değerleri ve<br>inhibisyon türleri.....                             | 134 |
| Çizelge 5.5. LPO'nun aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren flavon<br>türevlerinin K <sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon türleri .....                                                                        | 135 |

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Biyolojik sistemlerin katalizörleri olan enzimler; vücuttaki bütün işlemler sonunda kendileri değişmeden reaksiyonların hızını artıran, enerjinin bir formdan diğer forma dönüşümünü sağlayan, protein yapısındaki makinelerdir. İnsan genomunun dörtte biri enzimleri şifrelemek için ayrılmıştır. Enzimler iki farklı şekilde etki ederler. İlkinde; kataliz reaksiyon sırasında meydana gelen enerji değişimi açısından değerlendirilir. Enzimler katalizlenmiş reaksiyondan farklı, enerji açısından tercih edilen alternatif bir reaksiyon yolu sağlarlar. İkincisinde ise aktif bölgenin kimyasal olarak katalizi nasıl gerçekleştirdiği açıklanır.



**Şekil 1.1.** Bir enzimin  $T\Delta S^{\ddagger}$  bariyerini azaltma yolları

**a)** Sudaki entropi kaybı reaktantların sıralanması ile baskın hale gelirse enzim bu bariyeri substrat enzim üzerinden geçer. Reaksiyon entropi kaybı olmaksızın devam eder. **b)** Solvent reorganizasyonu ile suda  $T\Delta S^{\ddagger}$  baskın halde ise; enzim aktif bölgesinin pre- organizasyonu ile bariyeri elimine eder. Bu durumda bağlanma entropisinin aktivasyon entropisi ile ilişkilendirilmesi gerekmez (Aqvist *et al.* 2017).

Enzimler tüm canlı organizmalar tarafından üretilen proteinlerdir, onlar sayısız biyokimyasal reaksiyonlar için bir katalizör görevi görürler. *In vivo* katalizör olmaktan başka enzimler *in vitro* olarak endüstri dahil çeşitli reaksiyonlar için katalizör de olabilir. Şu ana kadar bilinen 5500 enzim vardır. Katalizledikleri reaksiyonlara göre (oksidoredüktaz, transferaz, hidrolaz, liyaz, izomeraz ve ligaz) sınıflandırılırlar. Spesifik enzimlerin isimleri, üzerinde etkili oldukları maddeye karşılık gelir. Örneğin proteinler üzerinde etkili olan enzimlere proteaz denir (Jegannathan and Nielsen 2013).

Enzimlerin en önemli özellikleri çok özgül ve güçlü katalizör olmalarıdır. Biyokatalizörler geleneksel kimyasal katalizörlere; yenilenebilir kaynaklardan edinilebilirlik, biyolojik bozunabilirlik, nispeten ılımlı pH ve sıcaklık koşullarında çalışabilme özellikleri ve hem substrat hem de ürün stereokimyasında seçicilik gibi cazip avantajlar sunduğu için önemli bir alternatif olarak kabul edilir. Enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda işleme, tarım, tekstil, kozmetik, biodizel üretimi, hayvan yemi üretimi, deterjen ve enerji de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda önemli araçlar haline gelmiştir (Jemli *et al.* 2016).

Kağıt, tekstil, gıda, yem, kimyasallar ve ilaç gibi günlük yaşam ürünlerinin üretimi büyük miktarda hammadde ve enerji tüketir. Ek olarak çevre ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen büyük miktarda atık üretir. Bu nedenle dünyanın dört bir yanındaki sanayi daha az kaynak tüketen ve daha az zararlı etki gösteren alternatif bir teknoloji arayışına girmiştir. Bu sebeple endüstriyel biyoteknoloji olarak da bilinen alternatif teknoloji ortaya çıkmıştır. Biyo temelli materyallerin kullanımı ve doğal proseslere ilgi artmıştır. Enzimatik uygulamalar ise sürdürülebilir alternatiflerden biri olarak düşünülmektedir (Jegannathan and Nielsen 2013).

### 1.1.1. Karbonik anhidraz (hCA)

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1) tüm yaşam ögelerindeki pH düzenleyici bir enzimdir. Bu enzim birçok canlı sisteminde bulunur. Nörolojik bozuklukları içeren patolojik ve fizyolojik etkilerin çeşitliliğinde, sıvı dengesi, pH regülasyonu, kemik rezorpsiyonu,

karboksilasyon reaksiyonları, glokom, kalsifikasyon, osteoporoz, kanser, tümör üretimi gibi birçok metabolik olayda rol oynar (Gülçin and Beydemir 2013; Taslimi *et al.* 2017). CA'lar CO<sub>2</sub> ve su arasındaki basit ama önemli reaksiyonu katalize eder. Esas olarak karbondioksitin (CO<sub>2</sub>), bi karbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ve proton (H<sup>+</sup>)'ya hisrasyonunu geri dönüşümlü olarak bir metal hidroksit nükleofilik mekanizmasıyla katalize eder.

CA'lar bir metalo enzim ailesidir. CA'ların;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - ve  $\theta$ - CA'lar olmak üzere yedi farklı genetik aileye sahip olduğu bilinmektedir. Bu yedi ailede aktif merkezlerinde metal iyonları ihtiva ederler.  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\delta$ -CA'lar Zn<sup>2+</sup> iyonu,  $\gamma$  CA'lar ferröz (Fe<sup>2+</sup>) iyonları içerir. Bu enzimler aktive olabilmek için Zn<sup>2+</sup> veya Co<sup>2+</sup> iyonlarına da ihtiyaç duyarlar. Benzer olarak Cd<sup>2+</sup> ya da Zn<sup>2+</sup>  $\zeta$ -CA'ların yapılarında bulunur.  $\alpha$ -CA'lar, CA metaloenzim ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyeleridir (Scozzafava *et al.* 2015; Koçak *et al.* 2016; Polat Köse and Gülçin 2017). Enzimlerin ihtiva ettikleri metal iyonları; pozitif yüklere sahip olma, kinetik açıdan stabil bir bağ yapabilme ve bazı durumlarda birden fazla yükseltgenme halinde kararlı kalabilme gibi kimyasal aktiviteyi arttıran birçok özelliğe sahiptir (Göçer and Gülçin 2013).

$\alpha$ -CA gen ailesi; omurgalılar, protozoa, alg ve yeşil bitkilerin sitoplazması ve bazı bakterilerde bulunur. Farklı organizma ve dokularda  $\alpha$ -CA'lar monomer yapıdadır çok nadir dimer yapıda da bulunabilir. İnsan CA(hCA) izoenzimleri  $\alpha$ -CA gen ailesinin üyeleridir. Günümüze kadar 16 hCA izoenzimi tespit edilmiştir (Gülçin and Beydemir 2013; Göksu *et al.* 2014).

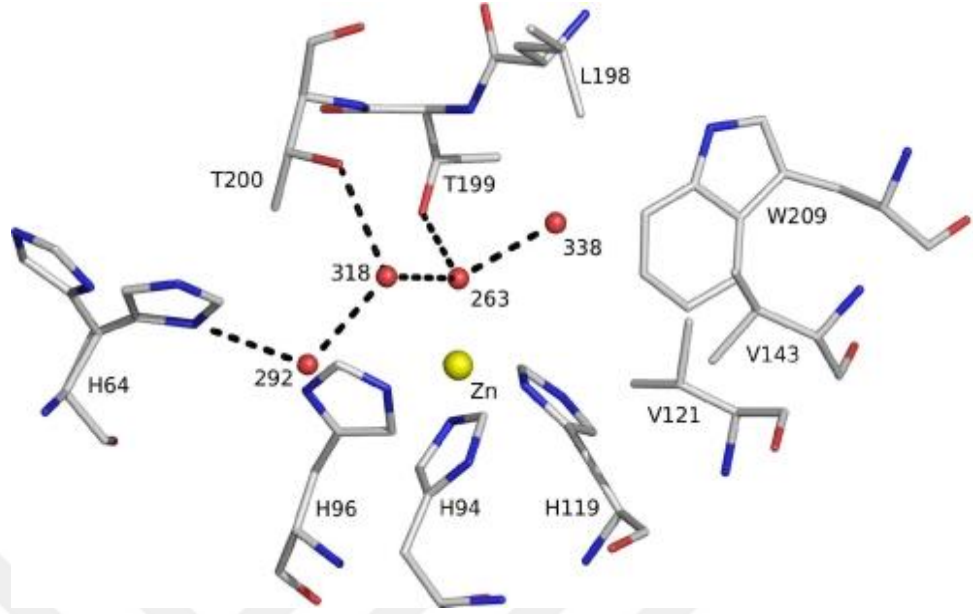
Bu izoenzimler; subselüler lokalizasyonu, katalitik aktivitesi ve farklı inhibitör sınıflarına duyarlılık bakımından farklılık gösterir. CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyal, CA VI salgı enzimi ve CA VIII, X ve XI nonkatalitik olduğu tespit edilen  $\alpha$ -CA izoformlarıdır. CA XV izoformunun insanlarda ve diğer primatlarda exprese olmadığı bildirilmiştir. Bu izoform kemirgenler ve diğer yüksek omurgalılarda bulunur. CA IX ve XII mebran izoenzimleri olarak bilinir. Gastrointestinal mukoza ve ilgili yapılar gibi normal dokularda da çok sınırlı sayıda bulunur. Genetik çalışmalarda CA IX ve XII; pH

regölasyonu vasıtasıyla tümör oluşumunda ve yaşamında etkin rol oynadığı belirtilmiştir (Gölçin and Beydemir 2013).

CA esas olarak solunum esnasında oluşan karbondioksitin suda çözünmesini, taşınmasını ve vücuttan atılmasını sağlar. Bunların sonucunda asit baz dengesi ve iyon değişimi sağlanır. CA,  $\text{CO}_2$  molekülünün hidratasyonu reaksiyonuna ek olarak; sülfonik, karboksilik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri, ayrıca siyanatın (ROCN) karbamata ( $\text{H}_2\text{NCO}_2$ ) veya ürenin ( $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$ ) siyanamite ( $\text{NH}_2\text{CH}$ ), aldehitin (RCHO) geminal diol ( $\text{R}_2\text{C(OH)}_2$ ) hidratasyonu reaksiyonları da CA tarafından katalize edilir (Göçer and Gölçin 2013).



**Şekil 1.2.** hCA II izoenzimlerinin X-ray görüntüsü



**Şekil 1.3.** hCA II'nin aktif bölgesi

\*Büyük sarı küre  $Zn^{2+}$  iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.  $Zn^{2+}$  iyonu, üç histidin (His94, His96, His119) tarafından tetrahedral bir şekilde koordine edilmiştir (Sjöblom *et al.* 2009).

**Çizelge 1.1. hCA izoenzimlerinin fonksiyonları ve ekspresyon bölgeleri\***

| <b>İzoenzim</b> | <b>Aminoasit Sayısı</b> | <b>Fonksiyonları</b>                                                                                                                                                                                         | <b>Ekspresyon Bölgeleri</b>                                                                                                                              |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| hCA I           | 261(260)                | Antireflü koruma, gaz değişimi ve iyon transportu                                                                                                                                                            | Eritrositler ve barsak sistemi                                                                                                                           |
| hCA II          | 260(259)                | Antireflü savunması, kemik rezorpsiyonu, sulu humor üretimi, sperm motilite, idrar asitlenmesi, CSF sekresyonu, gaz alışverişi                                                                               | Hemen hemen bütün hücreler                                                                                                                               |
| hCA III         | 260(259)                | Antireflü savunması, yağ asidi metabolizması, oküler sıvı taşınması ve homeostazı                                                                                                                            | İnsan embriyosunda notokord ve iskelet kası, miyotomlar ve Ekstremitte tomurcuklarının kas öncesi kitleleri, tip I kasındaki çözünebilir proteinin % 8'i |
| hCA IV          | 312(266)                | CO <sub>2</sub> 'ye nazal kemosentivite, antireflü savunması, HCO <sub>3</sub> yeniden emilim, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> çıkışı, pH regülasyonu, occuler sıvı üretimi, gaz değişimi ve serebral kan akışı | GI yolu, böbrek, endotel, pankreas, tükürük bezleri, kalp. kas, göz, kolon                                                                               |
| hCA VA          | 305(267)                | Adipositlerdeki piruvat karboksilaz ve biyosentetik reaksiyonlar için bikarbonat sağlayan mitokondriyal enzim                                                                                                | Karaciğer, böbrek, pankreatik adacıklar ve beta hücreleri                                                                                                |
| hCA VB          | 317(284)                | Biyosentetik reaksiyonlar, amonyak detoksifikasyonu                                                                                                                                                          | Pankreas, böbrek, tükürük bezi ve omurilik, kalp ve iskelet kası, Gastrointestinal mukoza                                                                |
| hCA VI          | 308(291)                | pH ayarlaması, antireflü savunması, kanserojenlerden korunma, tat fonksiyonu                                                                                                                                 | Tükürük başlıca bileşeni (sekretuar), gözyaşı ve süt, burun, lakrimal, von Ebner ve meme bezleri                                                         |
| hCA VII         | 264                     | Beyin-omurilik sıvısı üretimi                                                                                                                                                                                | Merkezi sinir sistemi                                                                                                                                    |
| hCA IX          | 459(422)                | pH regülasyonu, hücre adhezyonu, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu, iyon taşınımı. Testis sıvısının konsantrasyonu ve asitlenmesi                                                                     | Normal GI yolu, birkaç kanser, erkek akıntı kanalı                                                                                                       |
| hCA XII         | 354(330)                | pH regülasyonu, aköz humoral üretim, HCO <sub>3</sub> emilim, H <sup>+</sup> sekresyonu, konsantrasyon ve testis sıvılarının asitlenmesi.                                                                    | Kolon, böbrek, prostat, bağırsak ve aktive edilmiş lenfositler, belirli kanser, göğüs, akciğer, göz, erkek akıntı kanalları, üreme epiteli               |
| hCA XIII        | 262                     | Böbrek, gastrointestinal ve üreme bölgelerindeki asit baz dengesinin korunması ve pH regülasyonu                                                                                                             | Timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testis                                                                                        |
| hCA XIV         | 337(322)                | HCO <sub>3</sub> emilim ve nöronal transmisyon modülasyonu                                                                                                                                                   | Merkezi sinir sisteminin parçaları ve karaciğer, kalp, ince bağırsak, kolon, böbrek, idrar kesesi, iskelet, kas ve beyin                                 |

\*hCA VIII-X-XI izoenzimleri fonksiyonsuz olarak nitelendirilmektedir. Parantez içindeki değerler uygun polipeptit zincirlerinin amino asit sayılarını göstermektedir.

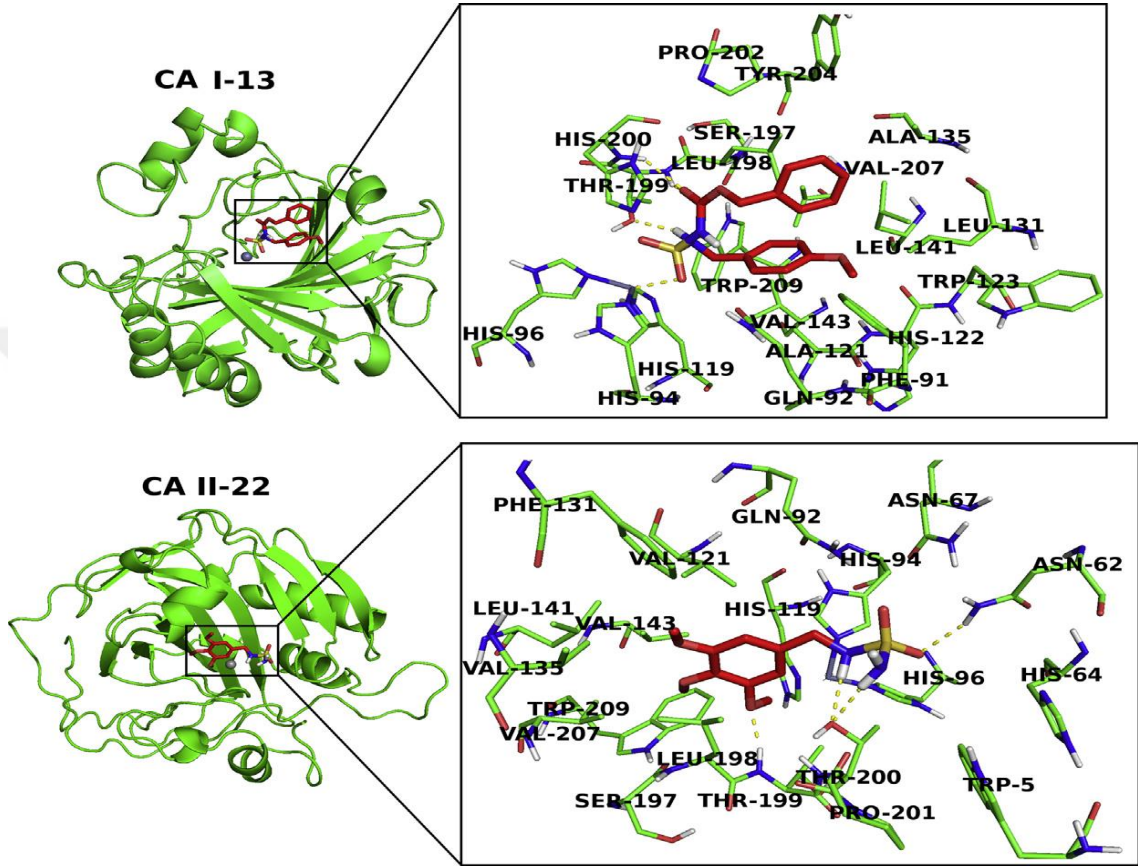
Bir enzim olarak CA en çok bilinen enzimlerden biri olduğu için geniş bir ilgi alanına sahiptir. Bazı CA izoformlarının turnover sayısı ya da  $k_{cat}$  değeri  $1 \times 10^6 \text{ sn}^{-1}$ 'i aşmaktadır. hCA I izoenziminin turnover sayısı  $2,5 \times 10^5 \text{ sn}^{-1}$ 'dir.

hCA I, eritrositlerde hCA II'den 5-6 kat daha fazla ekspresse olmuştur. Bu hCA izoenzimi olarak hCA I'in oynadığı rolün önemini ortaya koymaktadır. hCA I, kırmızı kan hücrelerindeki en bol non-hemoglobin protein olmasına rağmen eksikliğinde herhangi bir anomali gözlenmez. hCA I ve II yokluğunda önemli bir bileşen olabilir. Sitozolik hCA II birçok doku ve organda en yüksek dağılımı gösterir. Bu izoenzimlerin en önemli görevi; doku kılcallarındaki metabolik ürün olarak oluşan  $\text{CO}_2$ 'yi  $\text{HCO}_3^-$ 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{HCO}_3^-$ 'ün  $\text{CO}_2$ 'ye dönüşmesi reaksiyonu ile solunumda yer almasıdır.

hCA izoenzimleri önemli terapötik hedeflerdir. İnhibitörleri ve aktivatörleri şu anda ilaç olarak kullanılmaktadır. hCA I, otoimmün hemolitik anemi ile diğer anemi tiplerini ayırt etmek için bir indikatör olarak kullanılabilir. hCA II eritrositlerdeki iyon taşınımını sürdürmek için gereklidir. hCA II eksikliği; hCA II eksikliği sendromu, mermer beyin hastalığı ya da Guibaud-Vainsel sendromu olarak bilinen renal tübüler asidoz ve osteopetroza sebep olur. hCA II ayrıca stromal tümörlerin biyolojik işareti olarak gösterilir.

hCA'nın güçlü inhibitörleri ile ilgili, inhibisyonun yapısal temelini ve ilaç hedeflemedeki olası uygulamaları hakkında çeşitli raporlar mevcuttur. hCA'lar iki grup bileşik tarafından inhibe edilirler. Birinci grup metal kompleksi oluşturan anyonlar, ikinci grup ise sülfonamidler ve onların izosterleridir. Yapısal veriler; çinko hidroksit iyonunu konumlandıran ve Thr199 ile bir hidrojen bağı paylaşan bir  $\text{NH}^-$  grubu üretmek için inhibitörlerin enzime bağlanarak iyonize olduklarını göstermektedir. En güçlü organik inhibitörler aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir ( $\text{R-SO}_2\text{-NH}_2$ ). hCA II için  $K_i$  sabitleri  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  arasında değişmektedir. Asetazolamid glokom, yükseklik hastalığı ve bening invakranial hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Gülçin ve çalışma grubu tarafından yapılan çalışmalarda literatürde var olan ya da henüz yeni, daha önce

sentezlenmemiş inhibitör potansiyeli yüksek birçok bileşik literatüre kazandırılmıştır (Akbaba *et al.* 2013; Imtaiyaz Hassan *et al.* 2013).



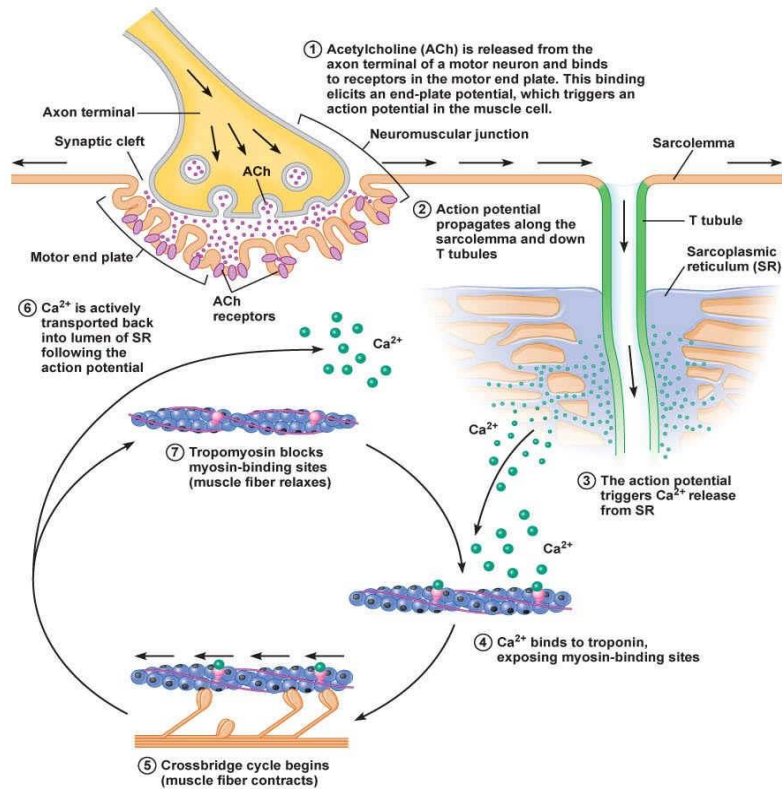
**Sekil 1.4.** Gülçin ve ekibi tarafından çalışılan bir grup benzilsülfamid türevinin sırasıyla hCA I ve II enzimlerine üst kenetlenme görüntüleri (Göksu *et al.* 2014)

### 1.1.2. Asetilkolinesteraz (AChE)

Asetilkolin (ACh) pre-sinaptik terminallerde kolinden sentezlenir. Bu molekül merkezi ve periferel sinir sistemlerinde kolinerjik nörotransmisyon için gereklidir. Periferel sinir sisteminde, ACh kasları harekete geçirir ve atomik sinir sisteminde en temel nörotransmitterdir. Beynimizden kaslara ulaşan ve mili saniyeler içerisinde kasların kasılıp gevşemesini sağlayan nöronlar bu sinyalleri ACh sayesinde iletirler. Tüm kaslarımıza sinirsel ileti bu molekül vasıtasıyla ulaşır ve bir dizi moleküler süreç başlar.

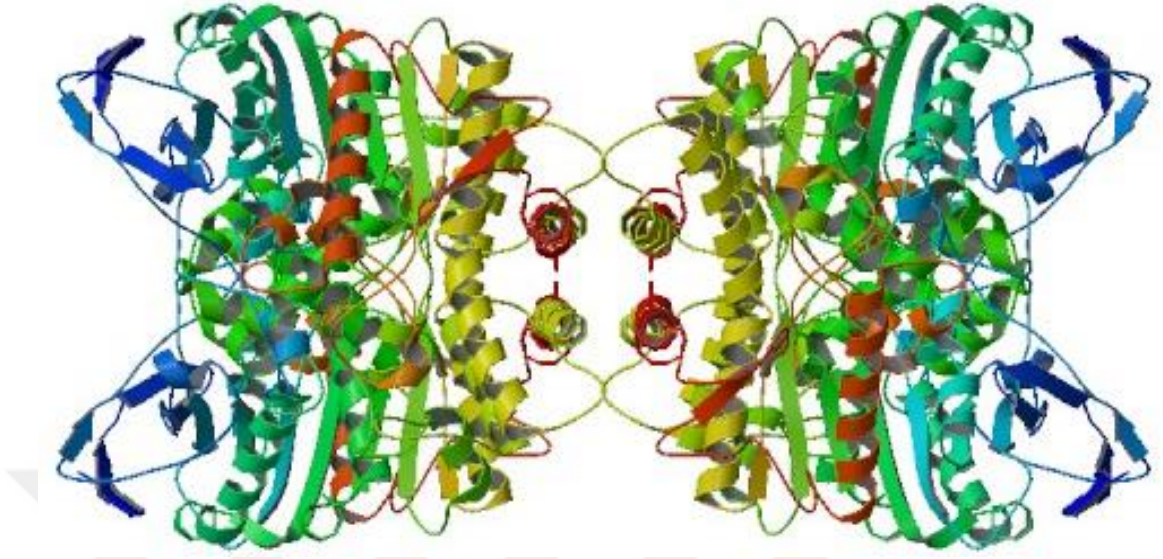
ACh iskelet kaslarının kasılmasını indükler. Farklı bir tür reseptör aracılığıyla kalp kası liflerinin kasılmasını önler.

Temel olarak AChE (E.C.3.1.1.7) canlı vücudunda ACh'yi hidrolizleme mekanizmasında görev alır. AChE, ACh'nin serbest bırakılması da dâhil olmak üzere ACh döngüsünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzim sinaptik boşluklardaki asetil kolini; kolin ve asetata parçalayan enzimdir. Başka bir deyişle süpürge görevi üstlenerek sinir ucu önünde biriken kimyasalları parçalar. Sonuç olarak elektron taşıyıcıların önü devamlı olarak açılacak ve en nihayetinde sinir iletimi sorunsuz devam edecektir (Demirci 2013; Göçer *et al.* 2013; Scozzafava *et al.* 2015).

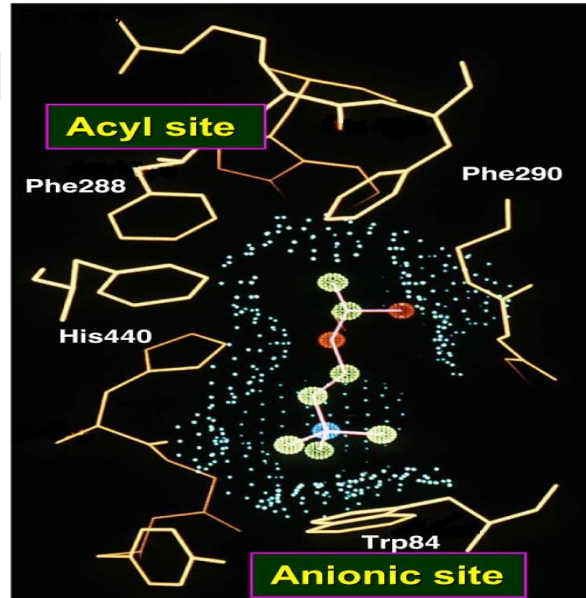


**Şekil 1.5.** AChE'nin biyolojik etkinliği

\*ACh bir motor nöronun akson terminalinden sakinir ve motor uç plakalarındaki reseptörlere bağlanır. Bu bağlanma, kas hücresinde bir aksiyon potansiyelini tetikleyen uç plaka potansiyelini ortaya çıkarır. Aksiyon potansiyeli sarkolemma ve aşağı T tüpleri boyunca yayılır. Bu aksiyon potansiyeli SR'den  $\text{Ca}^{2+}$  salınımını tetikler.  $\text{Ca}^{2+}$  troponine bağlanır, miyosin bağlanma bölgeleri ortaya çıkar. Geçiş köprüsü siklüsü başlar, kas fiberleri kasılır.  $\text{Ca}^{2+}$  aksiyon potansiyelini takiben SR'nin lümenine aktif olarak geri taşınır. Tropomiyozin, miyozin bağlanma bölgelerini bloke eder. Kaslar gevşer.

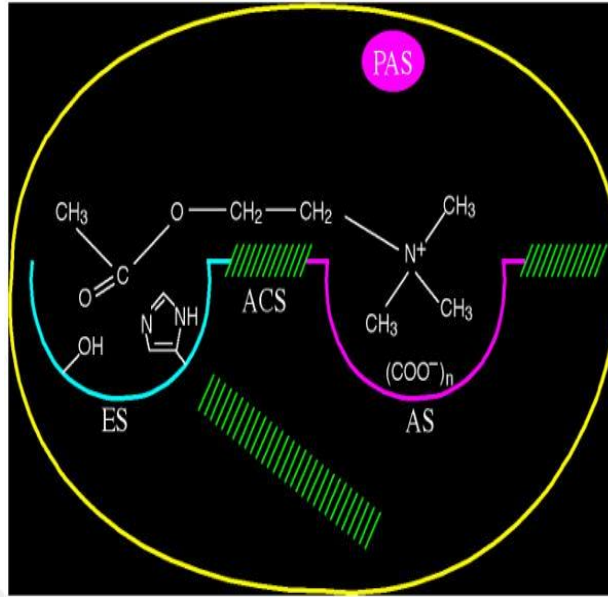


Şekil 1.6. AChE'nin X-ray difraksiyonu (Raves *et al.* 1998)



Şekil 1.7. AChE'nin aktif bölgesi

\*AChE aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından diğer enzimlerden farklılık gösterir. Enzim  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$  tabakalarından oluşur. 14 aromatik rezidü aktif merkezin çevresinde sıralanmıştır. Aktif merkezde bulunan serin, histidin ve glutamat katalitik üçlüyü oluşturur.



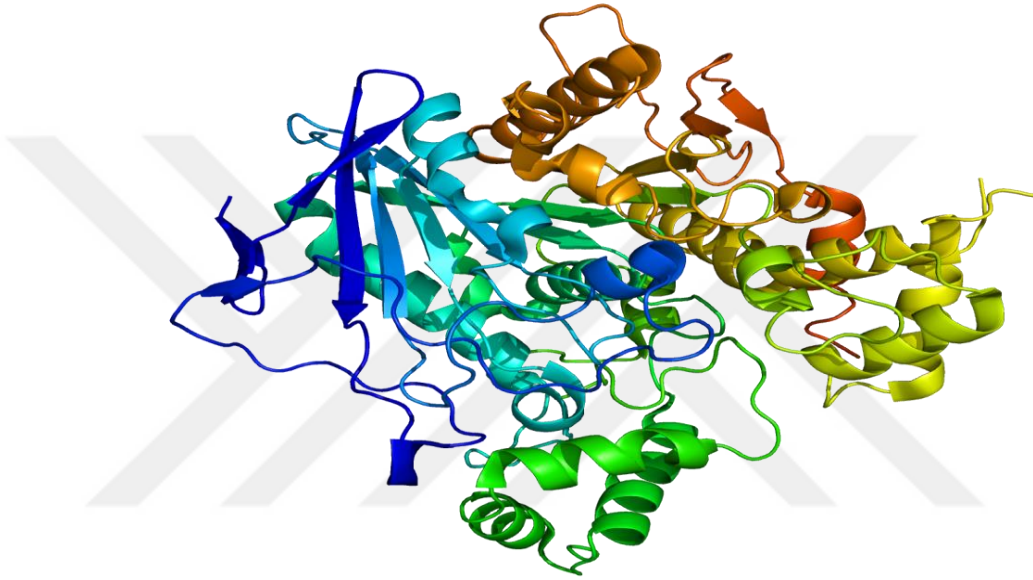
**Şekil 1.8.** AChE'nin bağlanma bölgesinin şematik gösterimi\*

\*ES: esteratik site, AS: anyonik substrat bağlanma bölgesi, ACS: aromatik bağlanma bölgesi, PAS: periferik anyonik bağlanma bölgesi. Çizili lanlar varsayılan hidrofobik bağlanma bölgelerini temsil eder. ACh, katalitik merkezin esteratik ve anyonik bölgelerini kapsar şekilde gösterilir. Histidin ve serinin imidazol ve hidroksil yan zincirleri esteratik bölge içinde gösterilir. Anyonik alan içerisinde  $(\text{COO}^-)_n$ , 6-9 varsayımsal negatif yükü temsil eder (Dvir *et al.* 2010).

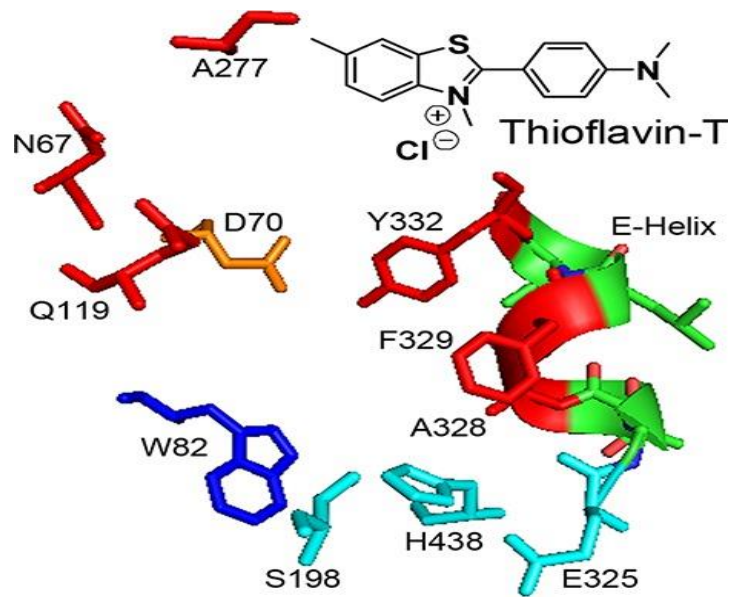
Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması sonucu ortaya çıkan çok yaygın bir demans hastalığıdır ve bu durumda en fazla azalma gösteren nörotransmitter ise ACh'dir (David *et al.* 2004). Demans hastalığı; sosyal ve öğrenme işlevlerinde azalmanın sonucu olarak beekte, konuşma yetisinde, algılama ve yargılama kapasitesinde, soyut düşünme ve problem çözme gibi önemli işlevlerde bozukluk olmasıdır. Bu hastalık nörodejenaratif bir rahatsızlıktır ve belleğin fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanmıştır. Asetilkolin miktarının beyindeki azalması Alzheimer hastalığının biyokimyasal açıdan en önemli değişikliğidir (Akincioğlu *et al.* 2013). Alzheimer hastalığının kesin tedavisi yoktur. Günümüzde var olan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Bu amaçla Donepezil ve Rivastigmin gibi AChE inhibitörleri olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar hepatotoksiste ve gastrointestinal bozuklukları gibi yan etkilere sebep olduğundan güvenli ve etkin; özellikle de doğal AChE inhibitörleri son zamanlarda daha fazla önem kazanmıştır. Hem tıpta ve hem tarımda çok sayıda AChE inhibitörleri kullanılmaktadır (Göçer *et al.* 2013).

### 1.1.3. Bütirilkolinesteraz (BChE)

Hem kolinerjik hemde ekolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip olan kolin esterazlar; plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunurlar. Kolin esterazlar; AChE ve Bütirilkolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) olarak ikiye ayrılırlar.



Şekil 1.9. BChE'nin 3 boyutlu yapısı



Şekil 1.10. Bütirilkolin esteraz için homolog rezidülerle gösterilen aktif bölge

Katalizin 20Å'luk derin bir sırtın tabanında bulunan serin, histidin ve glutamat 3'lü aminoasit rezidülerini içerdiği tespit edilmiştir (Macdonald *et al.* 2012; Polat Köse and Gülçin 2017).

Hayvanlar aleminde özellikle yaygın olan BChE; serum, kalp, pankreas, karaciğer ve beyinde expresse olmuştur. Boşluğun tabanında bulunan aktif bölgede, katalitik etkinlik için subsratların karbonil gruplarına veya psödosubstrat inhibitörlerine nükleofilik olarak saldırır (Chiou *et al.* 2009).

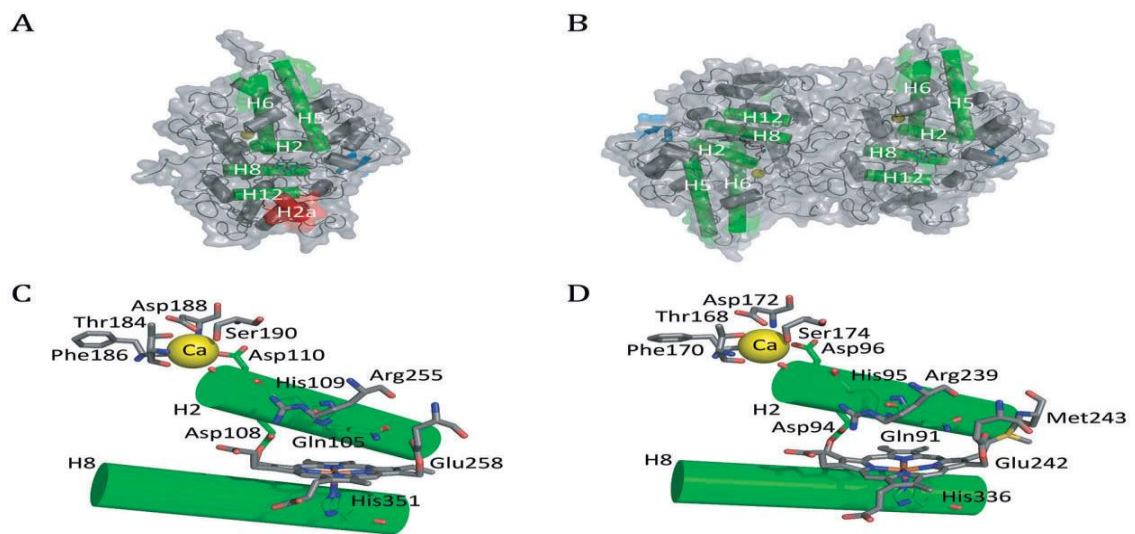
BChE ester içeren bileşiklerin metabolizmasında önemli rol oynar. Ek olarak BChE; ACh'yi hidrolize edebilir. Alzheimer hastalığında düzeyi azalmaz hatta artabilir. Normalde beyinde AChE baskındır ancak AD hastalarının beyinde AChE aktivitesi değişmeden kalırken veya azaldığında BChE aktivitesi yükselir. BChE normal durumlarda veya AChE aktivitesi azaldığında kolinerjik nöronlardaki asetil kolin seviyesini modüle ettiği için dikkat çekmiştir. Sonuç olarak AChE'nin yanında BChE'de AD hastalığında önemli bir role sahip olduğu bilinmelidir ( Nachon *et al.* 2013; Akıncıoğlu *et al.* 2017; Öztaşkın *et al.* 2017).

BChE, AchE'nin tersine, in vivo şartlarda bir AchE ikamesi olarak etki eden ve çeşitli kolinler, asil kolinler, asil thiokolinler, süksinil kolinler, organofosfatazlar ve asetanilidleri hidrolize edebilen karışık bir enzimdir. Bu enzimler, hem nörotransmisyonunda hemde hücrel farklılaşma ve gelişmede fizikokimyasal açıdan farklılık gösterirler. Böylece sayısız organik zehir ve zehirli maddeyi algılayabilen ve detoks yapabilen biyosensörler ve biyolojik süpürücüler olarak hedef alınmıştır. Ek olarak; glokom, travmatik beyin hasarı, Down sendromu ve Parkinson demans gibi merkezi sinir sistemi bozuklukları da dahil bir dizi hastalığın tedavisinde de hedef alınmıştır (Sorin *et al.* 2017; Taslimi *et al.* 2017).

#### 1.1.4. Laktoperoksidaz (LPO)

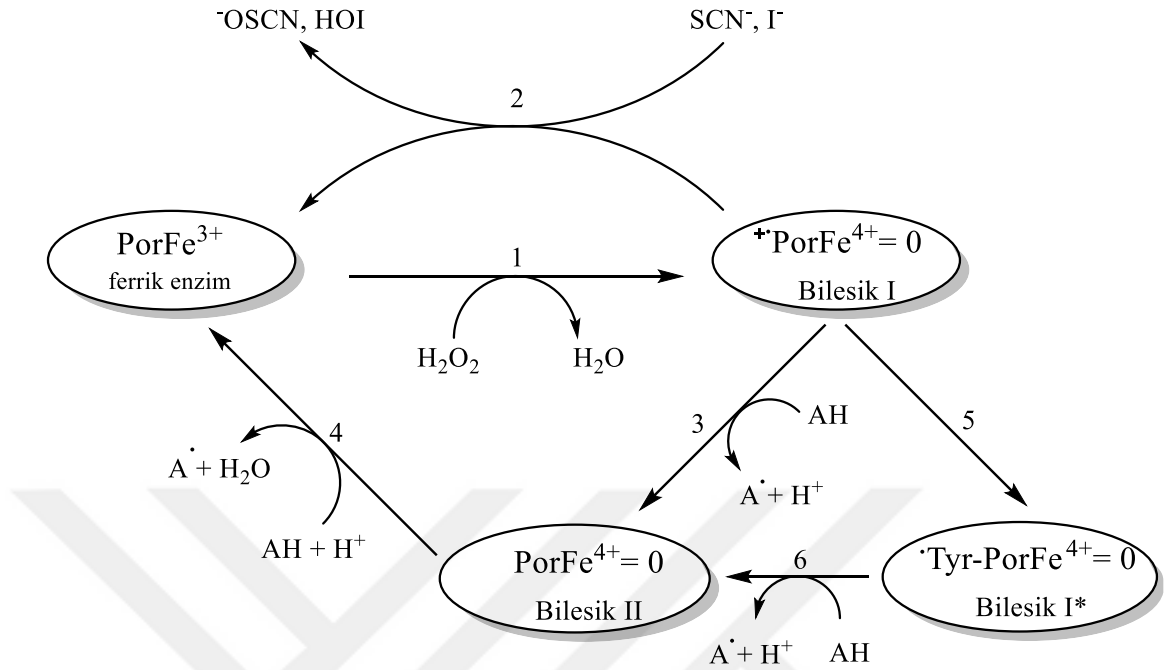
Süt, zararlı mikroorganizmaların içerisinde çoğalmasını önleyen birçok bileşik içerir. Aynı zamanda bu bileşenler yeni doğan bağışıklık sistemini de destekler. Şimdiye kadar test edilen bütün memeli türlerinin sütlerinde peroksidaz aktivitesi bulunur. Ek olarak tükürük, gözyaşı, servikal mukus ve diğer sekresyonlarda da peroksidaz aktivitesi bulunur. Sığır sütündeki peroksidaz aktivitesi laktoperoksidaz olarak adlandırılır.

Laktoperoksidaz (E.C.1.11.1.7), hidrojen peroksit varlığında moleküllerin oksidasyonunu katalizleyerek geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip ürünlerin oluşmasını katalizleyen bir oksidoredüktazdır (Boots and Floris 2006; Köksal *et al.* 2017a; Köksal *et al.* 2017b). Metabolik olaylar esnasında üretilen reaktif oksijen türlerini katalize eder ve zararsız moleküllere dönüştürür. Bu özelliği ile de antioksidan özellik sergiler (Köksal *et al.* 2016a). LPO, molekül ağırlığı yaklaşık 78 kDa olan, hem grubu içeren bir glikoproteindir. Hem gurubu aktif merkeze kovalent bağlıdır. Enzimin yapısal bütünlüğünün korunmasında  $Ca^{2+}$  iyonu önemli rol oynar (Boots and Floris 2006). Ayrıca bu glikoproteinin immun sistemi güçlendirdiği ve antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Seifu 2005).



**Şekil 1.11.** Laktoperoksidazın yapısı ve aktif merkezi\*

\*Laktoperoksidaz monomer yapıya sahiptir. Sekonder yapısında  $\alpha$ -heliks yapılanma hakimdir. Aktif merkezde beş ana heliks baskındır.



**Şekil 1.12.** Laktoperoksidazın farklı hem durumları arasındaki dönüşüm mekanizması

PorFe porfirin demir kompleksini temsil eder. Halojenasyon çevriminde (Reaksiyon 1 ve 2),  $SCN^-$  ve  $I^-$  LPO'nun birinci bileşeni (Bileşen 1) tarafından oksitlenir. Sonuçta hipotiyosiyonat ve hipoyodöz asit oluşur. LPO'nun temel fonksiyonu (Reaksiyon 1 ve 2) hidrojen peroksit varlığında tiyosiyonatin oksidasyonu ile antimikrobiyal etkiye sahip hipotiyosiyonatin oluşumunu katalizlemektir. Laktoperoksidaz sistemi bakterilerin hücre duvarlarını yıkararak etki gösterir. Reaksiyon 1, 3 ve 4 bilinen diğer memeliler ve bitki hem peroksidazlarının da peroksidasyon döngülerini içerir. AH oksitlenebilir bir substrattır ve  $A^\bullet$  substratı bir radikaldir. Bileşen 1'de bu radikal kısım enzimin formal oksidasyon durumunda hiçbir değişiklik olmaksızın porfirin halkasından tirozin rezidüsüne hareket eder. Peroksidasyon döngüsü 1, 5, 6 ve 4 reaksiyonları tarafından da gerçekleştirilir (Flemmig *et al.* 2015; Köksal *et al.* 2016).

## 1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

### 1.2.1. Serbest radikaller ve oksidatif stress

Metabolizma ve aerobik yaşamın temel mekanizmalarından olan oksidasyon, bir atomdan diğerine elektron transferidir. Bu sistemde görev alan elektron transfer sistemi kompleksleri elektronu en son  $O_2$ 'ne aktarırlar. Son olarak metabolizmanın temel amacı olan ATP üretilir. Organizmalarda biyolojik yolların ilerleyebilmesi için enerji üretimi çok önemlidir (Gülçin 2012; Topal *et al.* 2016).

Metabolizmanın normal işleyişi esnasında oluşabilen reaktif oksijen türleri; beslenme, radyasyon, sigara dumanı, stres gibi ekzojen kaynakların etkisiyle de oluşabilir (Yalçın 2012). Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen oksijen merkezli serbest radikaller; hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ); radikal olmayan reaktif oksijen türleri olan ozon ( $O_3$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), nitrik oksit ( $NO^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipoklorik asit ( $HOCl$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^\cdot$ ) gibi türleri içerir (Halliwell and Gutteridge 1999; Gülçin 2012).

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran, kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlıkları küçük ve oldukça reaktif moleküller olarak bilinirler (Yalçın 2012; Topal *et al.* 2016). Bu moleküller kendilerini kararlı hale getirebilmek için çevrelerindeki moleküllerden elektron alırlar. Biyolojik sistemlerde oksijen merkezli reaktiflerin (ROS) yanı sıra bazı azot merkezli reaktif türleri de oluşabilir. Genel olarak organizmalarda reaktiflerin çoğu oksijen merkezlidir (Southorn 1988). Oksijen merkezli reaktifler aerobik organizmalar için oldukça önemlidirler. Serbest radikallerin çevrelerindeki moleküllere saldırması ve bunun sonucunda yeni bir serbest radikal oluşması ile başlayan zincir reaksiyonlar, antioksidan savunma sistemi tarafından durduruluncaya kadar devam eder (Gökpınar *et al.* 2006).

Biyolojik sistemlerde ROS'nin ve metabolitlerinin fizyolojik konsantrasyonları insan vücudundaki savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır. Ek olarak serbest

radikallerin sürekli ve aşırı üretimi nükleik asitler, lipitler, proteinler, doymamış yağ asitleri ve karbohidratlar gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilir ve mutasyona sebep olan DNA hasarına sebep olabilir (Gülçin *et al.* 2010; Gülçin 2012; Bener 2013).

ROS organizmalarda çeşitli etkiler sebebiyle oluşabilir. Serbest radikal ve reaktif türlerin endojen ve ekzojen kaynakları Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (Gülçin 2012).

**Çizelge 1.2.** Serbest radikal kaynakları

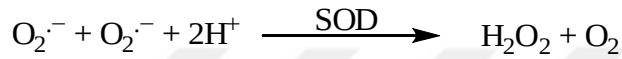
| Endojen Kaynaklar             | Ekzojen Kaynaklar           |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Redoks reaksiyonları          | Diyet faktörleri            |
| Mitokondrial ETS              | Sigara dumanı               |
| Oksidatif reaksiyonlar        | İlaçlar                     |
| Araşidonik asit metabolizması | Pestisitler                 |
| Otooksidasyon reaksiyonları   | Organik çözücüler           |
| Antioksidan enzimler          | Zararlı ışınlar (X-ray, UV) |

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri ve serbest olmayan radikaller Çizelge 1.3’te gösterilmiştir (Gülçin 2012).

**Çizelge 1.3.** Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest olmayan radikaller

| Reaktif Oksijen Türleri                  | Serbest Olmayan Radikal Türleri  |
|------------------------------------------|----------------------------------|
| Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )   | Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )   |
| Hidroksil Radikali ( $HO^{\cdot}$ )      | Singlet Oksijen ( $^1O_2$ )      |
| Lipit Radikali ( $L^{\cdot}$ )           | Ozon ( $O_3$ )                   |
| Lipit Peroksi Radikali ( $LOO^{\cdot}$ ) | Lipit Hidroperoksit ( $LOOH$ )   |
| Peroksi Radikali ( $ROO^{\cdot}$ )       | Hipoklorit ( $HOCl$ )            |
| Lipit Alkoksi Radikali ( $LO^{\cdot}$ )  | Peroksinitrit ( $ONOO^-$ )       |
| Nitrojen Dioksit ( $NO_2^{\cdot}$ )      | Dinitrojen Trioksit ( $N_2O_3$ ) |
| Nitrik Oksit ( $NO^{\cdot}$ )            | Nitröz Asit ( $HNO_2$ )          |
| Nitrozil Katyonu ( $NO^+$ )              | Nitril Klorit ( $NO_2Cl$ )       |
| Tiol Radikali ( $RS^{\cdot}$ )           | Nitroksil Anyonu ( $NO^-$ )      |
| Protein radikali ( $P^{\cdot}$ )         | Peroksinitröz Asit ( $ONOOH$ )   |
| Hidroperoksil radikali ( $HOO^{\cdot}$ ) | Nitröz Oksit ( $N_2O$ )          |

**Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )**, bütün aerobik canlıların metabolizmalarında gerçekleşen enzimatik ve enzimatik olmayan yollar sonucunda en fazla ve en kolay oluşan oksijen merkezli radikaldır.  $O_2$ 'nin bir elektron vererek indirgenmesi sonucu oluşur. Bu radikalin zararlı etkisi, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynağı olması ve geçiş metallerinin ( $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mo^{5+}$ ) indirgeyicisi olmasından kaynaklanır.  $O_2^{\cdot-}$ , süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenen reaksiyonun ürünü olan  $H_2O_2$  dönüştürülür. Bu sebeple vermiş olduğu oksidatif hasar oldukça azdır (Cadenas and Packer 1996).



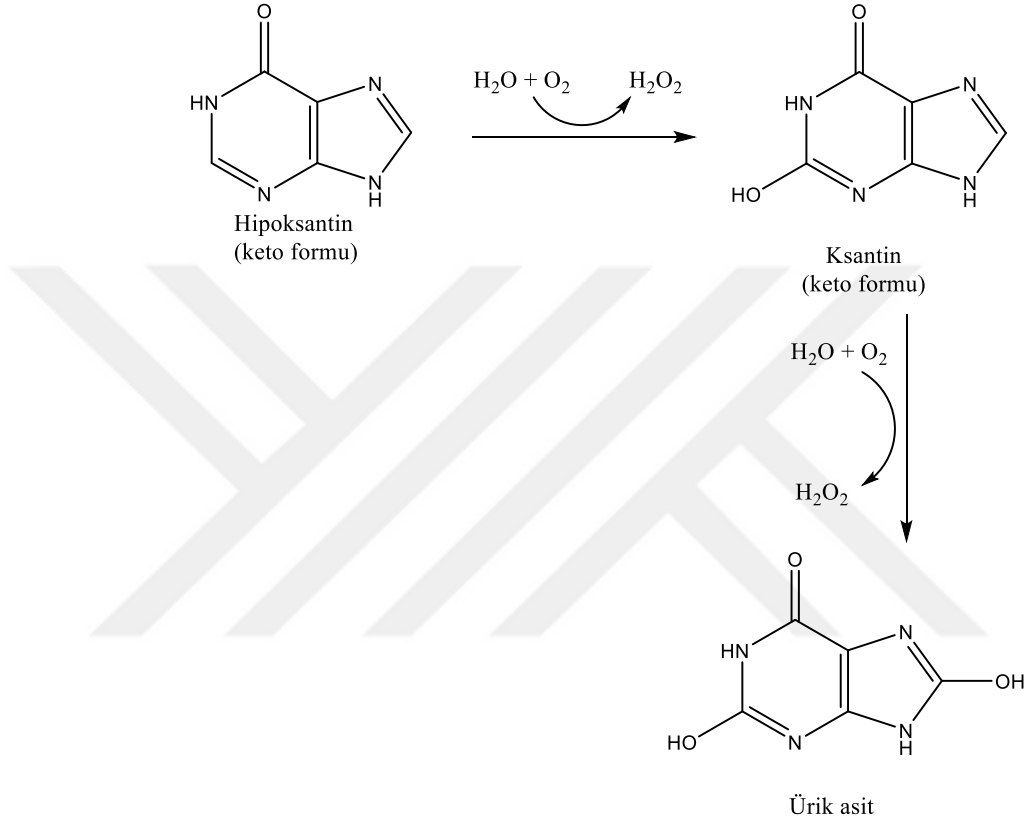
Süperoksit serbest radikali hem oksidan hem de redüktant olarak görev yapabilir. Mesela nitroblue tetrazolium ya da ferrisitokrom c ile reaksiyonunda indirgen olarak davranır ve bir elektron kaybederek moleküler oksijene okside olur. Bu radikal epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranır ve bir elektron alarak hidrojen perokside ( $H_2O_2$ ) indirgenir (Altınışık 2000).

**Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )**, enzim katalizörlüğünde oksijenin iki elektron vererek indirgenmesi sonucu oluşur.  $H_2O_2$  eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikal değildir. Fakat oksitleyici bir ajandır.  $H_2O_2$  oksitleyici özelliği yüzünden demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında son derece reaktif olan hidroksil radikalının oluşmasına sebep olur.

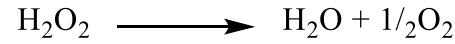
$H_2O_2$  organizmaların doğal işleyişi sürecinde oluşabilir. Radikal olmayan reaktif türü olan  $H_2O_2$  yaşayan hücreler arasında kolaylıkla difüze olabilir. Hücre membranlarından kolaylıkla geçebildiği için çok reaktif serbest radikallerin oluşmasına neden olur.

Flavine bağımlı oksidazlar ve süperoksit dismutaz katalizörlüğünde oluşan  $H_2O_2$ , hem grubu ihtiva eden bir enzim olan katalaz vasıtasıyla metabolize olur. Katalaz, hayvan hücrelerinin peroksizomlarında bulunur. Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin koruyucu etkisi, glutatyon, E ve K vitaminleri ve askorbik asit tarafından güçlendirilir.

Antioksidan olarak adlandırılan bu enzim ve bileşikler kolayca elektron alabilir ve serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için çeşitli şekilde etkiler gösterirler (Keha and Küfrevioğlu 2010; Gülçin 2012; Şehitoğlu 2012).



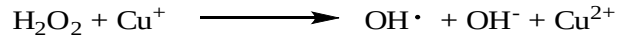
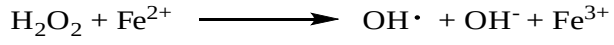
**Şekil 1.13.** Ksantin oksidaz reaksiyonu



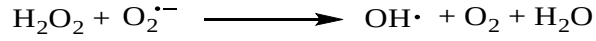
**Şekil 1.14.** Katalaz'ın katalizlediği reaksiyon

**Hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ )**, hidroksit iyonlarının nötral formu olan bu radikal yaklaşık  $10^{-9}$  s'lik yarılanma ömrü ile en reaktif tür olarak bilinir (Gülçin 2012).  $H_2O_2$ 'in indirgenmesi sonucu oluşur. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılan bu reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir (Halliwell 2000).

## Fenton Reaksiyonları:

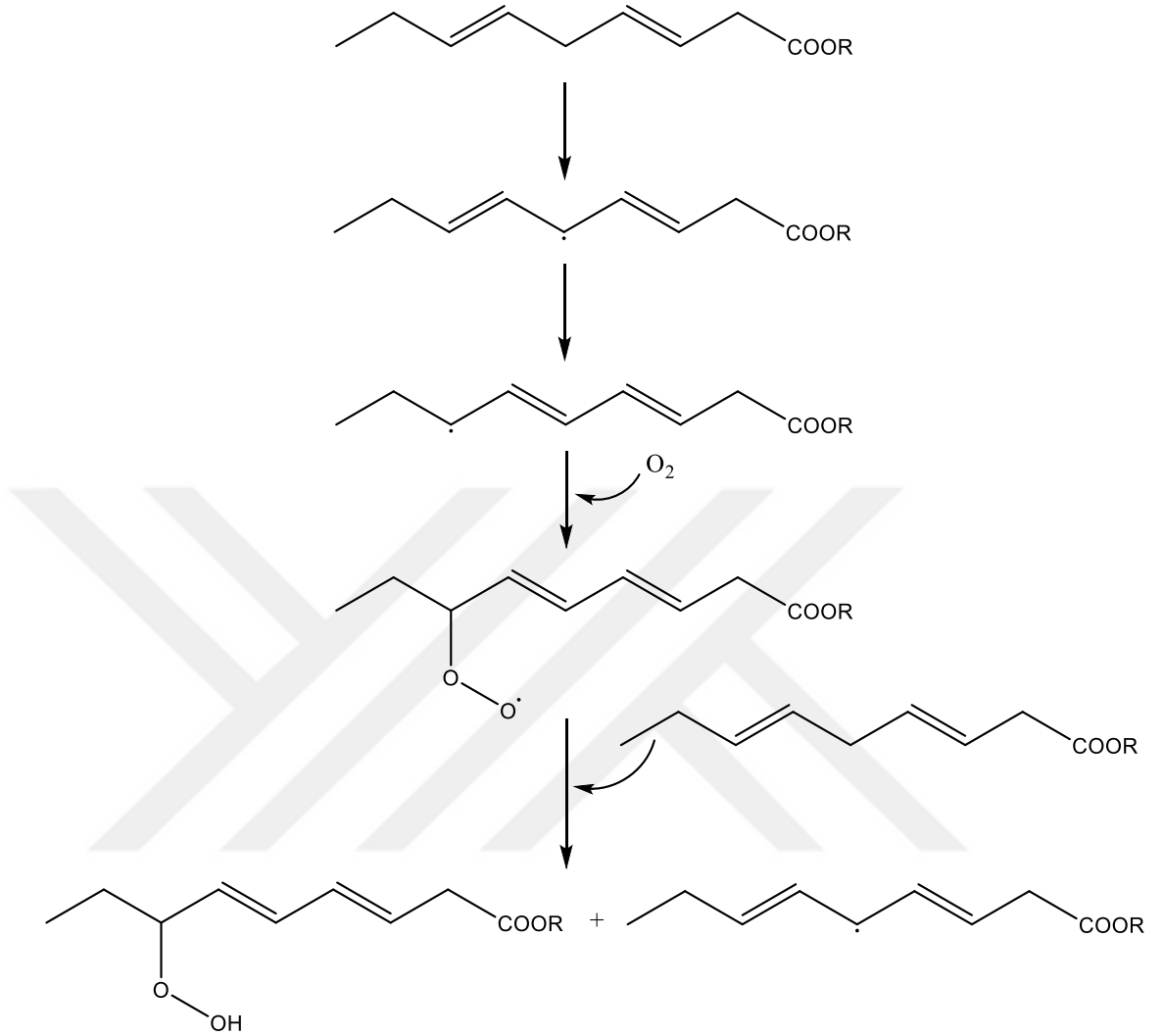


## Haber-Weiss Reaksiyonu:



Hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ), canlı hücrelerde bulunan hemen hemen tüm moleküller ile reaksiyona girerek onların yapılarını bozar. DNA'ya direkt saldırarak pürin ve pirimidin bazlarına zarar verir ve DNA omurgası hasara uğrar. Omurgası zarar gören DNA'da serbest radikal zincir reaksiyonları sarmal boyunca devam eder. Sonuç olarak DNA'daki bu hasarlar mutasyonlara ve kansere yol açabilir (Baki 2016).

Hidroksil radikalının en iyi tanımlanan biyolojik hasarı lipit peroksidasyonudur. Hidrojence zengin metilen ( $-\text{CH}_2$ ) grupları içeren poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) ROS saldırısına uğramasıyla başlayan zincirleme reaksiyonlar lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipit peroksidasyonu, membranlara yakın bölgelerde  $\text{OH}\cdot$  radikali olduğu ve membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırdığı durumlarda gerçekleşir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunun başlama, gelişme ve sonlanma aşamalarından olduğu gözlemlenmiştir.



**Şekil 1.15.** Lipit peroksidasyon reaksiyonu

Lipit peroksidasyonu sonucunda alkoksil radikalleri (RO<sup>·</sup>), aldehitler, alkoller, alkanlar ve organik hidroperoksitler (ROOH) oluşur. Proteinlerin amin gruplarının aldehitlerle reaksiyonu, lipoproteinlerin protein kısmının modifikasyonunu içine alan bir mekanizma olarak tanımlanır. Serbest radikallerin saldırısı sonucunda oluşan doku hasarının tespitinde biyomarker olarak lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonu ürünü malondialdehitin (MDA) oluşma oranına bakılmaktadır (Gülçin 2012).

**Nitrik oksit NO<sup>·</sup>**, son derece toksik, yarılanma ömrü en fazla 5 saniye olan, lipofilik, serbest radikal yapısında, oksijensiz ortamda oldukça stabil, suda eriyebilen renksiz bir gazdır. NO, bilinen en küçük molekül ağırlığına sahip reaktif memeli hücreleri sekresyon

ürünüdür. Bu molekül ROS, nörotransmitter, hormon, sitoprotektif ve sitotoksik olarak etki gösterebilen tek endojen moleküldür.

NO'nun en iyi karakterize edilmiş etkisi oksijen ve kükürt yapılarıdır. Makrofajlardaki NO, tümörlü hücreleri ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antitümöral ve antimikrobiyal etki gösterir. Aynı mekanizma ile mitokondriyal ETS enzimlerinin aktivitesi ise azaltır. Ek olarak bu molekül ferritin ile etkileşerek serbest demir oluşumuna sebep olur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan serbest demir ise lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Bu radikalın öğrenme, yeme-içme, hafıza, uyanıklık gibi birçok fizyolojik fonksiyonun yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar, şizofreni, Alzheimer hastalığı, otizm, dipolar bozukluk, Huntington hastalığı, kanser, sıtma, akut inflamasyon ve şeker hastalığı gibi birçok patolojik durumla ilgisi olduğu bildirimiştir (Chodzaoglou 2013).

Yaygın olarak moleküler oksijenin diamagnetik formu olarak adlandırılan **singlet oksijen ( $^1O_2$ )** normal triplet oksijenden daha az stabildir. Radikal olmayan bir reaktif oksijen ürünü olan singlet oksijen ( $^1O_2$ ) molekülünün yarılanma ömrü  $10^{-6}$  s'dir ve ışığa maruz kalan dokularda olduğu düşünülmektedir. Kendi uyarılma enerjisini aktararak ya da kimyasal reaksiyon vasıtasıyla başka moleküllerle etkileşebilir. Kimyasal reaksiyonlar için tercih edilen hedef poliansatüre yağ asitlerinin veya DNA sarmalındaki guanin bazının çift bağlarıdır. Singlet oksijen hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle direk reaksiyona girerek lipid peroksitlerini oluşturur (Gülçin 2012).

### 1.2.2. Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Organizmada serbest radikallerin biyolojik hasarlarına karşı en hassas olan molekül lipidlerdir. Hücre membranlarındaki yağ asitlerinin doymamış bağları ve kolesterol ROS ile reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Ek olarak ROS kendilerine özgü etkileriyle çevrelerindeki bileşiklerden elektron kopardığı gibi lipidlerden de elektron kopararak lipid radikallerinin oluşmasına sebep olurlar. Serbest radikallerin sebep olduğu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına nonenzimatik lipid

peroksidasyonu denilmektedir. Bu reaksiyonlar zincir halinde ilerler ve son derece zararlı radikallerin oluşmasına sebep olur. Meydana gelen hasar ise geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları sonucu oluşan yıkım ürünleri DNA'ya bağlanabilir. Bu noktada lipit peroksidasyonundan kaynaklanan asıl önemli patolojik problem açığa çıkar. Lipit peroksidasyonu ya antioksidan enzimler ile bastırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder (Bilge 2010; Şehitoğlu 2012).

### 1.2.3. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Tüm biyomoleküller gibi proteinler de ROS'ların hedefidirler. Ancak proteinler ROS'lara karşı yağ asitleri kadar duyarlı değildirler. Proteinlerin etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonuna bağlı olduğu gibi radikalın aktifliğine göre de değişiklik gösterir. –SH grubu ve doymamış bağa sahip ( tirozin, fenilalanin, triptofan, sistein, metiyonin ve histidin) aminoasitleri ihtiva eden proteinler ROS tarafından kolayca okside edilebilirler. Sonuç olarak sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller açığa çıkar.

Protein oksidasyonunun mekanizmaları;

- ✓ Metal katalizörlüğünde, protein karbonil oluşması şeklinde tanımlanan oksidasyon
- ✓ Tiyol – Protein gruplarının kaybı
- ✓ Nitrotirozinin oluşması
- ✓ İleri protein oksidasyon ürünlerinin oluşması şeklinde gösterilebilir.

Bu etkileşimler sonucunda proteinlerin 3 boyutlu yapıları etkilenir. Primer, sekonder ve tersiyer yapıların bozulmasına sebep olur. Proteolitik hassasiyetteki bu artış ile membran proteinlerinin yapı ve fonksiyonlarında değişimler olabilir (Altınışık 2000).

Serbest radikallerin; ateroskleroz, miyokard enfaktüs, hipertansiyon, diabet, yaşlanma, kanser, Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, otoimmün bozukluklar, yaşlanmadan kaynaklanan makuler dejenerasyon, akut akciğer hasarı, akut solunum

sendromu, enflamasyon ve hiperoksi gibi 100'den fazla hastalıkla ilişkilendirildiği bilinmektedir (Kalın *et al.* 2015).

Canlı organizmalarda, birçok sebeple oluşan ROS'ların zararlı etkilerine karşı hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunması ve fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için savunma sistemleri bulunur. Bütün aerobik organizmalarda ROS moleküllerini uzaklaştıran ya da ortadan kaldıran antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge söz konusudur.

#### **1.2.4. Antioksidanlar**

Normal aerobik bir hücre prooksidan-antioksidan dengesine sahiptir. Ancak bu denge ROS'un anormal oranda üretildiği durumlarda ya da antioksidan miktarının azaldığı durumlarda prooksidan yönüne doğru kayar. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Bütün aerobik hücreler kendilerini oksidatif strese karşı koruyan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Organizmalardaki hastalıkların üzerine ROS'un rolüne ilişkin bilgilerimiz arttıkça, antioksidanlara olan ilgi artmıştır. Antioksidanlar, ROS'u inhibe eden canlı vücudunu ROS'un zararlı etkilerine karşı koruyan moleküllerdir. Antioksidan moleküller, DNA, lipit, protein gibi oksitlenebilen substratlardan daha düşük konsantrasyonlarda olsa bile bu substratların oksidasyonunu önler veya geciktirirler. Oksitlenebilen substratlar, su dışında gıda bileşenlerinin ve yaşayan dokuların hemen hemen hepsini kapsar (Kalın *et al.* 2015; Topal *et al.* 2016a; Topal *et al.* 2016b). Başka bir deyişle serbest radikaller kanser başta olmak üzere birçok hastalığın temel sebebidir. Bu moleküller birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirirler (Şehitoğlu *et al.* 2015).

Antioksidanlar meyve ve sebzelerde çok farklı konsantrasyonlarda bulunurlar. Bu moleküller hem bitkilerde hem de insan vücudunda oksidatif prosesin kontrolünde olduğu gibi kimyasal sistemlerde hayati rol üstlenirler (Bazinet and Doyen 2017)

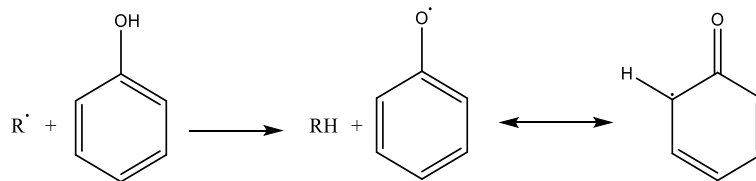
Bitkisel bileşenlerin antioksidan kabiliyetlerini tanımlamak için, antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birarada kullanılır. Fakat bu terimlerin farklı anlamlara sahip olduğu bilinmelidir. Aktivite; spesifik bir antioksidan ile spesifik bir oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini belirtir. Kapasite; antioksidan bir molekül tarafından giderilen serbest radikalin mol cinsinden miktarının ölçüsüdür (Gülçin 2012).

Antoksidan moleküller 3 farklı şekilde antioksidan ajan olarak etki edebilirler:

- ✓ Bir serbest radikal ya da serbest peroksit radikali ile bir veya daha fazla proton alış veriş yaparak: yayılama reaksiyonunu durdurma.
- ✓ Metali komplike ederek serbest radikal oluşmasını azaltma ya da engelleme: metal şelatlama.
- ✓ Reaktif oksijen ya da oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonlarını azaltma: oksijen ya da ROS giderme (Bazinet and Doyen 2017).

Antioksidan ajanlar ROS'un zararlı etkilerinden organizmayı korumasının yanı sıra ilaçların, gıdaların üretimi ve depolanması sırasında bozulmasının temel nedenlerinden olan lipit peroksidasyonunu geciktirerek ya da durdurarak raf ömrünü uzatırlar (Gülçin 2010). Antioksidanlar, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve bozulmasını önlemek için katkı maddesi olarak gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılırlar (Gülçin 2005).

Antioksidanlar primer ve sekonder antioksidanlar olmak üzere iki ana başlık altında toplanırlar. Fenolik ajanlar primer antioksidanlar olarak adlandırılırken, şelatlayıcı ajanlar ve oksijen/ROS giderici ajanlar sekonder antioksidanlar (sinerjik antioksidanlar) olarak adlandırılırlar. Bu ajanların etki mekanizmaları kimyasal yapı ya da kompozisyonlarına göre farklılık gösterir.

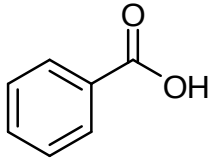
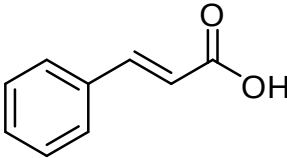


**Şekil 1.16.** Fenolik antioksidanların reaksiyon mekanizması

**Fenolik bileşikler**,  $\alpha$ -tokoferol gibi bileşikler içinde bulunduran primer antioksidanlar olarak adlandırılırlar. Primer ya da fenolik antioksidanlar indüksiyon periyodu sırasında tüketilirler. Bu bileşikler sekonder bitki metabolitleridir. Doğal antioksidanların en önemli grubunu oluşturan fenolik bileşikler hem insan hem de hayvan diyetlerinde esansiyel olduğu düşünülmektedir (Gülçin 2012). Bitkilerin meyve, çiçek, dal, yaprak, gövde ve tohumlarında bulunan fenolik bileşikler bitkileri dış etkilere karşı koruduğu bilinmektedir. Meyve ve sebzelerde iki önemli tat hissi olan acılık ve burukluk hissinin oluşmasını sağlar. Ek olarak meyve ve sebzelerin kırmızı, kırmızı-mavi, sarı, sarı-esmer renklerin oluşmasında da fenolik bileşikler rol oynar (Nizamlıoğlu and Nas 2010).

Dolaşım sisteminde seçici geçirgenliği düzenleme ve kan basıncını düşürme fonksiyonları sayesinde permeabilite faktörü (P faktörü) ya da P vitamini olarak adlandırılırlar. Aynı zamanda beslenme fizyolojisi açısından oldukça önemli olan fenolik bileşikler biyoflavonoit olarak da tanımlanırlar (Saldamlı 2007).

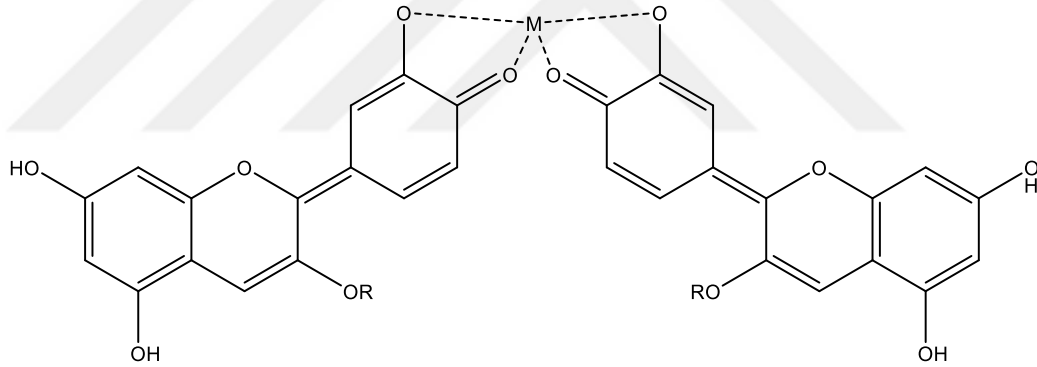
**Çizelge 1.4.** Benzoik asit ve Sinamik asit türevleri olarak fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

| Fenolik Bileşikler                                                                                                  |                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>(Benzoik asit türevleri)</p> |  <p>(Sinamik asit türevleri)</p> |
| Sirinjik asit                                                                                                       | Rozmarinik asit                                                                                                       |
| <i>p</i> -Hidrobenzoik asit                                                                                         | <i>p</i> -Kumarik asit                                                                                                |
| 3,4-Dihidrobenzoik asit                                                                                             | Kafeik asit                                                                                                           |
| Protokateşik asit                                                                                                   | Sinapik asit                                                                                                          |
| Galik asit                                                                                                          | Ferulik asit                                                                                                          |
| Vanilik asit                                                                                                        | Klorojenik asit                                                                                                       |

Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri aromatik halkaya bağlı olan hidroksil gurubunun sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Benzoik asit türevlerine göre sinamik asit türevleri daha etkili antioksidanlardır. Metoksi grupları gibi komşu inert gruplar

sayesinde fenolik hidroksillerin sterik engeli o molekülün antioksidan kabiliyetini artırır (Gülçin 2012).

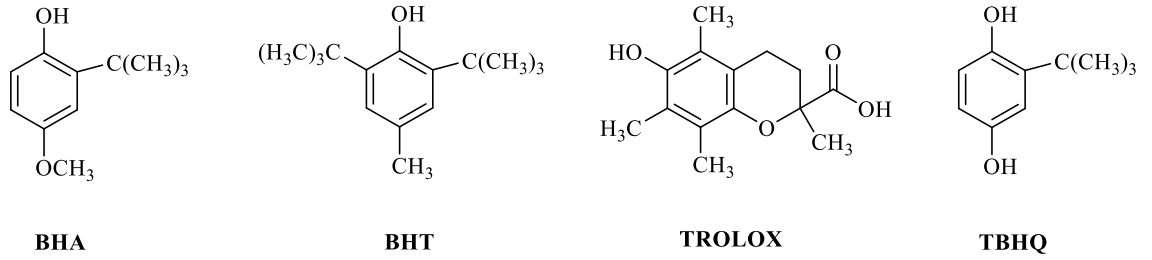
Fenolik antioksidanlar esas olarak, oto-oksidasyon prosesi sürecinde üretilen serbest radikal oluşumunu önleyerek etki ederler. Oksidasyon reaksiyonları zincir reaksiyonları başlatabilen radikaller üretebilirler. Antioksidan moleküller, kendilerini zararlı bir molekül haline çevirmeden oksitlenerek zincir reaksiyonları durdurabilirler. Fenolik antioksidanların temel rolü oldukça reaktif bileşikler olan serbest radikallere bir proton transfer etmektir. Bu bileşiklerin antioksidan kabiliyetleri redoks etkilerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle hidrojen donörü, indirgeyici ajan, metal şelatörü ve singlet oksijen oluşmasını önleyici olarak etkilerini gösterebilirler (Packer *et al.* 1999; Bazinet and Doyen 2017 ).



**Şekil 1.17.** Fenolik bileşiklerin metal kompleksi

Genel olarak kullanılan primer ya da fenolik antioksidanlar BHA, BHT, TBHQ ve gallatlar gibi **sentetik antioksidanlardır**. Fakat biberiye ve adaçayı gibi bitkisel ekstraktlar sentetik antioksidanlara alternatif olarak ticarileştirilmiştir.

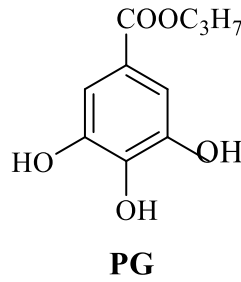
**BHA, BHT ve TBHQ:** Bütilenmiş hidroksianisol ya da BHA'nın iki izomerik formu mevcuttur.



**Şekil 1.18.** BHA, BHT, Trolox ve TBHQ açık formülleri

A formu %90 hatta daha fazla oranda baskındır. BHT ya da bütillenmiş hidroksi toluen BHA izomerlerine çok yakın bir yapıya sahiptir. TBHQ tersiyer bütıl hidrokinon gıda uygulamaları için yeni geliştirilmiş bir antioksidandır.

**Gallatlar:** Propil, oktil ve dodesil gallatlar en yaygın kullanılan galatlardır. BHA/BHT’de bir ve TBHQ’da iki hidroksil grubu olmasına rağmen gallatlar yapılarında üç hidroksil grubu bulundurlar.



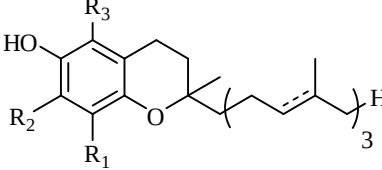
**Şekil 1.19.** Gallatların genel formülleri

### 1.2.5. Natural fenolik antioksidanlar

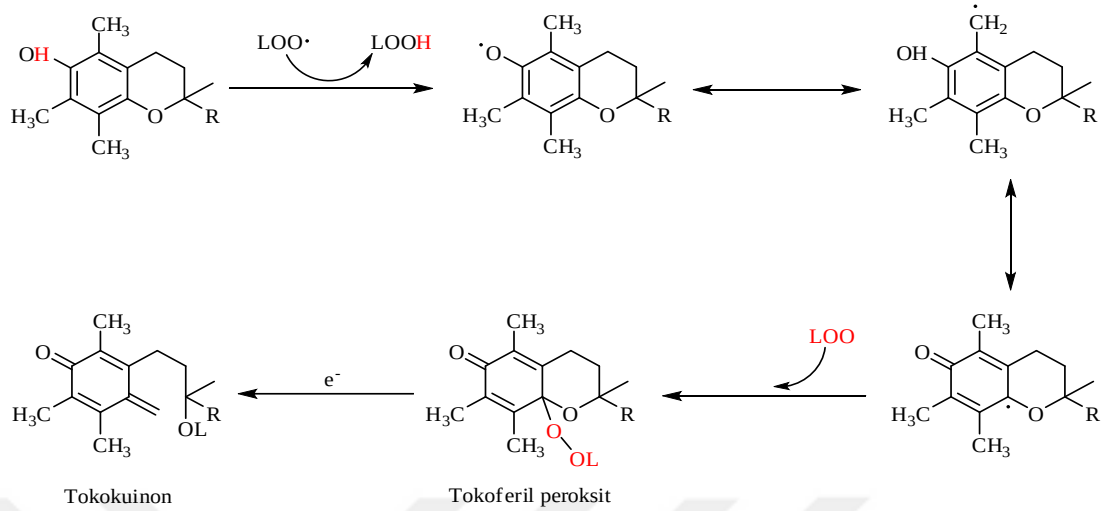
**Tokoferoller:** çoğu E vitamini aktivitesine sahip doğal fenolik antioksidanlar sınıfındadır. Tokoferoller en iyi bilinen ve en çok kullanılan antioksidanlardır. Bu bileşikler doğal olarak bitkisel yağlarda bulunurlar. Tokoferoller, herbirinin 4 izomeri olan ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ) tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Tokoferollerin formları arasındaki fark sübstitüent metil grubunun ( $\text{CH}_3$ )

pozisyonundan kaynaklanır.  $\alpha$ -Tokoferol, E vitamini olarak tanımlanırken  $\delta$  formu diğer formlara göre daha iyi antioksidandır. Çizelge 1.5'te tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması verilmiştir.

**Çizelge 1.5.** Tokoferllerin sınıflandırılması

|  |                                           |                        |                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------|
| $\alpha$ -Tokoferol,                                                               | $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$           | $\gamma$ -Tokoferol,   | $R_1 = R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}$ |
| $\alpha$ -Tokotrienol,                                                             | $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$           | $\gamma$ -Tokotrienol, | $R_1 = R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}$ |
| $\beta$ -Tokoferol,                                                                | $R_1 = R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ | $\delta$ -Tokoferol,   | $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$              |
| $\beta$ -Tokotrienol,                                                              | $R_1 = R_3 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$ | $\delta$ -Tokotrienol, | $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$              |

Bütün izomerler serbest radikalleri giderebilmek için bir hidrojen atomu verebilen bir hidroksil grubuna ve biyolojik membranlara nüfuz etmeye olanak sağlayan bir hidrofobik yan zincire sahip bir kromanol halkasına sahiptirler. Bu bileşikler, oksidatif reaksiyonlar sonucu meydana gelen radikalik hasarları önleyici, lipid peroksidasyonu önleyici, radikalik zincir reaksiyonlarını kırıcı ve hücre sinyali olarak görev yaparlar (Göçer and Gülçin 2011; Gülçin 2012; Bazinet and Doyen 2017).

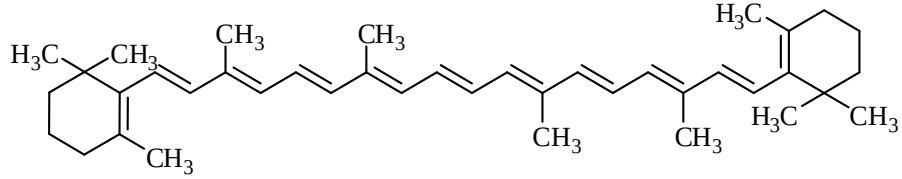


**Şekil 1.20.**  $\alpha$ -Tokoferolün radikal giderme mekanizması

**Polifenoller:** polimerik fenoller günümüze kadar karakterize edilmiş 10000'den fazla bileşiğin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin en yaygın özelliği üzerinde bir hidroksil grubunun bağlandığı en az bir aril halkasının varlığıdır. Fenolik bileşikler arasında bitkilerde en çok bulunan polifenol flavonoidlerdir. Flavonoidler; flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler olmak üzere 6 sınıfta incelenirler. Antosiyaninler en çok çalışılan polifenollerdir. Flavonoidler bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve ve tohumlarından izole edilebilirler. Flavonoidler bitkilerde aromatik aminoasitler fenilalanin ve tirozin; ve malonattan oluşmuştur. Flavonoidler çok etkili antioksidanlardır ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı korurlar. Bu bileşikler diyetle almamız gereken en temel antioksidan bileşiklerdir. Günlük 100 mg'ın üzerinde almamız gerekir. Çeşitli enzimlerin aktivitelerini modüle ederek birçok oksidatif hastalıklara karşı koruma sağlarlar. Ek olarak bu bileşikler lipid peroksi radikali, süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali gibi radikal giderici ve metal şelatlayıcı olduğu belirlenmiştir (Gülçin 2012). Ayrıca et konserveçiliğinde proteoliz hızlandırıcı, boyar madde sanayinde metal kompleksleştirici, kozmetik sanayinde merhem yapımı ve farklı kozmetik ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadırlar (Sağiroğlu ve Özcan 2007).

**Karotenoidler;** yağlarda çözünebilir polifenolik yapıdaki pigmentlerdir. Sebze ve meyvelere sarı, turuncu, yeşil, kırmızı renklerini veren karotenoidler; genellikle

domates, havuç, portakal, greyfurt ve ıspanakta bol miktarda bulunur (Frel 1994). Şimdiye kadar en iyi bilinen karotenoit,  $\beta$ -karotendir. Diyetleri  $\beta$ -Karoten içeriği açısından zengin olan toplumlarda akciğer ve deri kanseri, kalp hastalığı görülme sıklığı çok daha azdır (Molnár *et al.* 2000).



**Şekil 1.21.**  $\beta$ -karotenin açık yapısı

#### 1.2.6. Sinerjik antioksidanlar

Sinerjik antioksidanlar farklı doğaya sahiptirler. Bu tip antioksidanlar düşük ya da dolaylı antioksidan etkiye sahiptirler. Ancak bu bileşikler fenolik antioksidanlarla kombine edilerek kullanılırsa sağladıkları sinerjik etkiler sayesinde fenolik bileşiklerin verimliliklerini önemli derecede arttıırırlar. Bu sinerjik etkiler;

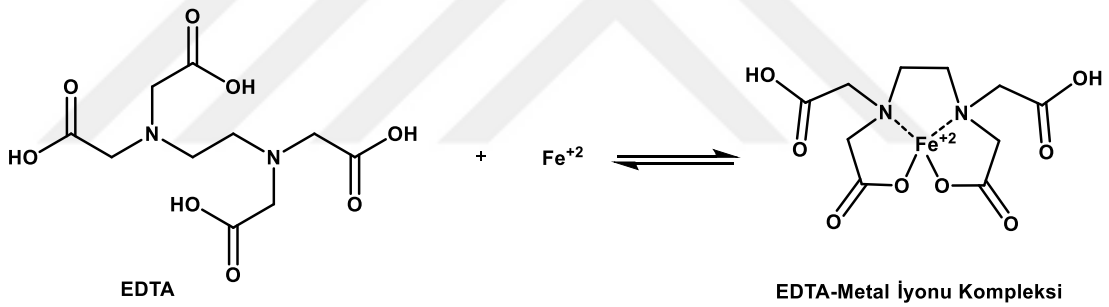
- ✓ Fenolik antioksidanların rejenerasyonu,
- ✓ Antioksidan oksidasyonunu takiben peroksitlerin ayrışmasının önlenmesi,
- ✓ Oksidasyon reaksiyonlarında katalizörlük yapan iz metallerin inaktivasyonu,
- ✓ Oksijen-ROS konsantrasyonunun azaltılması veya eliminasyonu

Sinerjik antioksidanlar şelatlayıcı ajanlar ve Oksijen-ROS temizleyici ajanlar olarak iki ana grupta incelenirler.

#### 1.2.7. Şelatlayıcı ajanlar

Şelatlayıcı ajanlar, oksidasyon reaksiyonlarının katalizörü olarak etki etmeye duyarlı olan metalleri inaktive ederler. Demir iyonları gibi geçiş metalleri tarafından katalizlenen Fenton reaksiyonları OH radikallerinin üretilmesine neden olur. Canlı

hücrelerde demir iyonu, fenton kimyası yoluyla oluşabilecek oksidatif hasarı olabildiğince engellemek amacıyla redoks-inaktif komplekslerde tutulur. Şekil (bazinetteki fig.6) de görüldüğü gibi şelatlayıcı ajanlar yapılarında paylaşılmamış elektron bulundurlar. Bu sayede metal iyonları ile stabil bir kompleks oluştururlar. Şelatlanan metaller, artık oksidasyon reaksiyonlarını katalizlemek ve fenolik antioksidanlarla daha fazla etkileşmek için uygun değildir. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), polifosfatazlar, tartarik asit ve sitrik asit en yaygın şelatlayıcı ajanlardır. Proteinlerin hidrolizinden elde edilen bazı peptitlerde şelatlama özelliğine sahiptirler. Metal şelatlamak için en reaktif amino asit rezidüsü, imidazol halkası içeren histidin aminoasitidir. Karnosin ( $\beta$ -alanil-L-histidin), anserin ( $\beta$ -alanil-L-1-metilhistidin), ophidin ( $\beta$ -alanil-L-3-metilhistidin) kas dokusunda doğal olarak bulunan antioksidatif peptitlerdir.



**Şekil 1.22.** EDTA'nın  $\text{Fe}^{2+}$  ile metal şelatlama reaksiyonu

### 1.2.8. Oksijen/ROS temizleyici ajanlar

Oksijen temizleyici ajanların mekanizması, ortamda mevcut olan serbest oksijen moleküllerine saldırmak ve bu molekülleri oksidasyon reaksiyonları için uygunsuz hale getirmektir. Bu gruptaki antioksidan moleküller sadece oksijeni elimine etmez aynı zamanda hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ), süperoksit anyon radikali ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) reaktif oksijen türlerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri olan singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ ), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )'i elimine eder. Antioksidan moleküller ROS'lara karşı elektron donörleri olarak görev yaparlar. Böylece ROS daha zararlı moleküllere indirgenirken oluşan oksitlenmiş ürünler çok reaktif veya zararlı değildir. Askorbik asit,

izoaskorbik asit, proteinler, peptitlerin yanısıra vücut enzimleri, sindirilmeyen karbohidratlar bu başlık altında incelenebilir (Bazinet and Doyen 2017).

**Askorbik Asit (C Vitamini):** En etkili ve en az toksik doğal antioksidan olarak kabul edilen askorbik asit birçok bitkide yüksek konsantrasyonda bulunur (Gülçin 2012). Suda çözünebilen bir vitamindir. C vitamini insanlarda sentezlenemeyen esansiyel bir vitamindir. Kolaylıkla elektron verir ve dehidroaskorbik aside okside olur. C vitamini peroksi radikalini, lipit peroksidasyonunu başlatmadan önce etkisiz hale getirir ve bu sayede biyolojik membranların peroksidatif hasara uğramasını önler.

**Proteinler:** Peptitlerin yüksek antioksidatif aktiviteleri, aminoasit sekanslarından doğan eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanmaktadır. Peptitler serbest amino asitlere göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterirler.

Glutasyon gibi peptitlerin antioksidan aktiviteleri iyi bilinmektedir. Glutasyon ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) doğal olarak kas dokusunda bulunur. Bu peptit serbest radikallerin zararlı etkilerinden hücreleri korumak için elektron donörü olarak görev yapar. Glutasyonun indirgeme gücü, proteinlerdeki sisteinil sülfhidril gruplarının indirgenmiş formunu korumasına yardımcı olur. Bu sayede sitoplazmik proteinlerin içindeki disülfür bağlarının oluşumu azalır. Reaktif oksijen türleri enerji üretimi, detoksifikasyon, kimyasal sinyaller ve immün sistem için gereklidir. ROS devamlı olarak vücut tarafından üretilir ve endojen enzimler tarafından kontrol edilir. Bu enzimler süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidazdır (Bazinet and Doyen 2017).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Organizmanın normal işleyişi esnasında sürekli olarak üretilen ROS; karbohidratlar, lipitler, proteinler, doymamış yağ asitleri ve nükleik asitler gibi hayati biyomoleküllere zarar verir (Gülçin 2010). ROS kaynaklı oksidatif zararı azaltan ve koruyucu ajanlar olarak adlandırılan antioksidanlar birçok kronik hastalığın oluşumuna ve ilerlemesine engel olurlar (Gülçin 2008). Yapılan son çalışmalara göre antioksidan aktiviteye sahip olan bileşiklerin oksidatif strese kaynaklanan kanser, nörolojik hastalıklar, kalp ve damar hastalıkları, katarakt gibi çoğu hastalığın önlenmesinde oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Elmastaş and Gerçekçioğlu 2005).

Çağımızın vebası kanser ve daha birçok hastalığın önlem, tedavi ya da hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında antioksidan çalışmalar ve enzimatik tedavi son derece önem kazanmıştır. Bu gerçekler de göz önünde tutularak literatüre birçok çalışma kazandırılmıştır ve çalışmalar devam etmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen maddelerin veya saf maddelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır.

*Chionanthus virginicus* bitkisinden oleoropin ve ligustrozit gibi sekoiridoidler (Gülçin *et al.* 2009b), sarmaşık bitkisinden hederakolşizit-E ve -F saponinleri, hederasaponin-C ve  $\alpha$ -hederin (Gülçin *et al.* 2004d) izole edilmiş, Taksifolin (Topal *et al.* 2016b), Cynarin (Topal *et al.* 2016a), *Perilla pankinensis* bitkisinden total izole edilen antosiyaninlerin (Gülçin *et al.* 2005b) antioksidan ve antiradikal kapasiteleri saptanmıştır. Bunlara ek olarak *Vinca herbacea* bitkisinden majdin ve izomajdin bileşikleri izole edilmiş ve bu maddelerin antioksidan, antiradikal ve apoptotik özellikleri incelenmiştir (Gülçin *et al.* 2012b). Ahududu (Gülçin *et al.* 2011b), meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) kökü ve yaprakları (Şerbetçi Tohma and Gülçin 2009), kıvılcık (Gülçin *et al.* 2005a), brokoli (Gülçin *et al.* 2004b), muşmula (Gülçin *et al.* 2011a), marul (Altunkaya *et al.* 2009), nane (Elmastaş *et al.* 2005), defne (Elmastaş *et al.* 2006a), mantar (Elmastaş *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a ), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), ısırgan (Gülçin *et al.* 2004c), lavanta (Gülçin *et al.* 2004a),

karanfil (Gülçin *et al.* 2004a), madımak (Yıldırım *et al.* 2003), kekik (Sökmen *et al.* 2004), ılgın (Oktay *et al.* 2007), dereotu çiçeği (Shyu *et al.* 2009), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), kivi (Bursal and Gülçin 2009), *Salvia L. Species* (Tohma *et al.* 2016), *Nepeta trachonitica* (Köksal *et al.* 2017), su mercimeği (Gülçin *et al.* 2009a), zencefil (Stoilova *et al.* 2006), karabiber (Gülçin 2005), ökse otu (Uçar *et al.* 2006), oğul otu (Köksal *et al.* 2011) ve tarçın (Chua *et al.* 2007) gibi birçok meyve ve sebze ile karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012a) ve zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) gibi bitkisel yağların ve propolisin (Gülçin *et al.* 2011c) antioksidan kapasiteleri gözlenmiştir. Ek olarak bazı meyve sularının (Wen *et al.* 1999) ve zeytinyağının (Blekas *et al.* 1998) yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir.

İspanya’da yetiştirilen; içerdiği C vitamini ve karotenoidlerin oranları belirlenen sekiz domates (*Lycopersicon esculentum*) türünün antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır (Guerrero and Fuentes 2008). Patates (Friedman 1997), soğan (Ewald *et al.* 1999), fasulye (Ewald *et al.* 1999) ve ıspanak (Gil *et al.* 1999) gibi çeşitli sebzelerin de ayrıca antioksidan potansiyeli analiz edilmiştir.

Fenolik bileşikler, flavonoller, katekinler ve flavonlar üzerinde en çok araştırma yapılan polifenolik bileşiklerdir (Shahidi and Nacz 1995; Gülçin 2012). Bu bileşikler en çok meyve ve sebzelerde bulunur. Belkide çağımızın gereği artık bütün yönelimler tekrar doğaya ve doğala doğru olmuştur. Bu sebeple bitkisel kaynaklardan elde edilen ya da doğal özdeş; kurkumin (Ak and Gülçin 2008) dantrolen (Büyükokuroğlu *et al.* 2001), bazı dimerik fenol bileşikleri (Gülçin and Daştan 2007) melatonin (Gülçin *et al.* 2002; 2003b; Gülçin 2008), L-Tirozin ve L-Dopa (Gülçin 2007), serotonin (Gülçin 2008), morfin (Gülçin *et al.* 2004a), kafeik asit (Gülçin 2006a), L-karnitin (Gülçin 2006b), propofol (Gülçin *et al.* 2005a), L-Adrenalin (Gülçin 2009) ve rezveratrol (Gülçin 2010) gibi saf ve biyolojik açıdan önem taşıyan bileşiklerin antioksidan ve antiradikal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu ve daha birçok madde için olası mekanizmalar öne sürülmüştür. Standart antioksidan (BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks) ile karşılaştırmaları yapılmıştır.

Antioksidan bileşiklerin sağlık alanının dışında bilinen en eski kullanım alanı gıda ve kozmetik endüstrisidir. Bu bağlamda ürünlerin raf ömürlerinin uzatılması amaçlanmıştır. Ek olarak antioksidanlar kauçuğa, yakıtlara ve petrole; bozulmalarını ve polimerizasyonlarını önlemek amacıyla da dengeleyici olarak ilave edilmekte ve kullanılmaktadır.

CA enziminin sığır eritrositlerinden saflaştırması 1930'lu yılların sonlarına doğru gerçekleştirebilmiştir. hCA aktivitesi ile çinko içeriği arasında bağlantı olduğunu Keilin and Martin (1944) belirterek çinkonun katalizlemede önemli rol üstlendiğini belirlemişlerdir. hCA enzimi bilim geçmişindeki ilk metalloenzim olarak literatüre eklenmiştir. CA'ların;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - ve  $\theta$ - CA'lar olmak üzere yedi farklı genetik aileye sahip olduğu ve 7 aileye ait enzimlerinde aktif merkezlerinde metal iyonları ihtiva ettiği yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur.  $\alpha$ -CA'lar, CA metaloenzim ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyeleridir (Koçak *et al.* 2016; Polat Köse and Gülçin 2017).  $\alpha$ -CA gen ailesi; omurgalılar, protozoa, alg ve yeşil bitkilerin sitoplazması ve bazı bakterilerde bulunur. İnsan CA (hCA) izoenzimleri  $\alpha$ -CA gen ailesinin üyeleridir. Günümüze kadar 16 hCA izoenzimi tespit edilmiştir (Gülçin and Beydemir 2013; Göksu *et al.* 2014). hCA izoenzimleri subseleler lokalizasyonu, katalitik aktivitesi ve farklı inhibitör sınıflarına duyarlılık bakımından farklılık gösterdiği bilinmektedir (Gülçin and Beydemir 2013).

CA enzimi üzerine yapılan çalışmalar daha çok hayvansal dokulara yönelik olmuştur. Bitkisel kaynaklı çalışmalar ise son yıllara artmıştır. Hayvan CA enzimleri ile bitki CA enzimleri arasında birtakım farklılıkların olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Atkins *et al.* 1972). İlerleyen yıllarda CA enzimi; suda yaşayan canlılara ek olarak memeli dokuları, birçok mantar, bitki, böcek ve sıçan gibi birçok kaynakta çalışılmıştır (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Gülçin and Beydemir 2013; Taslimi *et al.* 2017). CA izoenzimleri merkezi sinir sistemi, göz ve ciğer gibi birçok dokuda dağılmıştır (Gülçin and Beydemir 2013; Göksu *et al.* 2014). Bitkisel kaynaklı CA izoenzimlerinin molekül kütlesi 160-260 kDa arasında değişmektedir ve hegzamerik yapıdadır. Maydanoz bitkisinden saflaştırılan CA enziminin molekül

ağırlığının 180 kDa ve hegzamerik yapıda olduğu dolayısıyla bu yönüyle hayvan CA enziminden farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır (Tobin 1970). Ek olarak memeli CA izoenzimlerinin molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Beydemir *et al.* 2002; Akbaba *et al.* 2013; Imtaiyaz Hassan *et al.* 2013).

CA izoenzimleri, hayvanlarda ve özellikle de birçok insan hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Sülfonamid türevleri olan asetazolamit ( $C_4H_6N_4O_3S_2$ ), dorzolamit ( $C_{10}H_{16}N_2O_4S_3$ ) ve brinzolamit ( $C_{12}H_{21}N_3O_5S_3$ ) gibi bileşikler CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler. Örneğin CA inhibitörleri insanlarda ödem, epilepsi ve glukom hastalığı tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bülbül *et al.* 2003; Akincioğlu *et al.* 2013; Taslimi *et al.* 2017). Ek olarak bazı kimyasal maddelerin CA izoenzimlerinin aktivitesini önemli derecede azalttığı hatta bazı durumlarda tamamen durdurabildiği tespit edilmiştir.

Genel olarak literatürde bahsedildiği gibi ACh gibi transmitter miktarındaki azalma ya da artmaların çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Asetilkolin'nin çok fazla hirolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı meydana gelmektedir. Bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan bileşikler aranmaktadır. Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması sonucu baş gösteren yaygın bir demans hastalığıdır ve hastalık esnasında en fazla azalma gösteren nörotransmitter madde ise ACh'dir (David *et al.* 2004). Ancak bu ilaçların çok büyük yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bu sebeple doğal kaynaklı veya doğal özdeş inhibitör bileşikler çok daha dikkat çekmektedir. Bu amaçla AChE inhibitörleri olarak karbamat türevleri ve organo fosforlu bileşikler üzerinde çalışılmıştır. Hem tarım hem de ilaç endüstrisinde AChE inhibitörleri üzerine çok fazla yönelim vardır (Göçer *et al.* 2013).

*Carassius auratus*'nın beyin dokusunda organofosforlu bileşiklerin AChE'yi yüksek miktarda inhibe ettiği tespit edilmiştir (Ferrari *et al.* 2004). Ferrari ve grubu *Carassius auratus*'un (Ferrari *et al.* 2004) beyin dokusunda, Fernandez ve grubu *Anguilla. anguilla*'da (Fernandez-Vega *et al.* 2002) solungaç, beyin ve kas dokusunda,

organofosforlu bileşiklerin ve karbamat türevlerinin etkisini incelemiş ve total AChE aktivitesinde azalma olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmaların ışığında benzer olarak Dembele ve çalışma arkadaşları karbamat carbofuran ve organofosforlu klorofenvinphos bileşiklerinin *Cyprinus carpio* L'nin beyin dokusundaki etkilerini çalışmış ve AChE'yi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Dembele *et al.* 1999). AChE inhibisyonu farklı ksenobiyotiklerle çalışılarak da birçok farklı türde gösterilmiştir (Pan and Dutta 1998). Aquatik kirlenmede biyobelirteç olarak AChE kullanılmaktadır (Dembele *et al.* 1999). AChE'nin inhibitörü olarak bilinen ve çalışmalarla desteklenen karbamatlar (propoksur, pirolan ve aldikarb) fenol ya da türevlerinden üretilen sentetik maddelerdir. Temas halinde ve ağız yoluyla alınması durumunda mide zehiri olarak davranırlar. Yağ dokularında birikim yapmazlar ve kısa zamanda toksikitelelerini kaybederler. Bu maddeler AChE'nin inhibitörü olarak enzim faaliyetlerini engellerler (Şanlı 1988). Diklorvos, malaokzon ve paraokzon gibi organofosfatlar, sinir sisteminde bulunan AChE enzimini inhibe ederler. asetilkolinin asetat ve koline parçalanmasını engeller. Sinir iletiminin devamlılığı motor kaslarının sürekli çalışmasına neden olur ve organizmanın ölmesine yol açar. (Ünal and Gürkan 2004).

Hayvanlar aleminde yaygın olan BChE, kalp, serum, karaciğer, pankreas ve beyinde expresse olduğu tespit edilmiştir (Chiou *et al.* 2009). BChE ester içeren bileşiklerin metabolizmasında aktif rol oynar. Alzheimer hastalığında düzeyi azalmaz hatta artabilir. Normal durumlarda beyinde AChE baskındır fakat AD hastalarının beyinde AChE aktivitesi değişmeden kalırken veya azaldığında BChE aktivitesi yükselmeye başladığı bir dizi çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Bilim dünyasının BChE'nin üzerine odaklanmasının sebebi normal durumlarda veya AChE aktivitesi azaldığında kolinerjik nöronlardaki asetil kolin seviyesini modüle etmesinden kaynaklanır. Sonuçta AChE'nin yanında BChE'nde AD hastalığında önemli bir rol üstlendiği kanıtlanmıştır (Nachon *et al.* 2013; Akıncioğlu *et al.* 2017; Öztaşkın *et al.* 2017).

Enzimatik çalışmaların içinde bulunan LPO enzimi üzerine çalışmalar; LPO'nun potansiyel uygulama alanına sahip olması ve enzimin uygulama alanlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmacılar LPO'yu düşük maliyetle saflaştırmak amacıyla inhibisyon ve saflaştırma çalışmaları yapmaktadırlar (Özdemir and Uguz 2005; Boots and Floris 2006). LPO'nun sığır sütünden saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili literatürde var olan birçok metod vardır (Dumonted and Rousset 1983). İyonik şiddet esasına dayanılarak yapılan saflaştırma tekniği literatürdeki ilk metottur (Özdemir *et al.* 2001). Bu çalışmaların devamında farklı kromatografik metodlar da kullanılmıştır. CM-Selüloz (Morrison and Hultquist 1963), CM-Sefadeks, iyon-değişim kromatografisi (Morrison and Hultquist 1963; Fenil-Sefaroz CL-4B üzerinde hidrofobik afinite kromatografisi (Langbakk and Flatmark 1989), Uguz ve Özdemir 2005), biyo afinite, iyon değişim, hidrofobik afinite kromatografisi, Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi (Morrison and Hultquist 1963; Shin *et al.* 2001), Toyoparl-SP katyon değişim kromatografisi (Shimazaki *et al.* 1988) sığır sütünden LPO'nun saflaştırılmasında kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. LPO'nun molekül ağırlığı yaklaşık 78kDa ve hem grubu içeren bir glikoprotein olduğu tespit edilmiştir. Hem gurubu aktif merkeze kovalent bağlıdır. Ek olarak LPO'nun immün sistemi güçlendirdiği ve antitümör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Seifu 2005; Boots and Floris 2006).

LPO enzimi insan (Langbakk *et al.* 1989; Shin *et al.* 2001), koyun (Joseph *et al.* 2004) keçi (Jacob *et al.* 2000), sığır (Xiao *et al.* 2007), manda (Özdemir *et al.* 2002), memelilerinde bulunur. Bu kaynaklara ek olarak gözyaşı (Galijasevic and Hodzic 2014) ve tükrükden (Welk *et al.* 2011; Monson *et al.* 1988) değişik kromatografik metodlar kullanılarak saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmaların ışığında LPO enziminin ortalama aktivitesi kuzuda 0.34-2.38 EU/mL, koyunda 1.4 EU/mL, mandada 0.794 EU/mL, keçide 1.5-4.45 EU/mL, domuzda 22 EU/mL ve insanda 0.06-0.97 EU/mL miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Seifu *et al.* 2005).

LPO enziminin inhibitörleri arasında yer alan sülfanilamid molekülleri ( $R-SO_2-NH_2$ ) (Drew 2000), ilaçların önemli bir sınıfını teşkil ederler, insanlarda ve diğer türlerde

çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve besin üreten hayvanların büyümesinde kullanılmaktadır (Supuran 2002).

2016 yılında yapılan bir çalışmada, fare 3T3-L1 pre-adipositlerinde ve at yağından türetilmiş stromal hücrelerde (eADSC) doğal olarak türetilen flavonoid 3,4-Dihidroksiflavonun anti-adipogenik etkinliğini ortaya koymuşlardır. 3,4-Dihidroksiflavon ile yapılan tedavinin, adipogenik belirteçlerin azaltılmasına ve ROS ve kinaz sinyal yollarının diferansiyel modülasyonu ile lipid birikimine yol açtığını göstermişlerdir (Han *et al.* 2016).

Santos ve arkadaşlarının, malign gliomalar üzerine yapmış oldukları çalışmada, içerisinde 3,4-Dihidroksiflavonun bulunduğu kuersetin, apigenin, kresin ve kaempferol gibi birkaç polihidroksillenmiş flavonoidin etkilerini insan GL-15 glioblastoma hücre hattında araştırmışlar ve tüm flavonoidlerin canlı hücre sayısını azalttığını ve metabolizmayı yavaşlattığını gözlemlemişlerdir (Santos *et al.* 2015).

2015 yılında flavonoidlerle başka bir grubun yaptığı çalışmanın amacı, hidroksil grubunun bir dizi mono ve dihidroksiflavonlardan O-H bağ açma entalpileri (BDE) üzerindeki etkisini araştırmaktır. Sonuç olarak, B3LYP / 6-31G (d, p) seviyesindeki hesaplama ile üretilen radikallerin çekici H-bağ etkileşimleri yoluyla bir stabilizasyonu olan hidroksiflavonların BDE'sini yükseltmek için ilave bir hidroksil grubunun önemli rolleri olduğunu ortaya koymaktadır (Treesuwan *et al.* 2015).

Glial hücre kültürlerinde, iyi bilinen *Neospora caninum* (sığır, at, koyun ve köpeklerde düşüğe neden olur. Bunun yanı sıra köpeklerde nörolojik ve dermatolojik hastalıklara neden olur. Enfeksiyon modeli üzerine flavonoidlerin etkileri araştırılmıştır. Glial hücreler tek tek 10 farklı flavonoid ile muamele edilerek ve kültürlerin bir alt kümesi de *N. caninum*'un NC-1 türü ile enfekte edilmiş ve test edilen tüm flavonoidlerin, glial hücrelerin metabolizmasında bir artışa yol açtığı ve enfekte edilmemiş kültürlerle kıyasla NC-1 ile enfekte olan kültürlerde nitrit seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir. Bulgular hep birlikte ele alındığında, flavonoidlerin glial hücre yanıtlarını modüle ettiğini, NO

salınımını artırdığını ve *N. caninum* enfeksiyonunu ve proliferasyonunu etkilediğini göstermektedir (Barbosa de Matos *et al.* 2014).

Hossain ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise insan influenza A / PR / 8 / 34'e (H1N1)'ya karşı en güçlü antiviral flavonoid tanımlamak için çeşitli flavonoid gruplarından 13 farklı flavonoid taranmıştır. 3,2'-Dihidroksiflavon ve 3,4'-Dihidroksiflavon de dahil olmak üzere 3-hidroksil grubu flavonoidlerinin, güçlü bir anti-influenza aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Hossain *et al.* 2014). 3,4'-Dihidroksiflavonun ilk kez, rölatif tanımlı kültür ortamında (RDCM) klonlanmış blastokist oluşum hızını iyileştirmeyi başardığı gösterilmiştir (Xiong *et al.* 2014).

Yapılan diğer bir çalışmada, rekombinant UGT izoformları kullanılarak insan karaciğerinde ve bağırsak mikrozomalarında üç dihidroksiflavon ve yedi monohidroksiflavonun bölgesel spesifik glukuronidasyonunu öngörmek amaçlanmıştır. Yedi monohidroksiflavon, 2'-, 3'-, 4'-, 3-, 5-, 6- ve 7-Hidroksiflavon ve üç dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon, 3,5-Dihidroksiflavon ve 3,4'-Dihidroksiflavon seçilmiş ve sonuç olarak, yedi seçilmiş monohidroksiflavonun glukuronidasyonu, kullanılan UGT izoformları, -OH grubunun pozisyonları ve alt tabaka konsantrasyonlarından etkilenmiştir. Önemli rekombinant UGT'ler ile glukuronidasyon oranları, insan karaciğer ve bağırsak mikrozomlarında kullanılarak elde edilenlerle iyi korelasyon göstermiştir (Tang *et al.* 2010).

Flavonoidlerle yapılan başka bir çalışmada, insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücreleri üzerinde yapısal olarak farklı iki flavonoid grubunun benzo [a] pirene (B (a) P) neden olan genotoksik etkilere karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Mikronukleus testi ve tek hücre jel elektroforezi yardımıyla elde edilen sonuçlar, B (a) P ile indüklenen DNA lezyonlarının ve mikronukleusun inhibisyonunun, moleküler yapıdaki hidroksil gruplarının yapısal düzenlemesi ve organizasyonu ile korelasyona girdiğini göstermektedir (Kozics *et al.* 2011). Flavonoidlerin metillenme profillerinin araştırılması ise 2006 yılında çalışılmıştır. Diyet polifenollerinin kimyasal yapı ve biyolojik kaderi arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamak için, metillenmemiş polifenollerle,

metillenmiş polifenollerin karaciğer metabolik stabilitesi ve barsak emilimi üzerine olan etkisi, toplanmış insan karaciğer S9 fraksiyonu ve insan kolon adenokarsinoması (CaCO<sub>2</sub>) hücreleri üzerinde araştırılmış ve metillenmiş polifenollerin karaciğer metabolik kararlılığı ve bağırsak emilimi arttıkça potansiyel kanser kemopreventif ajanları olarak geliştirilecek olan metilleştirilmemiş polifenollerden daha elverişli olduğu ortaya konulmuştur (Xia *et al.* 2006). Saarinen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise flavonoidlerin aromataz inhibisyonu ve antioksidatif kapasitelerinin in vitro değerlendirilmesi, flavonoid yapısındaki hafif değişikliklerin biyolojik aktivitede belirgin değişikliklerle sonuçlanabileceğini göstermiştir. 7-Hidroksiflavon ve krizsin (5,7-Dihidroksiflavon) gibi çeşitli flavonoidlerin, insan koryokarsinom JEG-3 hücrelerinde H-3-androstenedion'dan (IC<sub>50</sub> < 1.0 µM) H-3-17 beta-estradiol oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Saarinen *et al.* 2001). 2010 yılında yapılan başka bir çalışmada, chrysin (5,7-Dihidroksiflavon) ve 3-Hidroksiflavonun antiproliferatif ve antianjiyojenik etkilerini karşılaştırmak için referans standart olarak quercetin (3,3', 4', 5,7-Pentahydroxyflavone) kullanılmış ve verilerin sonucunda, chrysin ve 3-Hidroksiflavonun referans standart quercetin'e göre belirgin olarak daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Pilátová *et al.* 2010).

3,7,4'-Trimetoksi-5-hidroksiflavon, 3,4'-Dimetoksi-5,7-dihidroksiflavon, 5,7,4'-Trimetoksi-3-hidroksiflavon, 3,5,7,4'-Tetrametoksiflavon ve 7,4'-Dimetoksi-3,5-dihidroksiflavon, *Hedychium thyrsiforme* kökünden izole edilmiş ve antioksidan ve antitümör teşvik edici aktiviteler için denenmiştir. Antioksidan deneyleri; 5,7,4'-Trimetoksi-3-hidroksiflavon, 7,4'-Dimetoksi-3,5-dihidroksiflavon ve 3,4'-Dimetoksi-5,7-dihidroksiflavonun güçlü aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Sadece iki bileşiğin, 5,7,4'-Trimetoksi-3-hidroksiflavon ve 7,4'-Dimetoksi-3,5-dihidroksiflavon, güçlü 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücüleri olduğu bulunmuştur. Antitümör tanıtıcı testler, tüm flavonoidlerin Raji hücrelerinde *Epstein-Barr virüsü* aktivasyonuna karşı güçlü inhibisyon aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (Jasril *et al.* 2003).

## 2.1. Çalışmanın Amacı

Günümüzde yoğun bir şekilde tartışılan organik-kimyasal çatışması toplumu kitleler halinde bir yönden bir yöne sürüklemektedir. Örneğin, organik olarak yetiştirilen muz potasyum açısından yüksek bir değere sahiptir. Yüksek tansiyon, mide rahatsızlıkları, kalp ritim bozuklukları, kalp yetmezliği gibi birçok hastalığa درمان olabiliyorken yine aynı sebepten böbrek yetmezliği, diyabetik gibi birçok hastalığınsa baş belası olmuş uzak durulması gerekenler listesinin başına çekilmiştir. Bu ve benzeri örnekleri çoğaltmak fazlasıyla mümkünken organik olarak nitelendirilip faydalı kimyasal ve zararlı diye nitelendirilip zararlı diye adlandırmak toplumsal gerçekliğe aykırıdır.

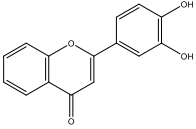
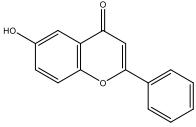
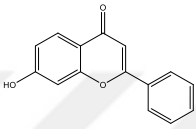
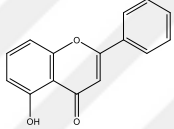
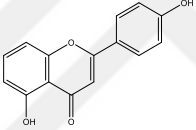
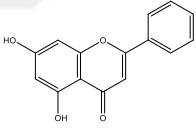
Kimyasal içeren maddelerin; sağlık açısından bir çok tedavisi imkansız denirken hastalıklara درمان oluşunu, günlük rutin yaşamda, yaşam kalitemizi etkileyen irili-ufaklı birçok hastalığın, rahatsızlığın tedavisinde vazgeçilmez, tek çare oluşunu, üretiminin ve ulaşımının zor olduğu birçok gıda maddesinin daha uygun ömürlü bir şekilde raflarda bizlerin hizmetine sunulmuş olmasını, tarımsal alanda ülke olarak; ürün kalitesi ve kendimize yetebilirlik ölçütlerinde, ihracat kotalarının üst sınırlarını zorlamada, kimyasal maddelerle güçlendirilerek niteliksel ve niceliksel bir ölçüye ulaşmada, erkek-kadın bireylerin güzellik ve bakım ürünlerini içeren kozmetik sanayinin temel taşı olmasında ve sayılarını artırabileceğimiz bir çok alanda, hayatımızı kolaylaştırmak ve yaşam standardımızı daha kaliteli ve üst sınırlara taşımak için ne denli vazgeçilmez olduğunu unutmamalıyız.

Sonuç olarak globalleşen dünyada fen bilimleri temelli üretilen madde- ürün- icatlarının temel amacı, yaşamı kolaylaştırmak, insanlara fayda sağlamak ve insanların zorlaşan koşullarını göz önünde bulundurarak daha kaliteli bir yaşam sağlamaktır. Dolaylı etkilerini konuşmaya bile gerek yok düşüncesindeyim çünkü saymakla bitiremeyeceğimiz etkilere sahip. Anlayacağınız, fen bilimleri aslında bir bilim olmaktan öte bir vazgeçilmezdir, bir kolaylaştırıcıdır, bir sakinleştirici ya da bir yatıştırıcıdır. Zamanı büküp uzakları yakınlaştıran, fırsatların ötesine geçip olmazları oldurandır. Bizde tüm bu gerçeklerin ışığında literatüre artı değer katabilmek amacıyla

bazı flavonların (7-hidroksiflavon, 5-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, 4'-5-dihidroksiflavon, 5,7-dihidroksiflavon, 3',4'-dihidroksiflavon) antioksidan kapasitesini belirlemek, hCA, AChE, BChE ve LPO enzimleri üzerine etkilerini incelemek amacıyla çalışmalar düzenledik.

Önemli hastalıkların önlenmesinde besinlerin içerdiği antioksidanların büyük rolünün olduğu ve yine önemli hastalıkların tanı, tedavi ve teşhisinde enzimlerin önemi kanıtlanmıştır. Bu nedenle antioksidanların belirlenmesi; özellikle tıp, gıda ve biyokimya alanlarında son derece önemlidir. Birçok biyoanalitik metot kullanarak belirtilen flavon türevlerinin antioksidan kapasiteleri belirlenmiş ve standart antioksidan olarak kabul gören BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\alpha$ -tokoferolün suda çözünen bir analogu olan troloks ile mukayese edilmiştir. Ayrıca hCA, AChE, BChE ve LPO enzimleri üzerine inhibisyon parametreleri tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Flavon türevlerinin numaralandırılması ve açık yapıları

| Kısaltma Numarası | Açık Formülü                                                                        | İsimlendirmesi         |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1                 |    | 3',4'-Dihidroksiflavon |
| 2                 |    | 6-Hidroksiflavon       |
| 3                 |    | 7-Hidroksiflavon       |
| 4                 |    | 5-Hidroksiflavon       |
| 5                 |  | 4'-5-Hidroksiflavon    |
| 6                 |  | 5,7-Hidroksiflavon     |

### 3. MATERİYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada esnasında kullanılan kimyasallardan standart serum albümin, Sepharose-4B, L-tirozin ve *p*-nitrofenil asetat Sigma Aldrich Chemical Company'den; sodyum bikarbonat, sülfanilamid, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum perklorat, sodyum hidroksit, 2-merkaptoetanol, sodyum sülfat, brom timol mavisi, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, sülfirik asit, metanol, fosforik asit, hidrojen peroksit, sodyum barbital, akrilamid, etanol, izoproponal, coomassie brilliant blue R-250 ve N,N'-metilen bisakrilamid E. Merk AG'den; karbondioksit gazı laboratuardan temin edilmiştir. Riboflavin, 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), nitroblu tetrazolium (NBT), metiyonin, 3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin),  $\alpha$ -tokoferol, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH $\cdot$ ) radikali, asetilkolin esterase enzimi, Butiril kolin esterase enzimi, 5,5'Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), asetilkolin tiyoiyodür, trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich, Germany'den ve 5-Hidroksiflavin, 6-Hidroksiflavin, 7-Hidroksiflavin, 5,7-Dihidroksiflavin, 4',5-Dihidroksiflavin ve 3',4'-Dihidroksiflavin Alfa Aesar, Germany ticari olarak satın alınmıştır.

##### 3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

|                                   |                           |
|-----------------------------------|---------------------------|
| UV-VIS Spektrofotometre           | : Shimadzu, UV-1208       |
| Derin dondurucular (-30 ve -86°C) | : Sanyo, Japan            |
| Soğutmalı santrifüj               | : Hermle Z 323 K(Germany) |
| Peristaltik pompa                 | : İsmatec                 |
| pH metre                          | : Thermo                  |

|                            |                                                                     |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Elektroforez tankı         | : Bio rad (dikey)                                                   |
| Karıştırıcı (Shaker)       | : IKA KS 130 basic                                                  |
| Hassas terazi              | : Denver Instrument                                                 |
| İnkübatör                  | : Wiseven                                                           |
| Otomatik pipetler          | : Eppendorf ve Socorex                                              |
| Çalkalayıcı                | : Nüve SL 350                                                       |
| Vorteks                    | : Fisons, Whirlimixer                                               |
| Saf su cihazı              | : Firstreem Calypso MK 1 Glass Still                                |
| Magnetik karıştırıcı       | : Jeio Tech                                                         |
| UV-Spektrofotometre küveti | : 1 cm <sup>3</sup> 'lük Kuartz ve 3 cm <sup>3</sup> 'lük Cam Küvet |

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlama şekilleri aşağıda açıklanmıştır.

#### Afinite kolonlarının hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

1. pH 10, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu: 200 mL destile suda 2,1 g NaHCO<sub>3</sub> çözüldü ve 1 N NaOH ile pH 10'a ayarlandıktan sonra, son hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı. (Sepharose-4B ye takıldıktan sonra fazla tirozinin uzaklaştırılmasında kullanıldı).
2. pH 8,8, 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu: 200 mL destile suda 4,2 g NaHCO<sub>3</sub> çözüldü ve 1N NaOH ile pH 8,8'e ayarlandıktan sonra, son hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı (Tirozin bağlandıktan sonra jeli muhafaza etmede kullanıldı).
3. pH 7,4, 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu: 150 mL destile suda 1,211 g Tris çözüldü ve 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra, son hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı (Afinite jeline ligand bağlandıktan sonra fazla ligandın uzaklaştırılmasında kullanıldı).

### **hCA I-II izoenziminin saflaştırma işlemlerinde ve aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**

1. pH 8,7, 25 mM Tris-HCl / 0,1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu: 950 mL destile suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, çözüldü ve 1 N HCl ile pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 1 L tamamlandı (Afinite kolonunun dengelenmesinde kullanıldı).
2. pH 8,7, 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu: 950 mL destile suda 3,026 g Tris ve 3,124 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözüldü ve 1 N HCl ile pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı (Afinite kolonunun yıkanmasında kullanıldı).
3. pH 6,3, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 1 M NaCl tamponu: 200 mL destile suda 2,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 14,625 g NaCl çözüldü ve 1 N HCl ile pH 6,3'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 250 mL'ye tamamlandı (hCA I izoenziminin kolondan elüe etmek için kullanıldı).
4. pH 5,6, 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> tamponu: 120 mL destile suda 9,19 g NaClO<sub>4</sub> ve 2,04 g CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O çözüldü ve 1.0 N HCl ile pH'sı 5,6 ya ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 150 mL'ye tamamlandı (hCA II izoenziminin kolondan elüe etmek için kullanıldı).
5. pH 7,4, 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu: 950 mL destile suda 6,055 g Tris çözüldü ve 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı (Enzim aktivite ölçümlerinde kullanıldı).
6. 2,98 mM *p*-Nitrofenilasetat çözeltisi: 0,0135 g *p*-Nitrofenilasetat 1 mL aseton da çözüldü ve son hacim destile su ile 25 mL'ye tamamlandı (hCA aktivite ölçümünde substrat olarak kullanıldı).

### **AChE enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. pH 8,0 ve 1 M'lık Tris-HCl tamponu: 200 mL destile suda 30,27 g ve 0,370 g EDTA çözüldü ve 1,0 N HCl ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. 10 mM'lık Asetilkolintiyoiyodür çözeltisi: 50 mL destile suda 0.145 g Asetilkolintiyoiyodür çözülerek hazırlandı.

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) çözeltisi: 50 mL destile su içerisinde 0.01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat çözülerek hazırlandı.

#### **BChE enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. pH 8,0, 1 M'lık Tris-HCl tamponu: 200 mL destile suda 30,27 g ve 0,370 g EDTA çözüldü ve 1 N HCl ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. 5 mM'lık Bütirilkolintioyodür çözeltisi: 100 mL destile suda 0,14 g Bütirilkolintioyodür çözülerek hazırlandı.
3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi: 25 mL destile su içerisinde 3,4 mg DTNB çözülerek hazırlandı.

#### **LPO enziminin saflaştırma işlemlerinde ve aktivite tayininde kullanılan çözeltiler**

1. pH 6,8, 5 mM NaCH<sub>3</sub>COO tamponu: 950 mL destile suda 0,4 g NaCH<sub>3</sub>COO, çözüldü ve 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı (Homojenat hazırlama esnasında Amberlite CG 50 H<sup>+</sup> reçinesinin şişirilmesinde kullanıldı).
2. pH 6,8, 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO tamponu: 100 mL destile suda 0,1968 g NaCH<sub>3</sub>COO çözüldü ve 1N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 120 mL'ye tamamlandı (Homojenat hazırlama esnasında süt reçine karışımının yıkanmasında kullanıldı).
3. pH 6,8, 2 M NaCH<sub>3</sub>COO tamponu: 50 mL destile suda 19,68 g NaCH<sub>3</sub>COO çözüldü ve 1N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 60 mL'ye tamamlandı (Homojenat hazırlama esnasında süt ve reçine karışımında bulunan ham enzim ekstraktının elüsyonu için kullanıldı).
4. pH 6,8, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu: 950 mL destile suda 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözüldü ve 1 N NaOH ile pH 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı (Afinite kolonunun dengelenmesinde kullanıldı).

5. pH 6,8, 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu: 350 mL destile suda 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözüldü ve 1 N NaOH pH 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı (Afinite kolonunun yıkanmasında kullanıldı).
6. pH 6,8, 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 1 M NaCl tamponu: 150 mL destile suda 0,6805 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 11,5 g NaCl çözüldü ve 1 N NaOH ile pH 6,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı (LPO enzimini kolondan elüe etmek için kullanıldı).
7. pH 6,0, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tamponu: 950 mL destile suda 12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözüldü ve 1 N NaOH ile pH 6,0'ya ayarlandıktan sonra son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı (ABTS substratının hazırlanmasında kullanıldı).
8. 1 mM ABTS substratı: 0,055 g ABTS önceden hazırlanmış pH 6,0 olan 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tamponunun 100 mL'si içinde çözüldü (LPO aktivite ölçümünde substrat olarak kullanıldı).
9. 3,2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  substratı: Yoğunluğu 1,11 g/mL olan %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den 32  $\mu\text{L}$  alındı ve son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı (LPO aktivite ölçümünde substrat olarak kullanıldı).

#### **$\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. pH 6,6, 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu: 180 mL destile suda 6,24 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 6,6'ya ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
2. %1'lik  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  çözeltisi: 100 mL destile suda 1,5 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  tamamen çözüldükten sonra destile su ile son hacim 150 mL'ye tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisi: 80 mL destile suda 10 g TCA tamamen çözüldükten sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
4. %0,1'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi: 40 mL destile suda 85 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  tamamen çözüldükten sonra destile su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

### **Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,01 M'lık  $\text{CuCl}_2$  çözeltisi: 40 mL destile suda 47 mg  $\text{CuCl}_2$  tamamen çözündükten sonra destile su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
2.  $7,5 \times 10^{-3}$  M'lık etanolik neokuprin çözeltisi: 40 mL etanolde 78 mg Neokuprin tamamen çözündükten sonra etanol ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
3. pH 6,5 ve 1.0 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponu: 80 mL destile suda 7,7 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  çözüldü ve 1.0 N NaOH ile pH'sı 6,5'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

### **FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler**

1. pH 3,6, 0,3 M'lık  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  tamponu: 80 mL destile suda 2,46 g  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 3,6'ya ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 40 mM'lık HCl çözeltisi: 0,334 mL %37 lik HCl'den alındıktan sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
3. 10 mM'lık TPTZ çözeltisi: 100 mL 40 mM'lık HCl'in içerisinde 0,312 g TPTZ çözüldü.
4. 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi: 100 mL destile sudu 0,54 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözüldü.
5. FRAP reaktifi: 10 mM'lık TPTZ, 0,3M'lık asetat tamponu, 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  çözeltilerinden 1:3:1 oranlarında alınarak hazırlandı.

### **DPPH<sup>-</sup> serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili**

1.  $10^{-3}$  M'lık DPPH<sup>-</sup> çözeltisi: 100 mL etanolde 40 mg DPPH<sup>-</sup> tamamen çözününceye kadar bir gece boyu karıştırıldı.

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

1. pH 7,4, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu: 180 mL destile suda 2,84 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 6,6'ya ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
2. 2 mM'lık ABTS çözeltisi: 100 mL hacimdeki 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponunun içerisinde 11 mg ABTS bir gece boyunca tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.
3. 2,5 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltisi: 100 ml hacimdeki 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponunun içerisinde 66,25 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> bir gece boyunca tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

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

1. pH 5,3, 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa tamponu: 230 mL destile suda 2,05 g CH<sub>3</sub>COONa çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 5,3'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 250 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M DMPD çözeltisi: 10 mL destile suda 209 mg DMPD çözüldü.
3. 0,001 M'lık DMPD<sup>++</sup> çözeltisi: 100 mL 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa (pH 5,25) tamponu içerisine 0,1 M'lık DMPD çözeltisinden ilave edildi. Daha sonra bu karışım üzerine 0,2 mL 0,05 M'lık FeCl<sub>3</sub> ilave edildi.
4. 0,05 M'lık FeCl<sub>3</sub> çözeltisi: 100 mL destile su içerisinde 0,81 g FeCl<sub>3</sub> çözüldü.

### **Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. pH 7,8, 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu: 180 mL destile suda 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 7,8'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.
2. 1,33x10<sup>-5</sup> M'lık riboflavin çözeltisi: 100 mL 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,8) içerisinde 12 mg riboflavin tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.
3. 4,46x10<sup>-5</sup> M'lık metiyonin çözeltisi: 100 mL 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,8) içerisinde 0,665 mg metiyonin tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

4.  $8,15 \times 10^{-8}$  M'lık NBT çözeltisi: 50 mL 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,4) içerisinde 6,1 mg NBT çözüldü.

#### **Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 2 mM'lık  $\text{FeCl}_2$  çözeltisi: 50 mL etanol içerisinde 0,014 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$  çözüldü.
2. 5 mM'lık ferrozin çözeltisi: 50 mL etanol içerisinde 12 mg ferrozin tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

#### **Total antioksidan aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. pH 7,4, 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tamponu: 80 mL destile suda 0,48 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözüldü ve 1 N NaOH ile pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması: 50 mL 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4) tamponu içerisine 265  $\mu\text{L}$  linoleik ilave edildikten sonra Tween-20 ilave edilerek hazırlanan çözelti homojenize hale getirildi.
3. %3,5'luk HCl çözeltisi: 9,46 mL %37'lik HCl'den alındıktan sonra destile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
4. 20 mM  $\text{FeCl}_2$  çözeltisi: 80 mL %3,5'luk HCl içerisinde 281 mg  $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$  çözüldükten sonra %3,5'luk HCl ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
5. %30'luk  $\text{NH}_4\text{SCN}$  çözeltisi: 35 mL destile suda 15 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  çözüldükten sonra destile su ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

#### **Çalışmamızda kullanılan inhibitör stok çözeltiler**

1. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltileri: 0,001 mL etanol içerisinde 0,001 mg flavon türevleri çözüldü.

### 3.2. Yöntemler

#### 3.2.1. hCA I-II ve LPO enzimleri saflaştırma çalışmaları

##### 3.2.1.a. hCA enzim hemolizatının hazırlanması

İnsan kanından elde edilen eritrosit Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi ve saflaştırma işlemi yapılacağı zamana kadar +4°C'de muhafaza edildi. Taze olarak temin edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su içerisine alındı ve magnetik karıştırıcı üzerinde 20 dk karıştırıldı. Böylece eritrosit hücreleri hemoliz olmuş oldu. Hemoliz olan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için 20.000xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin üst kısmındaki süpernatant dikkatli bir şekilde damlalık yardımıyla alındıktan sonra saflaştırma işlemleri yapılncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

##### 3.2.1.b. LPO enzim homojenatının hazırlanması

Çalışmalar esnasında kullanılan sığır sütü günlük taze olarak yerel üreticilerden temin edildi. 1 L sığır sütündeki yağı tamamen uzaklaştırmak için 2.700 rpm'de (4°C) 15 dakika 3 kez santrifüj edildi. Yağı alınmış sütün tamamı bir gece önce 200 mL 5 mM NaCH<sub>3</sub>COO (pH 6,8) tamponu içerisinde şişirilmiş zayıf asidik katyon değiştirici Amberlite CG 50 H<sup>+</sup> reçinesi üzerine ilave edildi ve magnetik karıştırıcı üzerinde 4°C'de 1 saat karıştırıldı. 1 saat karışma işlemi sonrasında karışım 30 dk dinlenmeye bırakıldı. Daha sonra üstte kalan süpernatant dekante edilerek uzaklaştırıldı. Çökelek önce 2 L destile suyla daha sonra ise 1 L ve 5 mM NaCH<sub>3</sub>COO (pH 6,8) tamponuyla iyice yıkandı. Son olarak 20 mM NaCH<sub>3</sub>COO (pH 6,8) tamponunun 120 mL'si ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye iyice yıkandı. Anyonik reçineye bağlı halde bulunan protein çökeleği 2 M NaCH<sub>3</sub>COO (pH 6,8 ) tamponunun 60 mL'si ile elüe edildi ve saflaştırma işlemleri yapılncaya kadar -80°C de muhafaza edildi.

### 3.2.2. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinden afinite jeli sentezlendi. Hazırlanan bu afinite jeline uzantı kolu olarak L-Tirozin kovalent bağ ile bağlandı. Son olarak ligand olarak diazolanmış sülfanilamid tirozine takıldı. Ligand olarak kullanılan sülfanilamid hem hCA hemde LPO'nun spesifik bir inhibitörü olup, hCA ve II izoenzimleri ve LPO enzimlerini saflaştırılmak amacı ile kullanıldı.

#### 3.2.2.a. CNBr aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

250 mL soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 10) tamponu ile yıkanan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B bir beherin içerisine alındı. Daha sonra üzerine içerisinde 80 mg tirozin çözünmüş halde bulunan 20 mL 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 10) tamponu behere ilave edildi. Elde edilen karışım 4°C'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldıktan sonra 16 saat boyunca 4°C'de reaksiyonun tamamlanması için bekletildi. 16 saat sonunda reaksiyona girmeyen tirozin uzaklaştırmak için bol miktarda destile su ile yıkandı. Bu işleme 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Daha sonra yıkama işlemine 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,8) tamponu ile devam edildi ve tirozin bağlanmış olan jel aynı tamponun 40 mL'si içine aktarıldı.

#### 3.2.2.b. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye sülfanilamid kenetlendirilmesi

0°C'de 10 mL 1.0 M HCl içinde 25 mg sülfanilamid çözüldü ve 0 °C'deki 5 mL destile su içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan çözelti yavaş bir şekilde bir birine karıştırıldı. 10 dk sonunda diazonyum tuzu haline gelmiş olan sülfanilamid bir gece önceden hazırlanmış olan 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin karışımı üzerine damla damla ilave edildi. Karışımın pH'sı 1.0 M NaOH yardımıyla 9,5'a getirildi ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında yavaş bir şekilde karıştırıldı. 3 saatlik süre sonrasında 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponuyla iyice yıkanarak reaksiyona girmeyen sülfanilamid ortamdan uzaklaştırıldı. Aynı tamponun içerisine alınan jel pekatlenmek üzere buzdolabında muhafaza edildi.

### 3.2.3. Afinite jelinin kolona paketlenmesi

Sentezlenmiş halde bulunan jel kolon dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH 7,8) içerisine alındı ve su trombu yardımıyla jel içerisindeki hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik cam bir kolona paketlenerek saflaştırma işlemlerinde kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edildi.

### 3.2.4. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

#### 3.2.4.a. hCA enzimi için numune tatbiki ve elüsyonu

Önceden hazırlan kolon peristaltik pompaya bağlanarak dengeleme tamponuyla dengelendi. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra insan eritrositlerinden elde edilen hemolizat katı Tris yardımıyla pH'sı 8,7'ye getirildikten sonra kolona yüklendi ve kolon 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 8,7) tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi safsızlıklar uzaklaşıncaya kadar devam etti. Daha sonra 1.0 M NaCl / 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,3) tamponu ile hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH 5,6) tamponu yardımıyla kolona tutunmuş olan hCA II enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere toplandı ve 280 nm'deki absorbansları kontrol edildikten sonra diyaliz edilerek inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de depolandı.

#### 3.2.4.b. LPO enzimi için numune tatbiki ve elüsyonu

Önceden hazırlan kolon peristaltik pompaya bağlanarak dengeleme tamponuyla dengelendi. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra sığır sütünden hazırlanan homojenat kolona yüklendi ve kolon 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi safsızlıklar uzaklaşıncaya kadar devam edildi. Daha sonra 1.0 M NaCl / 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,8) tamponu ile kolona tutunmuş olan LPO enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere toplandı ve 280 nm'deki absorbansları kontrol edildikten sonra diyaliz edilerek inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de depolandı.

### 3.2.5. Enzimlerin aktivite tayin yöntemleri

#### 3.2.5.a. hCA enzimi için esteraz aktivitesi

CA enziminin esteraz aktivitesine sahip olmasından dolayı bu yöntem kullanılmaktadır. Bu metod; CA substratı olan p-nitrofenilasetatın hidrolizi sonucu meydana gelen p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'ın absorbans artışının 348 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şemada gösterilmiştir.

Enzimin numune küvetine ilavesi ile reaksiyon başlar ve 3 dakikalık süre boyunca her 60 saniyede bir 348 nm'de absorbans da meydana gelen artış spektrofotometre cihazı ile 1 cm'lik ışık yoluna sahip 1 mL'lik quartz küvet ile belirlendi. Aktivite ölçüm işleminde kullanılan çözeltiler ve miktarları aşağıda verildiği şekilde uygulandı (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** hCA enzimi için esteraz aktivitesi pipetleme prosedürü

| Kullanılan Maddeler                   | Kontrol Tüpü (µL) | Numune Tüpü (µL) |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|
| Tris-SO <sub>4</sub> (pH 7,4, 0,05 M) | 467               | 467              |
| p-Nitrofenilasetat                    | 333               | 333              |
| Destile su                            | 200               | 167              |
| Enzim çözeltisi                       | -                 | 33               |
| Toplam hacim                          | 1000              | 1000             |

#### 3.2.5.b. AChE enzim aktivitesi

Kolinesterazlar, asetilkolini parçalayarak tiyokolin ve asetat bileşiklerini açığa çıkarır. Reaksiyon sonucu meydana gelen tiyokolin, DTNB ile reaksiyon vererek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit meydana getirir. Oluşan bu sarı rengin absorbansı 5 dakika boyunca her 1 dakikada bir 412 nm'de belirlendi. Aktivite ölçüm işleminde kullanılan çözeltiler ve miktarları aşağıdaki verildiği şekilde uygulandı (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** AChE enzim aktivitesi pipetleme prosedürü

| Kullanılan Maddeler                            | Kontrol Tüpü (µL) | Numune Tüpü (µL) |
|------------------------------------------------|-------------------|------------------|
| Tris-HCl                                       | 100               | 100              |
| Destile su                                     | 790               | 780              |
| Örnek                                          | -                 | 10               |
| DTNB                                           | 50                | 50               |
| Enzim çözeltisi                                | 10                | 10               |
| (Çalkalanır ve 30°C’de 5 dakika inkübe edilir) |                   |                  |
| Asetilkolintiyoiyodür                          | 50                | 50               |
| Toplam hacim                                   | 1000              | 1000             |

**3.2.5.c. BChE enzim aktivitesi**

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin BChE üzerindeki etkisi araştırıldı. Daha sonra IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlemesine dayanır. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ve DTNB’nin reaksiyonuyla sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşturur. Örnek ve kör kuvvetlerinin 412 nm dalga boyunda 5 dakikada boyunca absorbansları ölçüldü. Aktivite ölçüm işleminde kullanılan çözeltiler ve miktarları aşağıdaki verildiği şekilde uygulandı (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** BChE enzim aktivitesi pipetleme prosedürü

| Kullanılan Maddeler    | Kontrol Tüpü (µL) | Numune Tüpü (µL) |
|------------------------|-------------------|------------------|
| Tris-HCl               | 100               | 100              |
| Destile su             | 790               | 780              |
| Örnek                  | -                 | 10               |
| DTNB                   | 50                | 50               |
| Enzim çözeltisi        | 10                | 10               |
| Bütirilkolintiyoiyodür | 50                | 50               |
| Toplam hacim           | 1000              | 1000             |

### 3.2.5.d. LPO enzim aktivitesi

Aktivite ölçümünün esası, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonik asit)) substratın yükseltgenmesi sonucu meydana gelen renkli ürünün 412 nm'deki absorbans artışının belirlenmesi esasına dayanır (Shindler and Bardsley 1975).

Enzimin numune küvetine ilavesi ile reaksiyon başlar ve 3 dakikalık süre boyunca her 60 saniyede bir 412 nm'de absorbans da meydana gelen artış spektrofotometre cihazı ile 1 cm'lik ışık yoluna sahip 3 mL'lik cam küvet ile belirlendi. Aktivite ölçüm işlemi kullarılan çözeltiler ve miktarları aşağıdaki verildiği şekilde uygulandı (Çizelge 3.4.).

**Çizelge 3.4.** LPO enzim aktivitesi pipetleme prosedürü

| Kullanılan Maddeler                    | Kontrol Tüpü (µL) | Numune Tüpü (µL) |
|----------------------------------------|-------------------|------------------|
| ABTS (1 mM)                            | 2900              | 2800             |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3,2 mM) | 100               | 100              |
| Enzim çözeltisi                        | -                 | 100              |
| Toplam hacim                           | 3000              | 3000             |

### 3.2.6. hCA I-II izoenzimleri, LPO, AChE, BChE enzimleri üzerine bazı flavon türevlerinin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi

Bazı flavon türevlerinin, hem afinite kolonlarından saflaştırılan CA izoenzimleri ve LPO için hemde ticari olarak satın alınan AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. İnhibisyon çalışmaları kapsamında her bir enzim için ayrı ayrı aktivite ölçüm yapılarak IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi. Belirlenen bu değerlerden çıkılarak K<sub>i</sub> çalışmaları yapıldı. K<sub>i</sub> çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlarla çizilen Lineweaver-Burk grafikleriyle K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

### 3.2.7. Antioksidan çalışmaları

#### 3.2.7.a. $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ indirgeme kapasitesi

$\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$  indirgeme kapasitesi tayini Oyaizu tarafından geliştirilen yöntemle yapıldı. Bu tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin 1 mg/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde deney tüplerine pipetlendi, hacim destile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Akabinde her bir tüpe 0,2 M'lık fosfat tamponundan (pH 6,6) 2,5 mL ve %1'lik potasyum ferrisiyanürden  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  2,5 mL ilave edilerek hazırlanan çözelti 50°C'de 20 dk inkübe edildi. Daha sonra aynı deney tüpüne 2,5 mL TCA (%10) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı ve bunun üzerine 0,5 mL %0,1'lik  $\text{FeCl}_3$  ve 2,5 mL destile su ilave edildikten sonra 700 nm'de köre karşı absorbands okundu. Destile su kör olarak kullanıldı.

#### 3.2.7.b. $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^+$ indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu)

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin  $\text{Cu}^{2+}$  indirgeme kapasiteleri  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarını indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) küçük bir modifikasyonuyla gerçekleştirildi (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan flavon türevleri deney tüplerine sırasıyla 0,25 mL 0,01 M  $\text{CuCl}_2$  çözeltisi, 0,25 mL 7,5 mM etanolik neokuprin çözeltisi ve 0,25 mL 1 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponu ilave edildi. Yaklaşık 30 dk bekledikten sonra 450 nm'de köre (destile su) karşı absorbands değerleri spektrofotometre yardımıyla gözlemlendi.

#### 3.2.7.c. FRAP indirgeme kapasitesi

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin hazırlanan stok çözeltileri FRAP indirgeme kapasitesi belirlemek amacıyla da kullanıldı. İlk etapta deney tüplerine 10, 20 ve 30  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde stok çözeltilerden deney ortamına katıldı. Total hacimleri 0,5 mL tampon çözelti ile tamamlandı. Deneyin

devamında deney ortamına sırasıyla 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3$  çözeltisinden 2250  $\mu\text{L}$  ve FRAP reaktifinden 2250  $\mu\text{L}$  ilave edildi. Böylece total hacin 5 mL'ye tamamlandı. Vortex yardımıyla karıştırılan çözeltilerin 10 dakikalık inkübasyondan sonra 593 nm'de absorbansları köre karşı (asetat tamponu) kaydedildi.

#### **3.2.7.d. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme aktivitesi**

Bu yöntem Blois metodu esas alınarak gerçekleştirildi (1958). DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi serbest radikal olarak kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler pipetlendi. Devamında her bir numune tüpüne stok DPPH' çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Total hacimleri 3 mL olması için etanol ile tamamlama işlemi yapıldı. 30 dk boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekledikten sonra spektrofotometrede etanoldan oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 1 mL DPPH ve 3 mL etanol çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan serbest radikal miktarını başka bir deyişle serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

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

Bu yöntem Re ve arkadaşlarının hazırladığı metodun küçük bir modifikasyonu ile yapıldı (1999). İlk etapta 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikallerinin oluşması sağlandı. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) ile  $0,700 \pm 0,025$  nm'ye ayarlandı. Numunelerin farklı konsantrasyonlarına (10-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 1'er mL ABTS radikal çözeltisi eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Etanoldan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbans değerleri gözlemlendi.

### 3.2.7.f. N,N'-dimethyl-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi

Bu yöntem Fogliano ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları metoda göre çalışıldı (1999). Bu kapsamda, ilk olarak renkli radikal katyon ( $\text{DMPD}^{+\cdot}$ ) elde etmek için 100 mL'lik DMPD çözeltisine (pH 5,3-100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 mL  $\text{FeCl}_3$  eklendi. Elde edilen çözeltinin 1 mL'si için 505 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. 0,1 M fosfat tamponu (pH 5,3) ile  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik yoğunluğu  $0,900 \pm 0,100$  nm'ye ayarlandı. Hazırlanan  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  çözeltisinin absorbansı 12 saate kadar kararlı kalabilmektedir. Standart antioksidanların ve numunelerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10-30  $\mu\text{g/mL}$ ) deney tüplerine pipetlendi ve hacim destile suyla 0,5 mL'ye tamamlandı. Bu karışım üzerine 1 mL  $\text{DMPD}^{+\cdot}$  çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 50 dk'lık bir beklemeden sonra absorbans değerleri 505 nm'de köre karşı (tampon çözelti) okundu.

### 3.2.7.g. Süperoksit anyon radikali ( $\text{O}_2^-$ ) giderme aktivitesi

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin süperoksit anyon radikali giderme etkisi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümü sayesinde belirlendi. Bunun için Zhishen ve arkadaşlarının (1999) kullandığı metot küçük bir değişimle kullanıldı (Gülçin 2010). Daha önce hazırlanan stok çözeltiler bu yöntem için de kullanıldı. İlk olarak numune ve standartların farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lık, pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazırlandı. İçinde örneklerin bulunduğu tampon çözeltiye riboflavin, metiyonin ve NBT'den  $1,33 \times 10^{-5}$ ,  $4,46 \times 10^{-5}$  ve  $8,15 \times 10^{-8}$  M konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde sırasıyla ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 40 dk boyunca 20 W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Köre karşı (destile su) 560 nm'de absorbans spektrofotometrik olarak kaydedildi.

### 3.2.7.h. Ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin Ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlama aktivitelerini belirlemek için Dinis ve arkadaşlarının geliştirdikleri metot kullanıldı (1994). Bu amaçla 2 mM ve 0,05 mL  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve 0,35 mL saf su içeren çözelti, değişik konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde numuneleri içeren 0,2 mL'lik çözeltiye eklendi. Son hacmin 4 mL olması için etanol eklendi. Reaksiyon 0,2 mL 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilavesiyle başlamış oldu. Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. Daha sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra örneklerin 562 nm'de absorbansı etanoldan oluşan köre karşı ölçüldü.

### 3.2.7.i. Total antioksidan aktivitesi

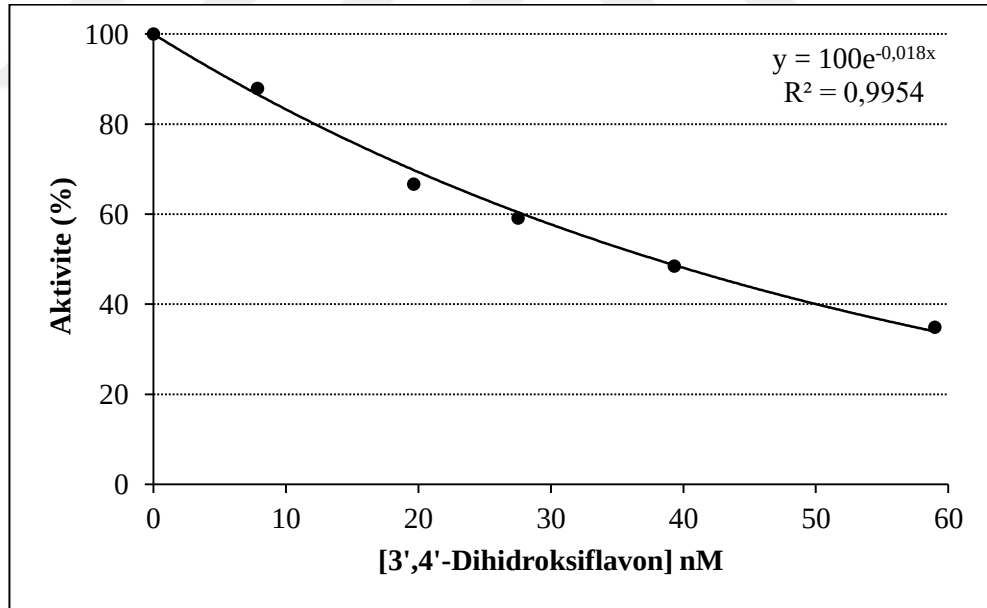
Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin total antioksidan aktivitesi tiyosiyanat metodu kullanılarak gözlemlendi (Yen and Chen 1995). Bunun için her zamanki hazırlanan stok çözeltiler kullanıldı. Belirtilen miktarlara karşılık gelecek şekilde stok çözeltiler vezin kaplarına otomatik pipetlendi. Total hacim (0,01 M, pH 7,4) tampon çözelti ile 2,5 mL'ye tamamlandı. Akabinde her bir vezin kabına 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu eklendi. Kontrol amaçlı 2,5 mL tampon çözeltisi ve 2,5 mL linoleik asit emülsiyonundan oluşan karışım kullanıldı. Karanlıkta ve 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Takip eden her 12 saatte bir vezin kaplarından 100'er  $\mu\text{L}$  alınarak 4,7 mL etanol bulunan deney tüplerine pipetlendi. Daha sonra sırasıyla 100  $\mu\text{L}$   $\text{Fe}^{2+}$  ve 100  $\mu\text{L}$   $\text{SCN}^-$  çözeltileri pipetlendi. Kör olarak kullanılacak numune ise 4,8 mL etanole 100  $\mu\text{L}$   $\text{Fe}^{2+}$  ve 100  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{SCN}$  çözeltileri pipetlenmesi ile oluşturuldu. Karışımların 500 nm'deki absorbansları oluşturulan köre karşı okundu. Bekletme işlemi kontrol değerinin maksimum absorbansa ulaştığı ölçümden sonra sonlandırıldı.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

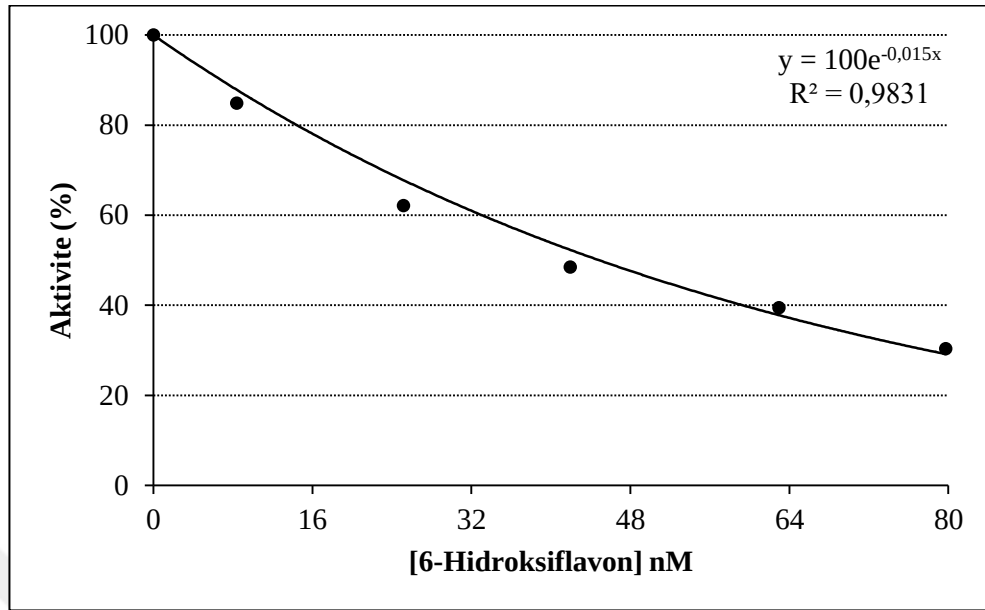
##### 4.1. Enzimler Üzerine Yapılan İnhibisyon Çalışmalarının Sonuçları

###### 4.1.1. hCA I izoenzimi için bulunan inhibisyon sonuçları

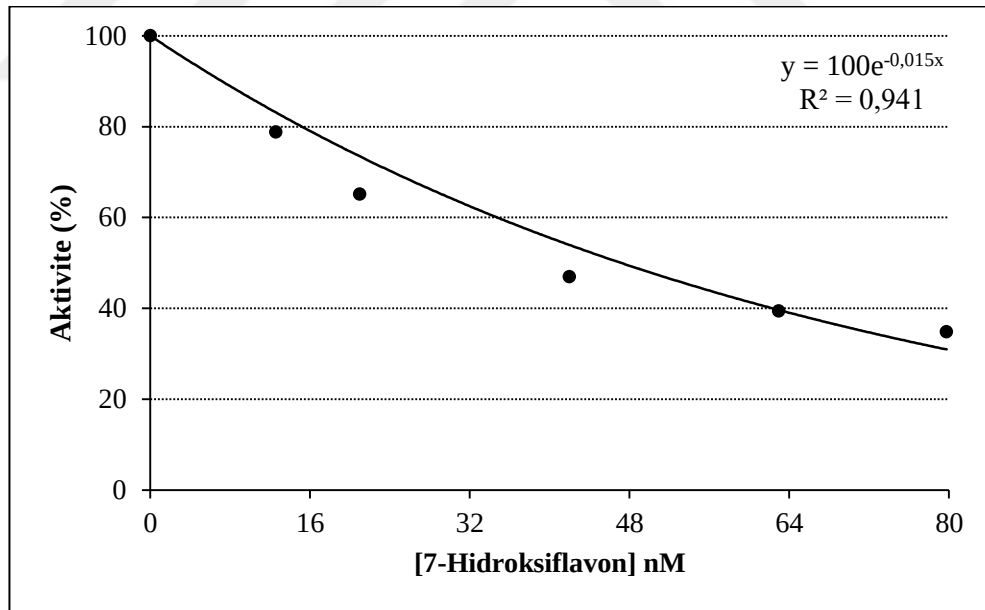
Bu çalışmada flavon türevlerinin insan kanı eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi üzerine *p*-nitrofenilasetat substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (*p*-Nitrofenilasetat 2.98 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite ölçümleri alındı. Elde edilen bu değerlerden Aktivite (%)-[İnhibitör] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Çizilen grafikler Şekil 4.1-4.6'da gösterildi.



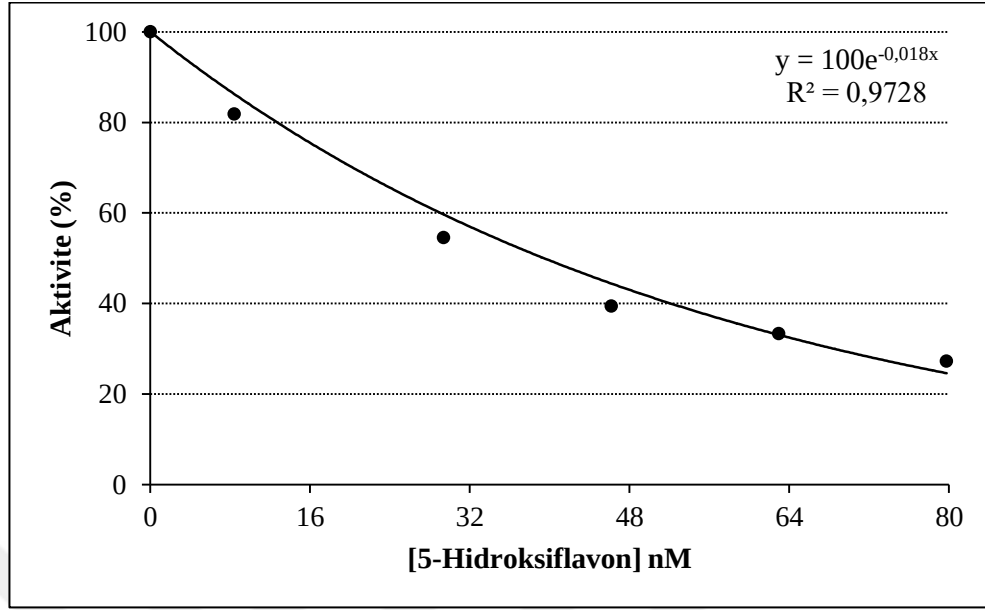
**Şekil 4.1.** hCA I enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği



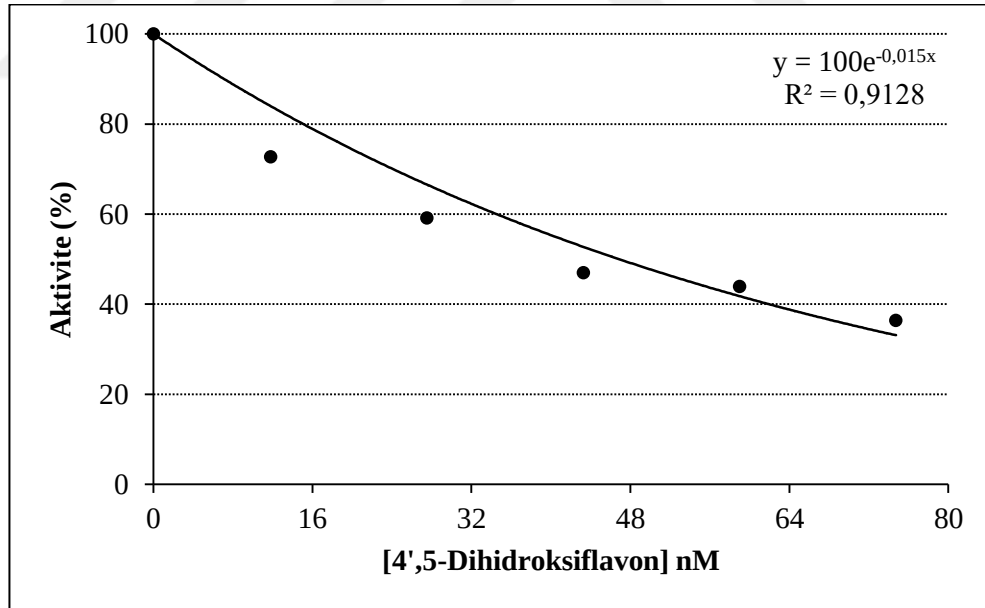
**Şekil 4.2.** hCA I enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği



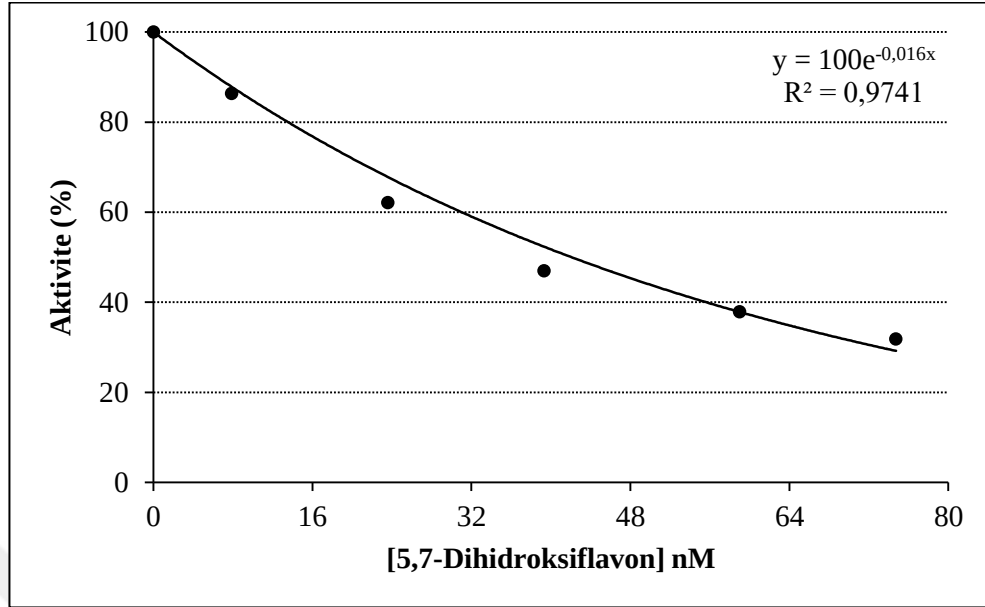
**Şekil 4.3.** hCA I enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği



**Şekil 4.4.** hCA I enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği

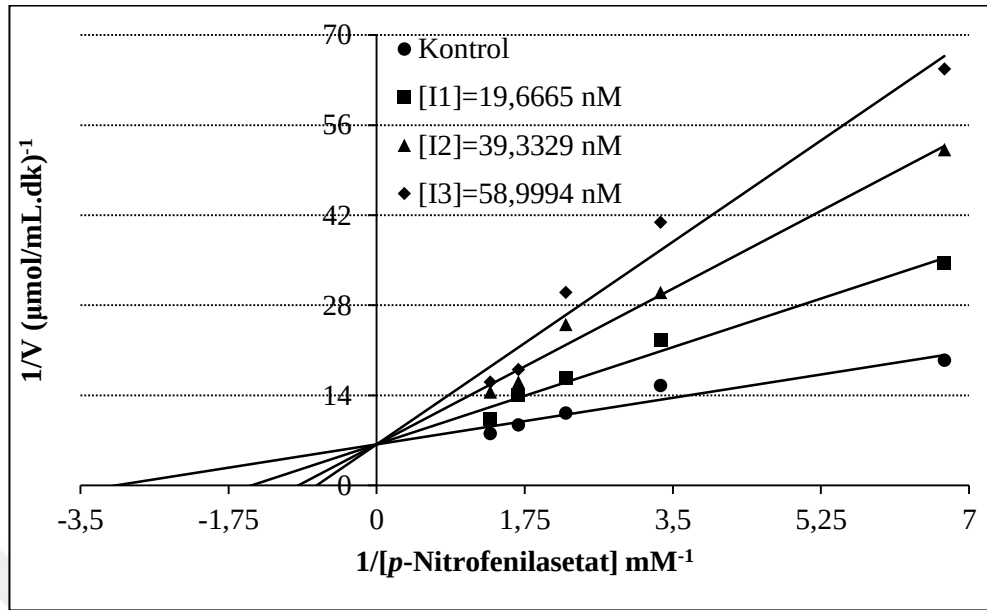


**Şekil 4.5.** hCA I enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği

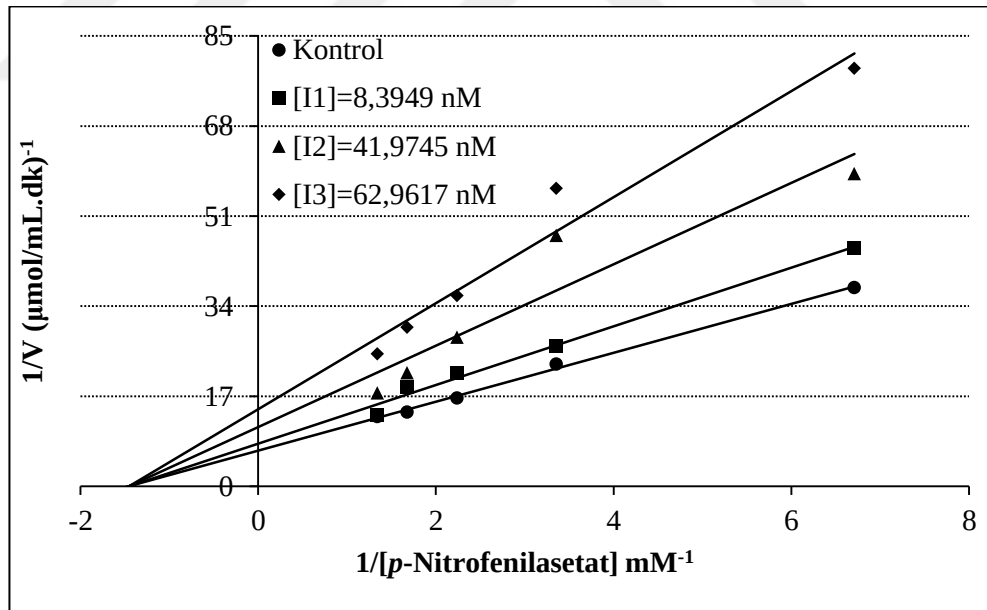


**Şekil 4.6.** hCA I enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği

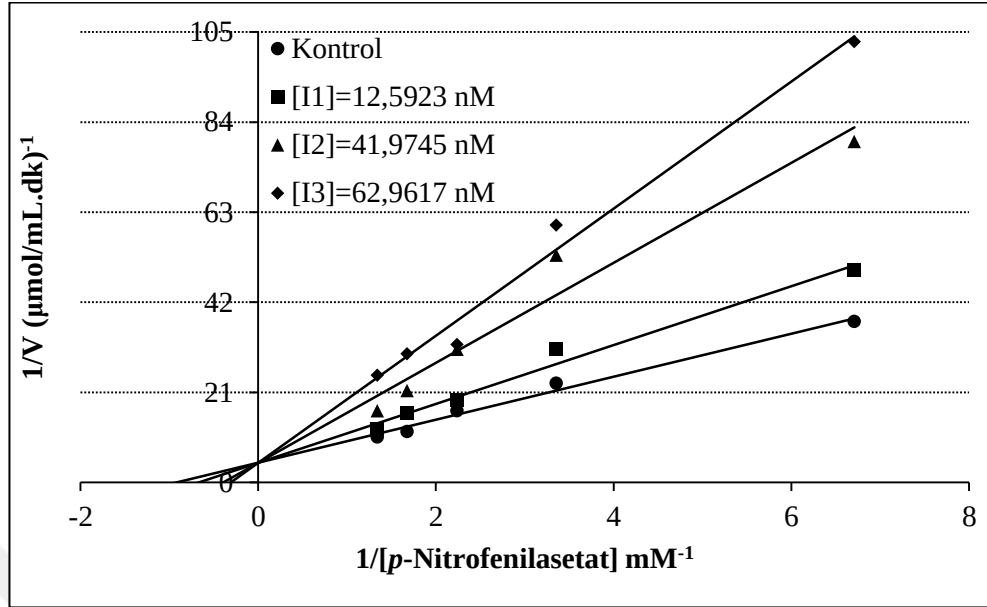
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı *p*-Nitrofenilasetat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.7-4.12’de gösterildi.



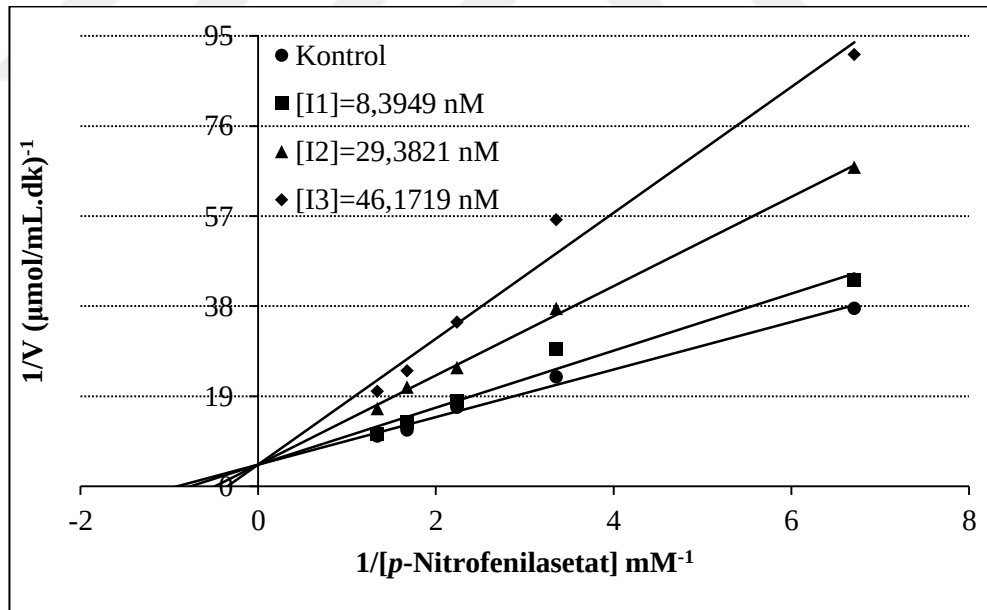
Şekil 4.7. hCA I enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



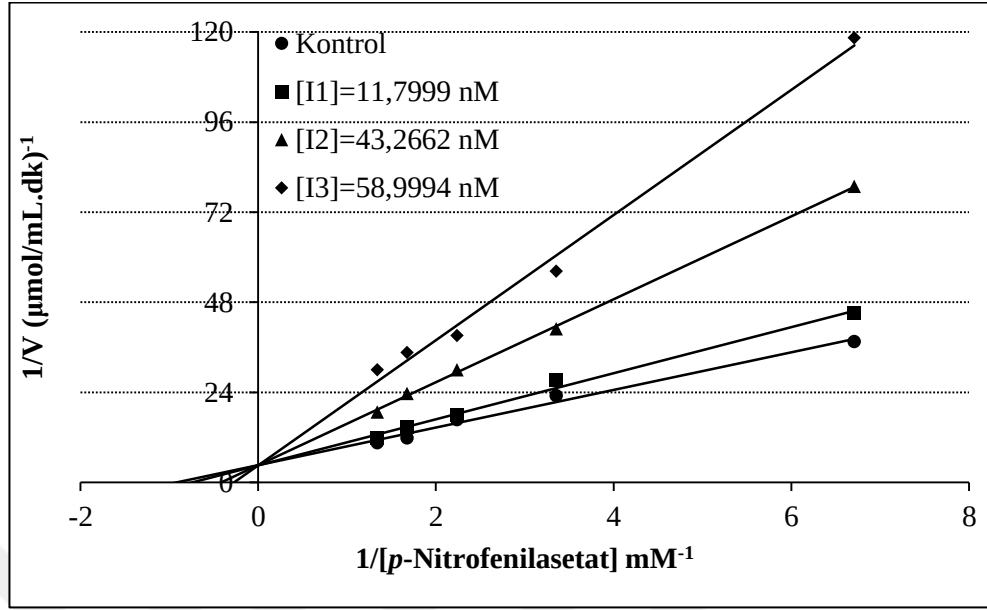
Şekil 4.8. hCA I enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



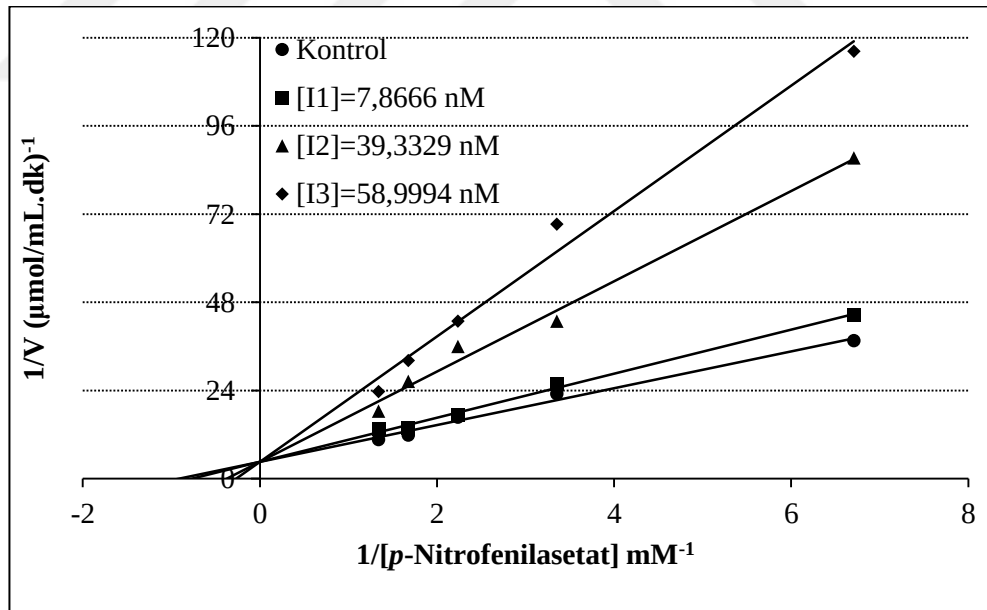
Şekil 4.9. hCA I enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. hCA I enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



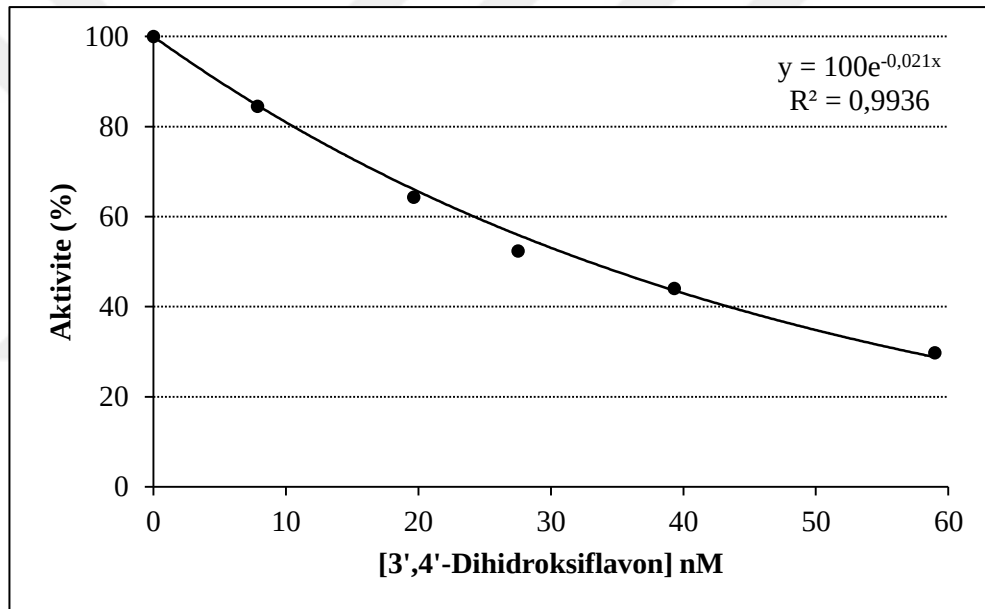
Şekil 4.11. hCA I enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



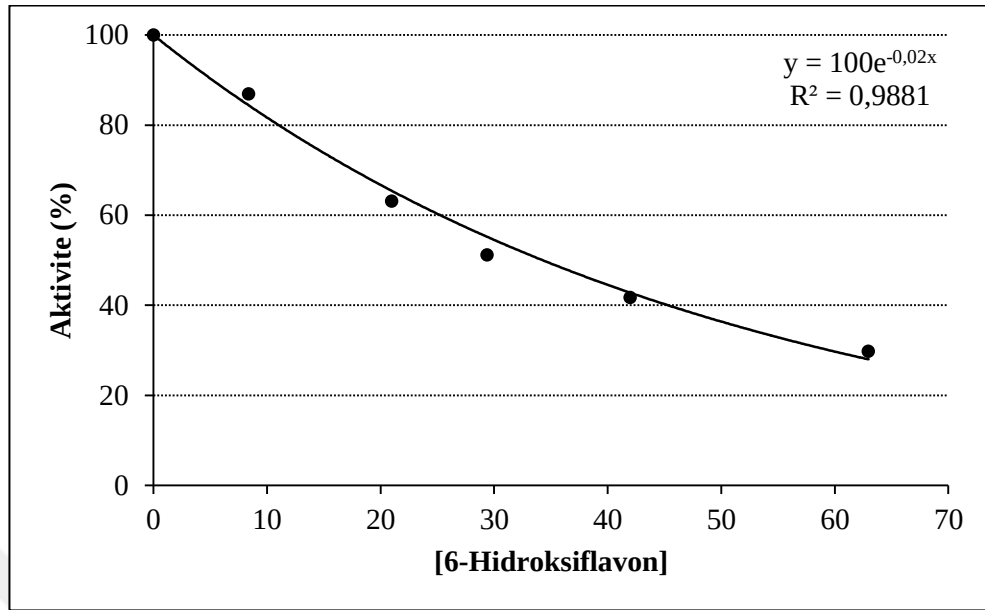
Şekil 4.12. hCA I enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.1.2. hCA II izoenzimi için bulunan inhibisyon sonuçları

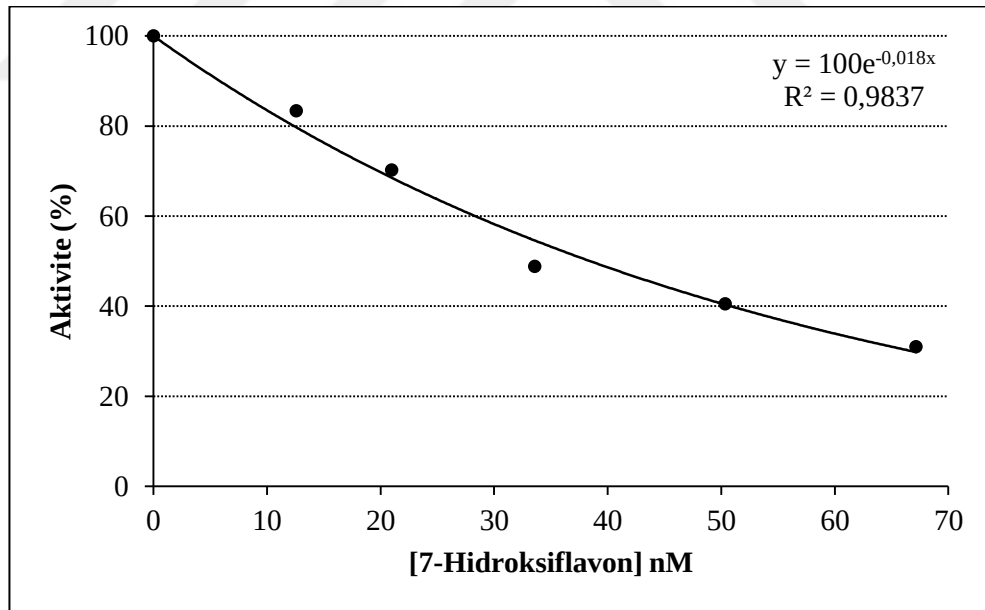
Bu çalışmada flavon türevlerinin insan kanı eritrositlerinden saflaştırılan hCA I enzimi üzerine *p*-Nitrofenilasetat substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit *p*-nitrofenilasetat konsantrasyonunda (2.98 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite ölçümleri alındı. Elde edilen bu değerlerden Aktivite (%)-[İnhibitör] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Çizilen grafikler Şekil 4.13-4.18'de gösterildi.



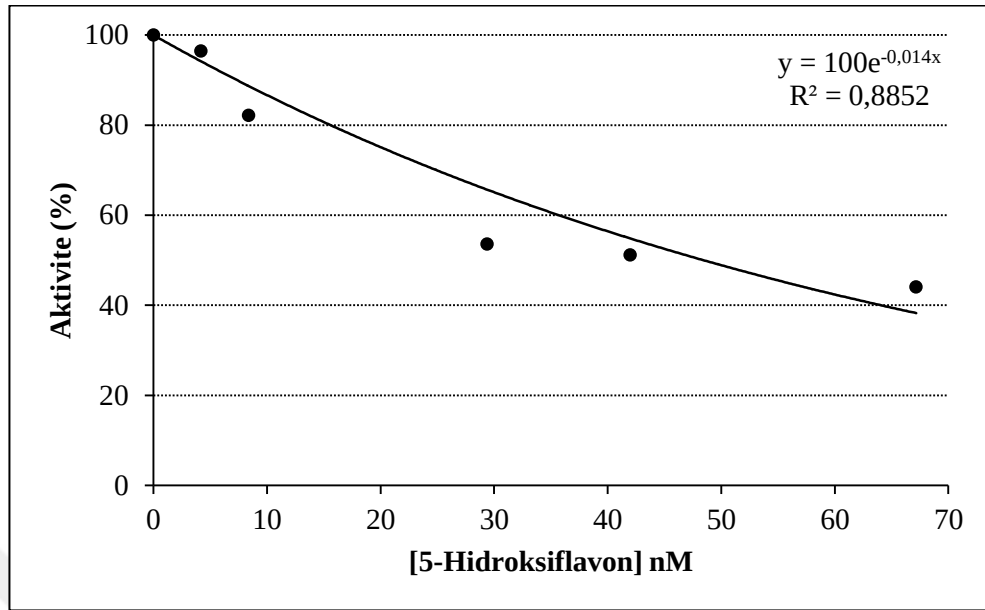
**Şekil 4.13.** hCA II enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği



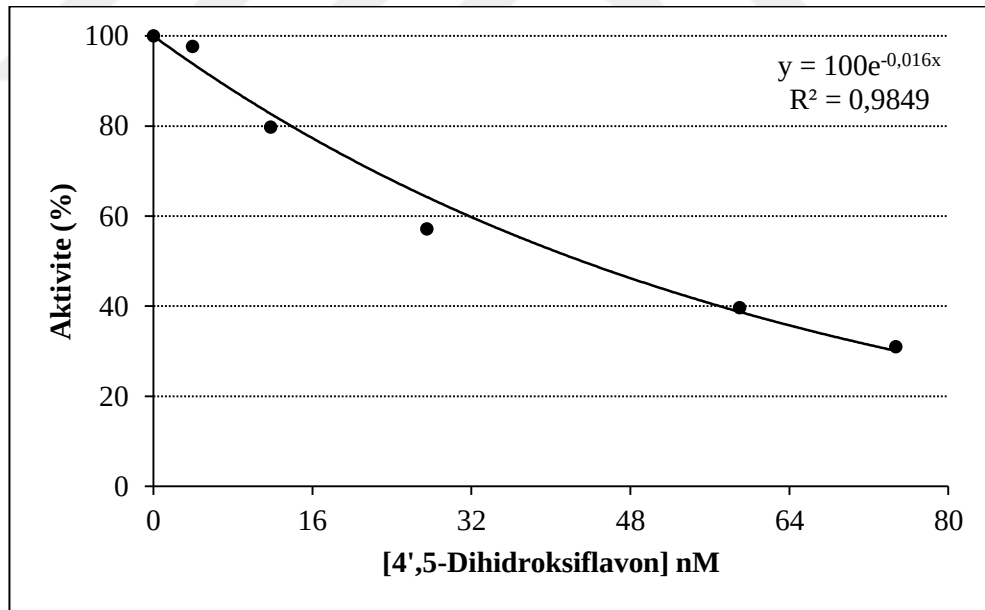
**Şekil 4.14.** hCA II enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği



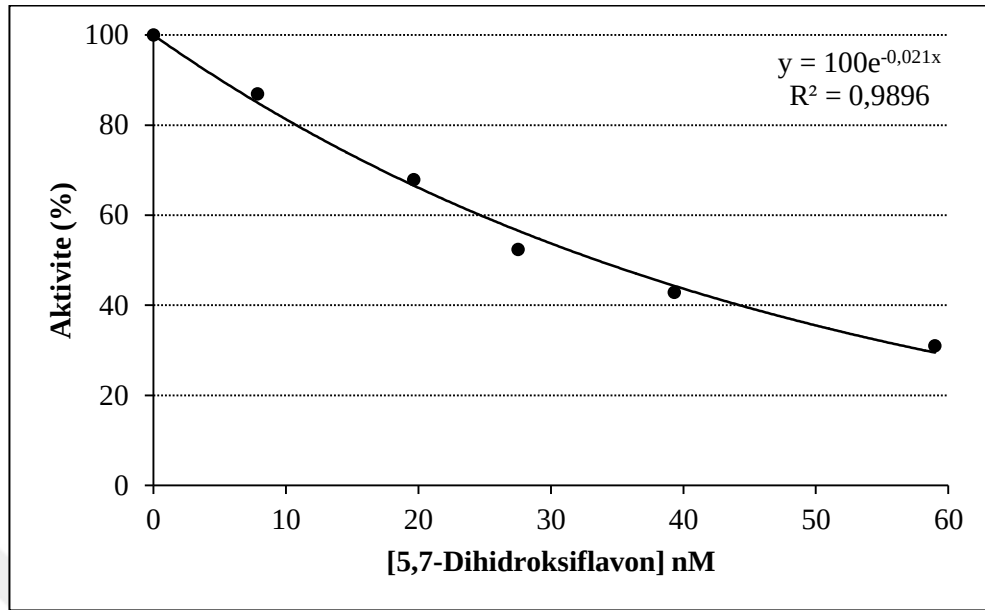
**Şekil 4.15.** hCA II enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği



**Şekil 4.16.** hCA II enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği

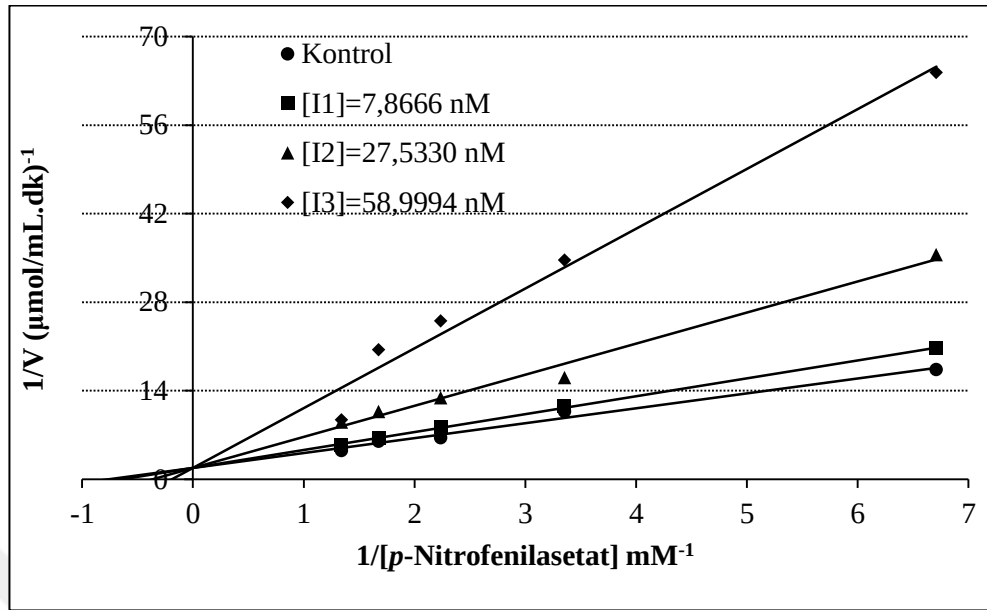


**Şekil 4.17.** hCA II enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği

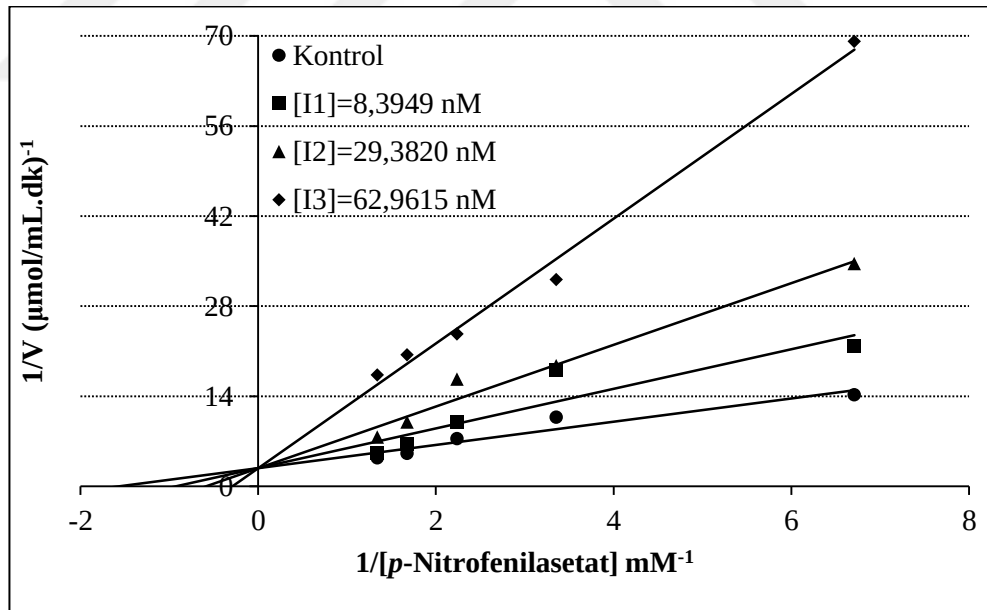


**Şekil 4.18.** hCA II enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavyon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavyon] grafiği

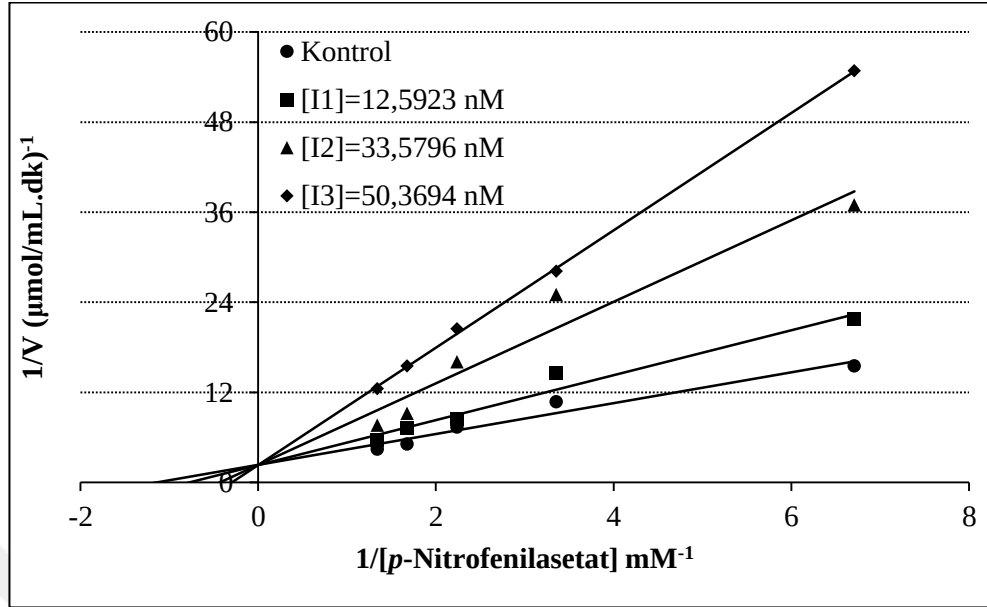
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı *p*-Nitrofenilasetat substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.19-4.24’de gösterildi.



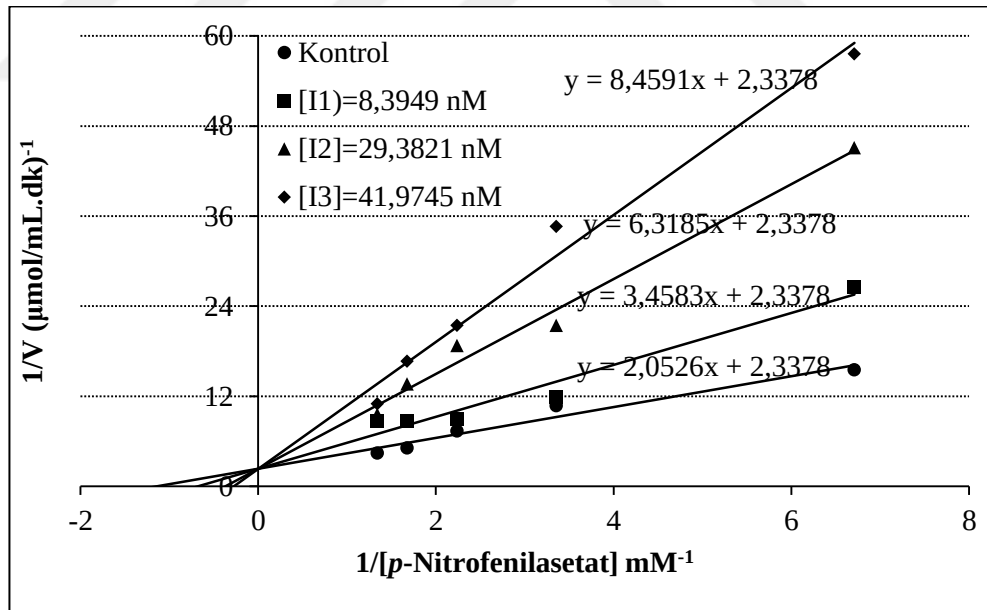
Şekil 4.19. hCA II enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



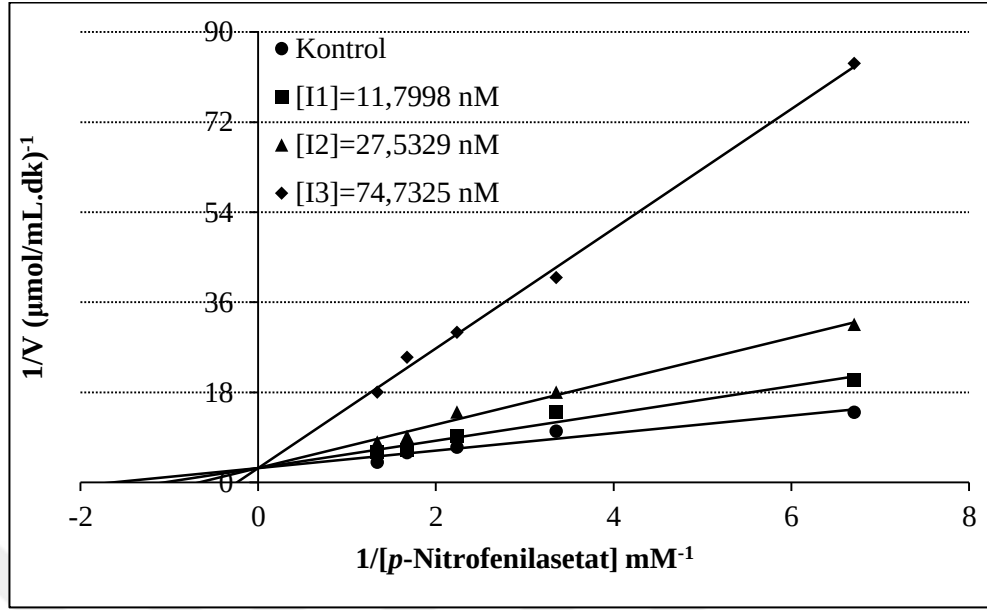
Şekil 4.20. hCA II enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



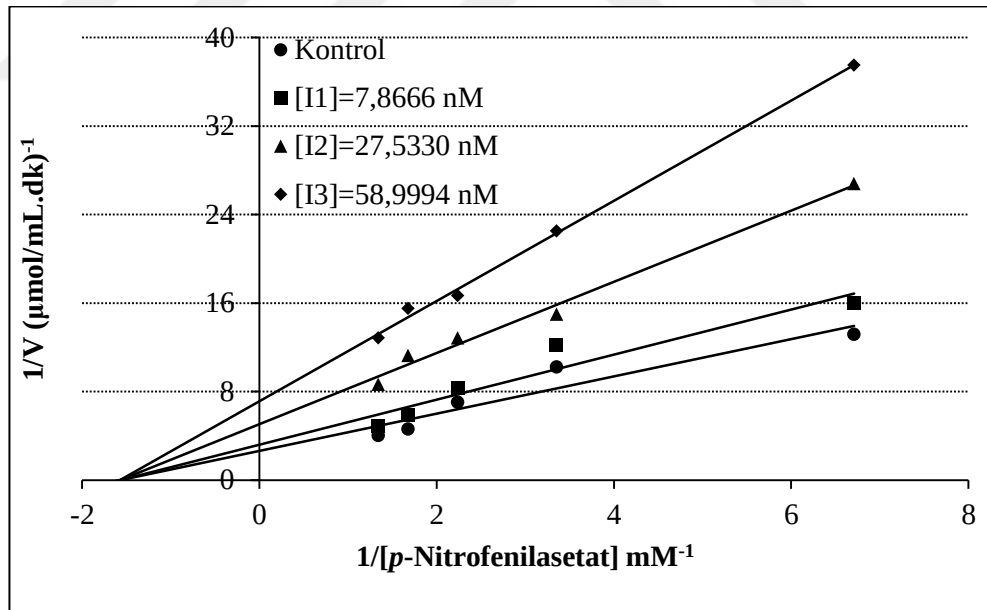
Şekil 4.21. hCA II enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.22. hCA II enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



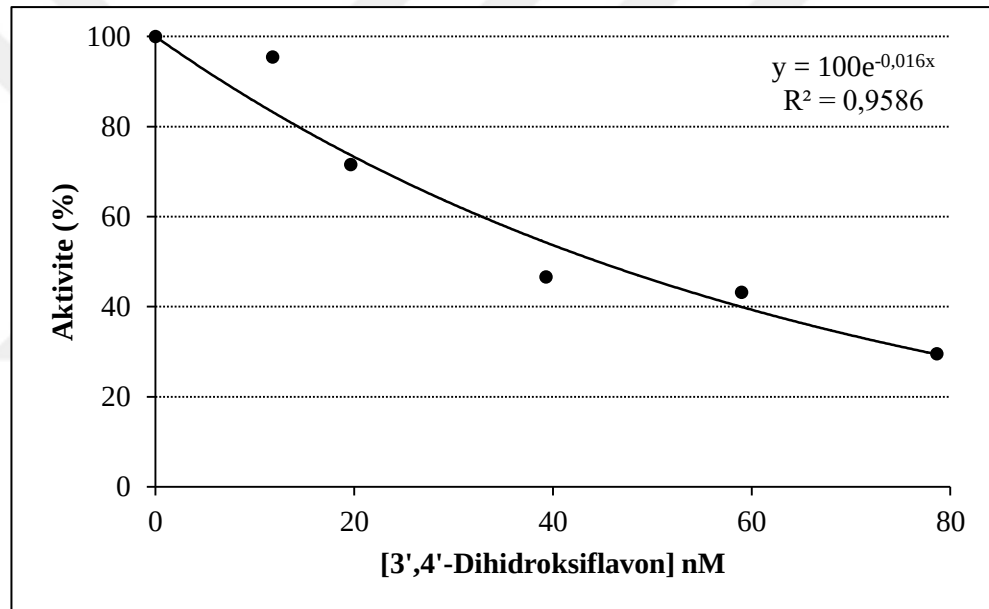
Şekil 4.23. hCA II enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



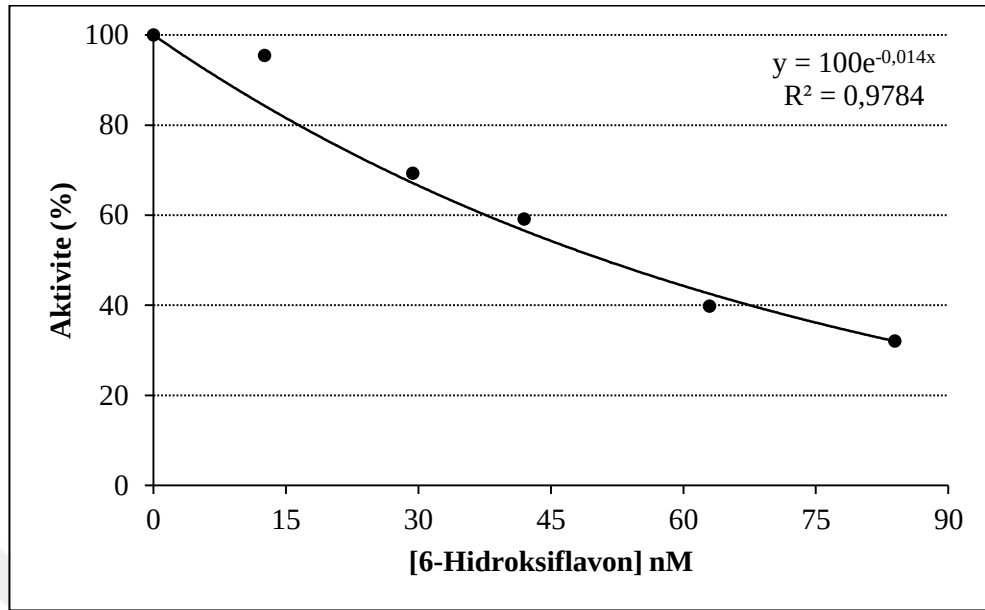
Şekil 4.24. hCA II enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.1.3. AChE için bulunan inhibisyon sonuçları

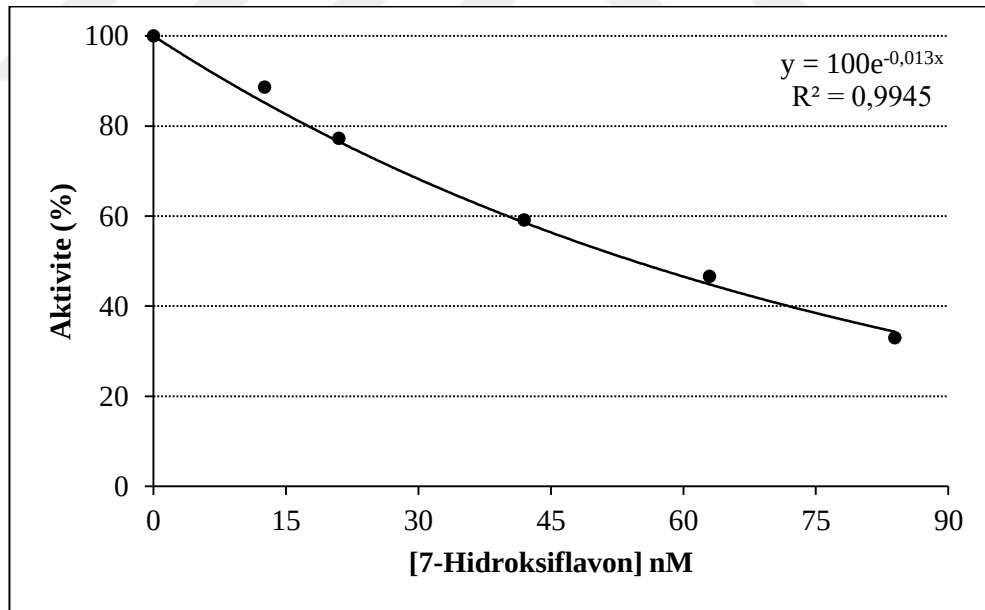
Bu çalışmada flavon türevlerinin AChE enzimi üzerine asetilkolintiyoiyodür substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (asetiltkolintiyoiyodür 10 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite ölçümleri alındı. Elde edilen bu değerlerden Aktivite (%)-[İnhibitör] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Çizilen grafikler Şekil 4.25-4.30'da gösterildi.



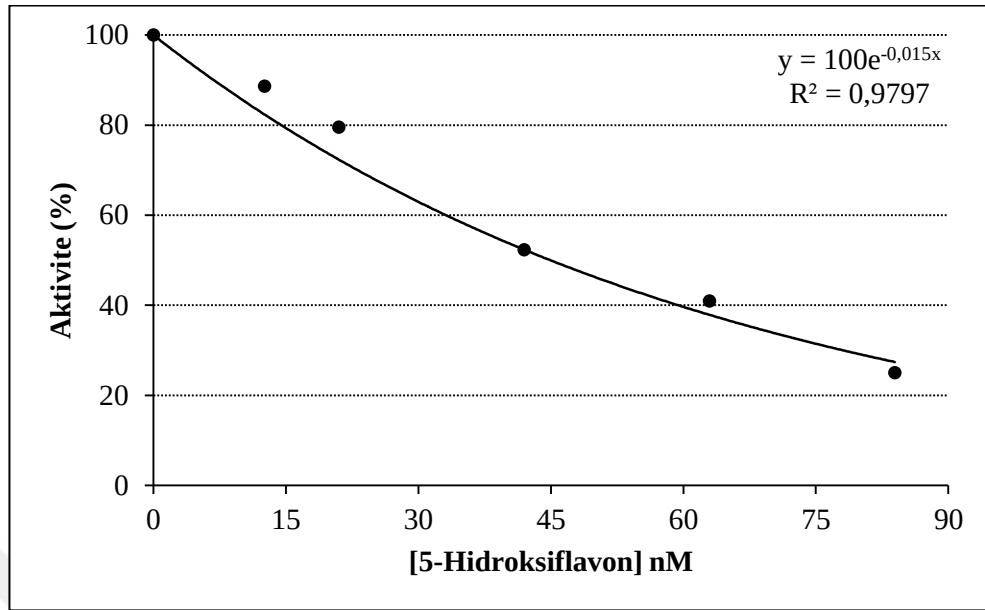
**Şekil 4.25.** AChE enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği



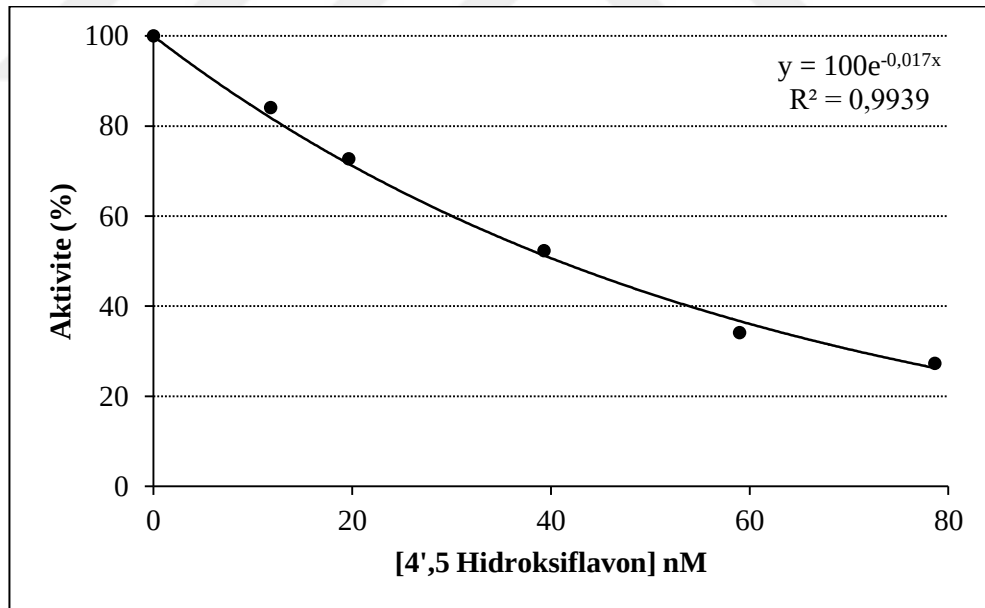
Şekil 4.26. AChE enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği



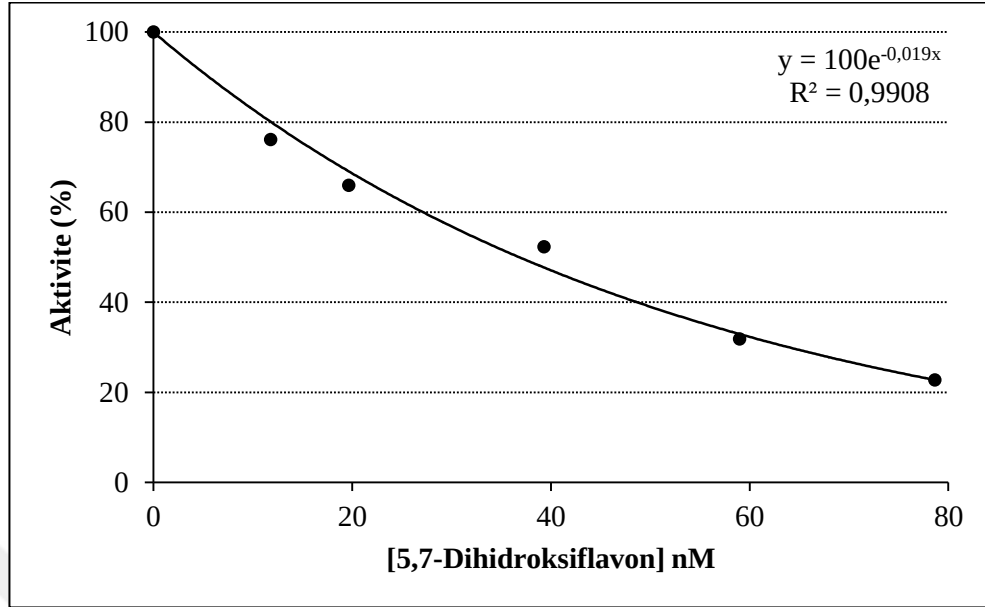
Şekil 4.27. AChE enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği



**Şekil 4.28.** AChE enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği

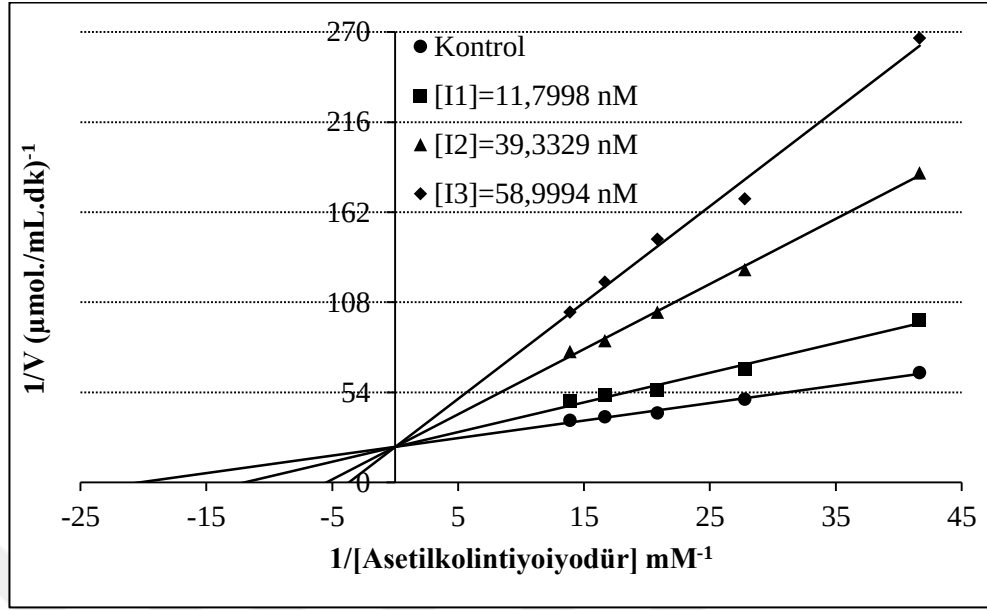


**Şekil 4.29.** AChE enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği

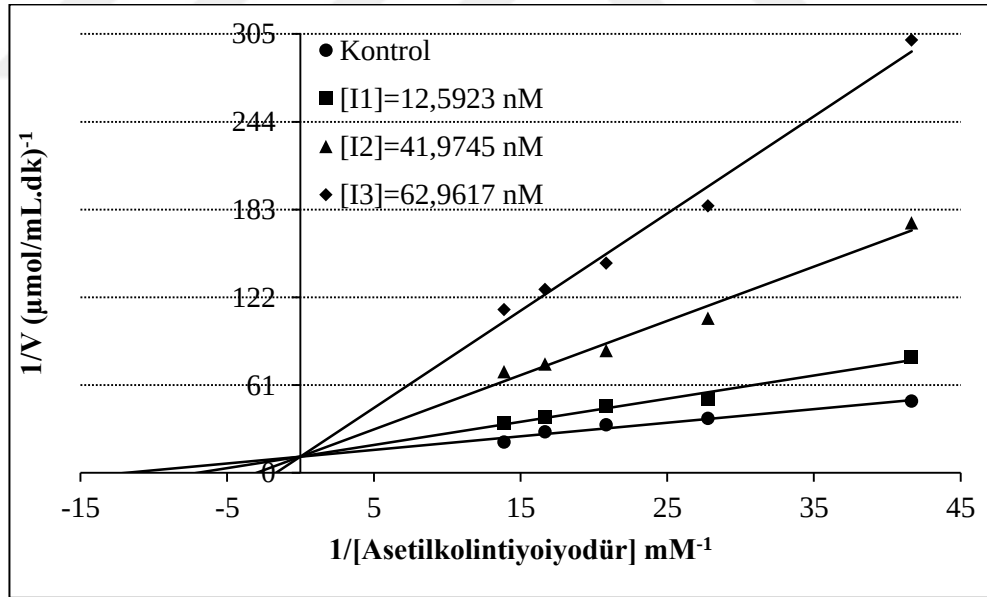


**Şekil 4.30.** AChE enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği

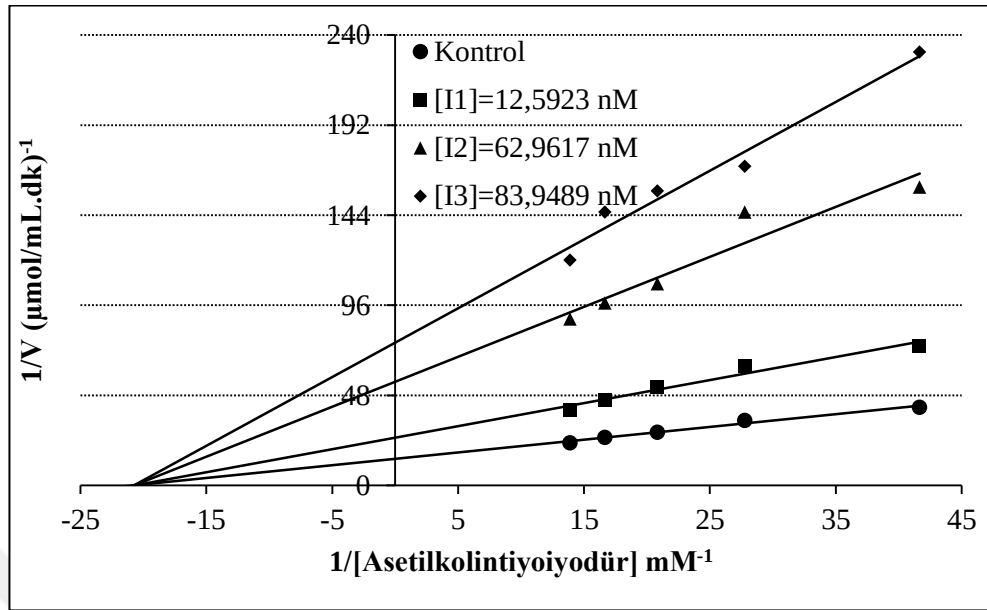
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı asetilkolintiyoyodür substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.31-4.36'da gösterildi.



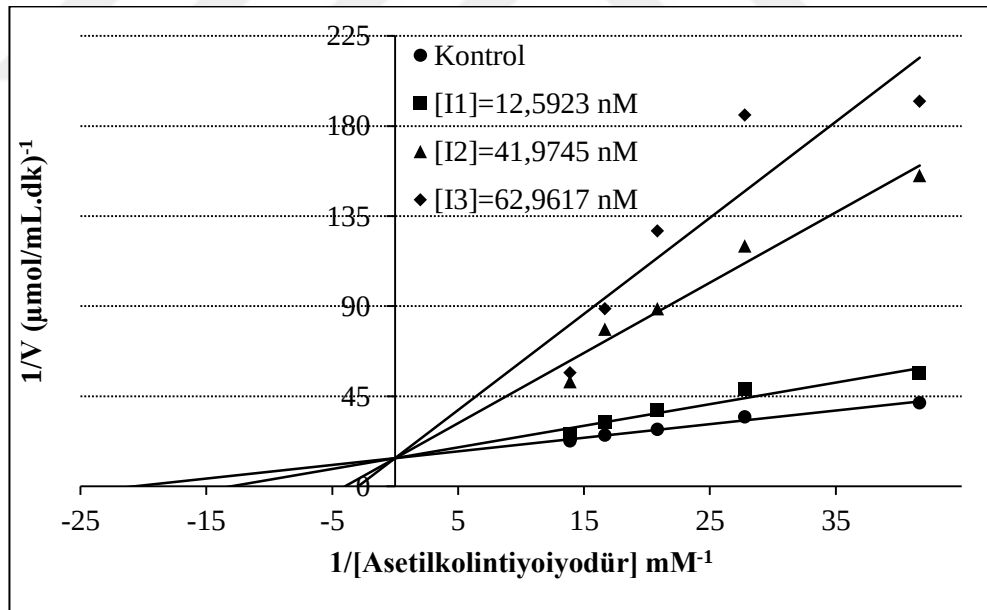
Şekil 4.31. AChE enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



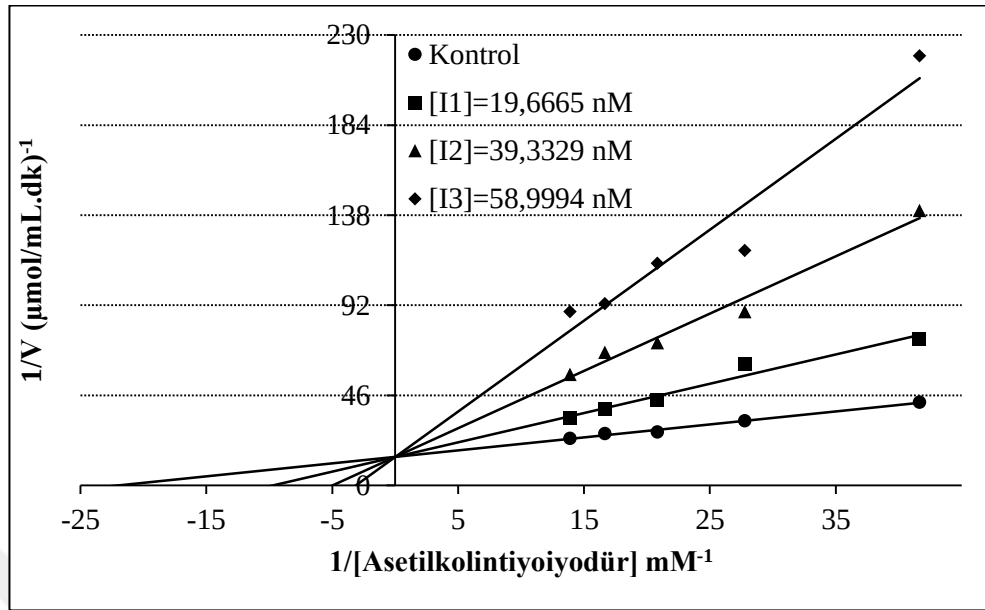
Şekil 4.32. AChE enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



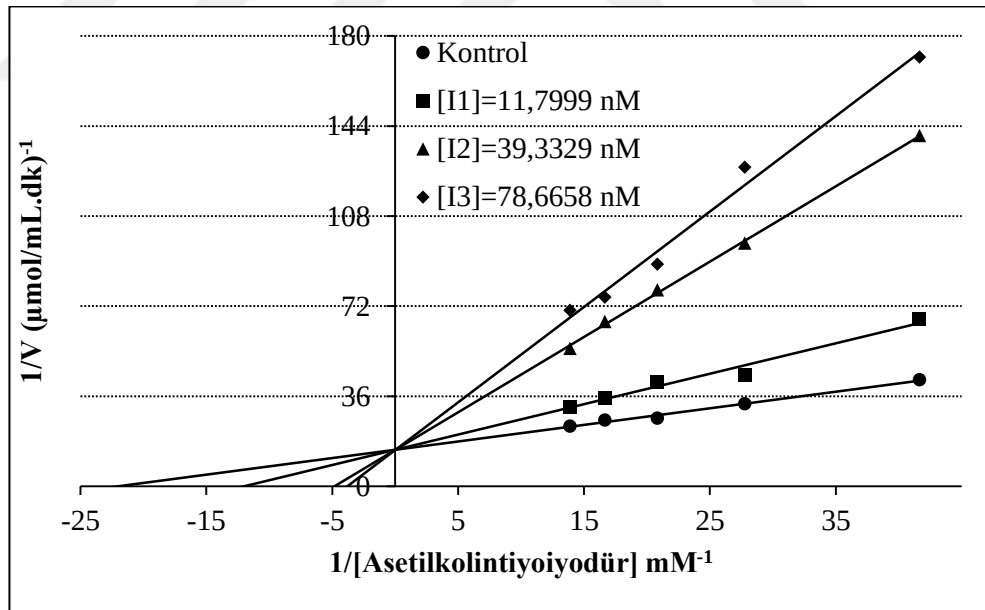
Şekil 4.33. AChE enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.34. AChE enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



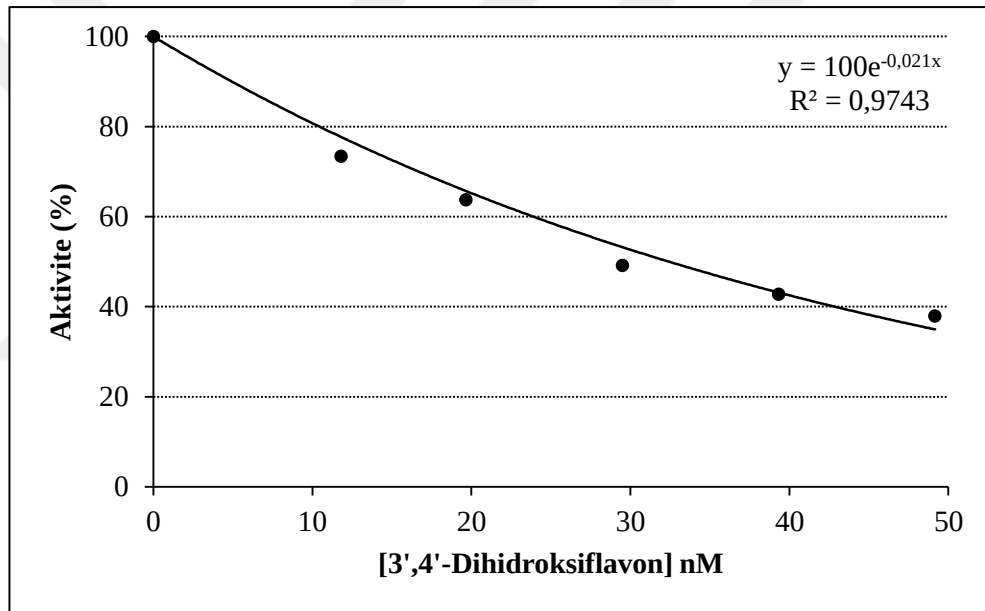
Şekil 4.35. AChE enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



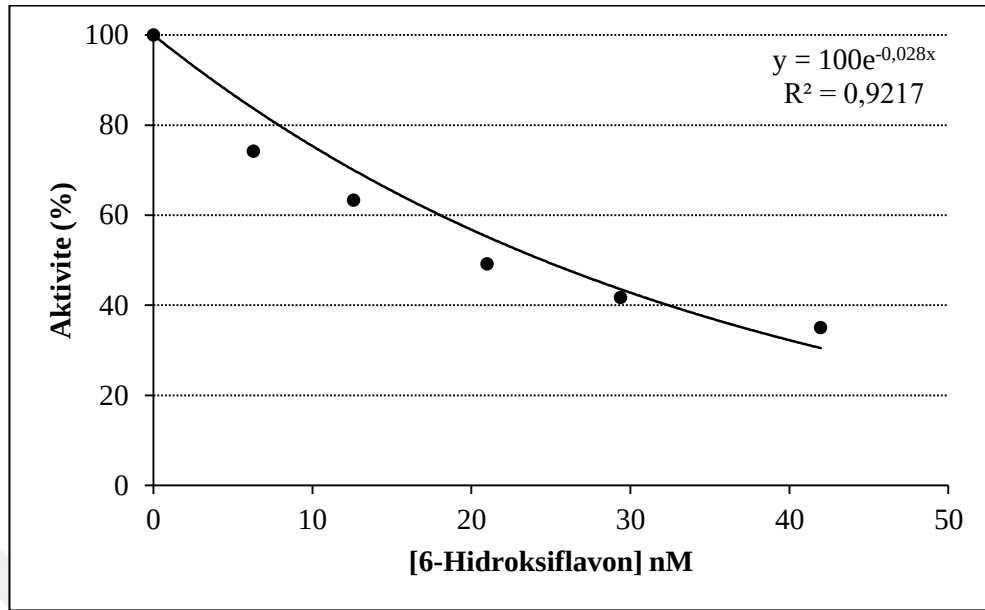
Şekil 4.36. AChE enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.1.4. BChE için bulunan inhibisyon sonuçları

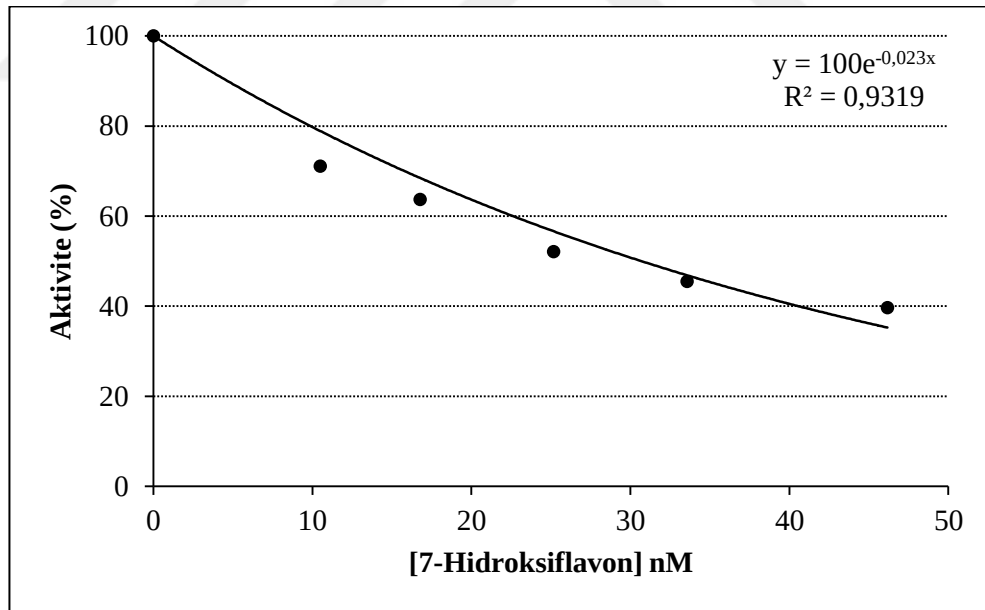
Bu çalışmada flavon türevlerinin BChE enzimi üzerine bütirilkolintiyoyodür substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit substrat konsantrasyonunda (bütirilkolintiyoyodür 5 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite ölçümleri alındı. Elde edilen bu değerlerden Aktivite (%)-[İnhibitör] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri bulundu. Çizilen grafikler Şekil 4.37-4.42'de gösterildi.



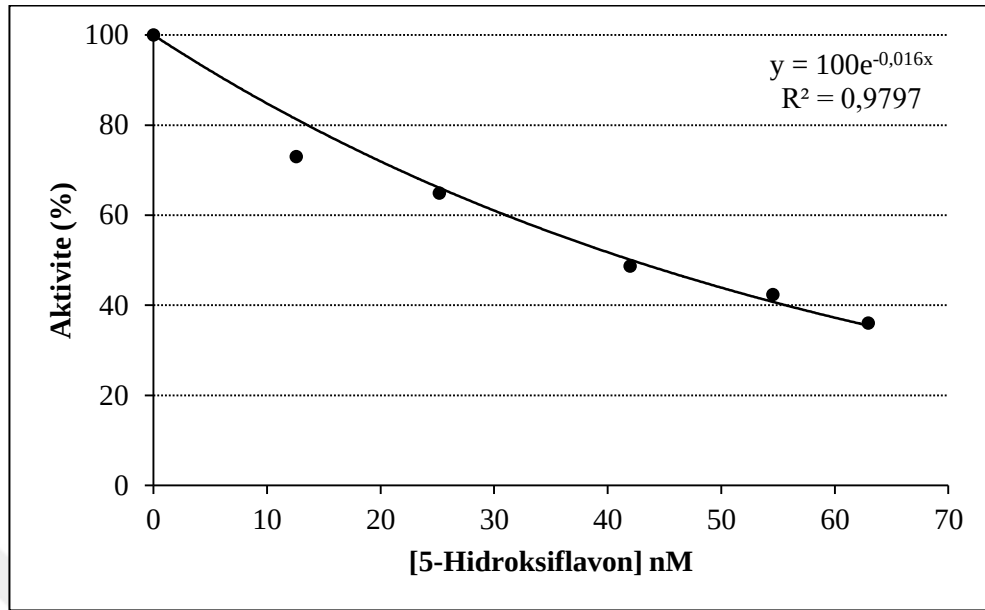
**Şekil 4.37.** BChE enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği



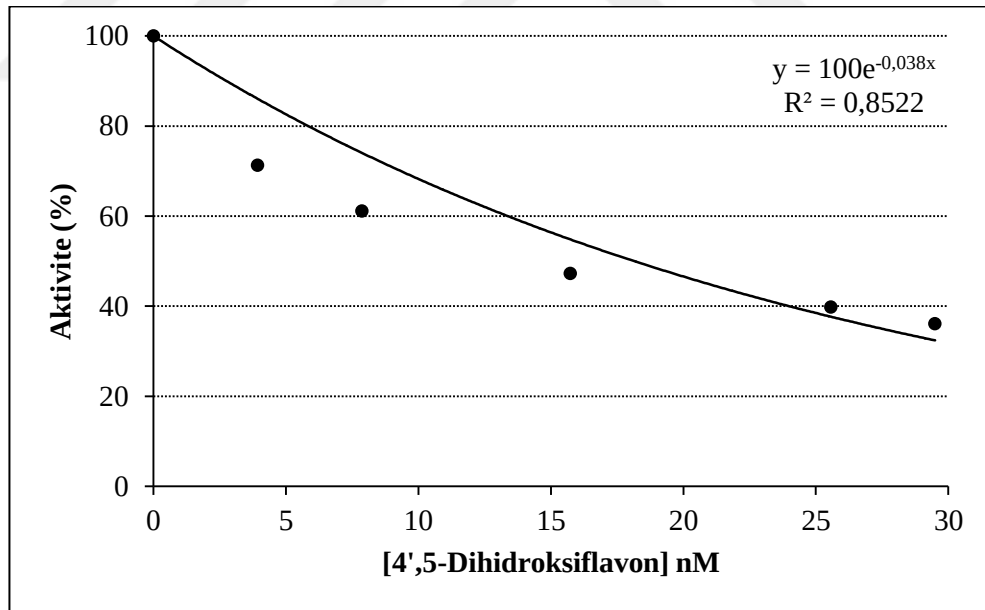
Şekil 4.38. BChE enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği



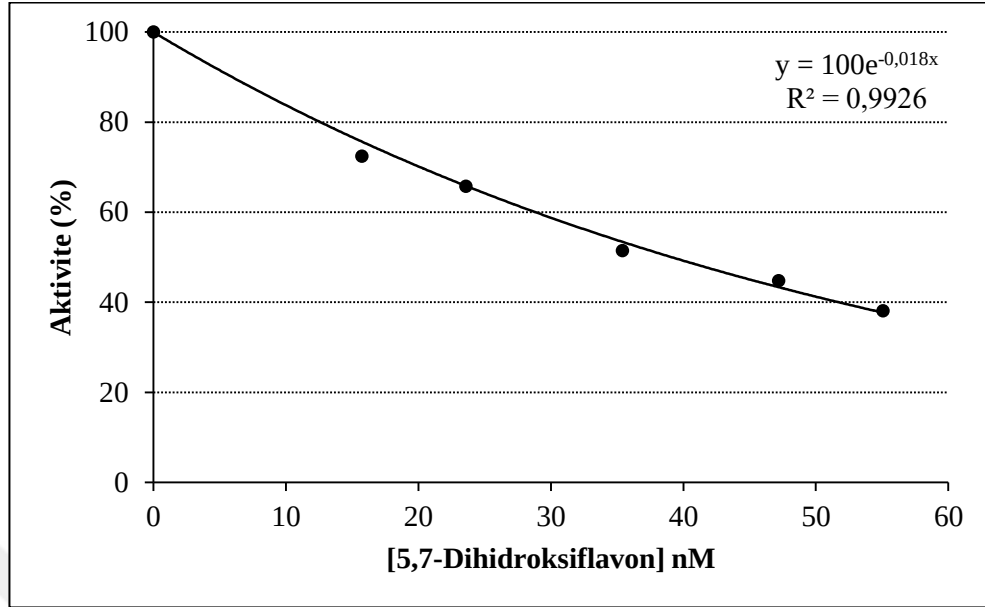
Şekil 4.39. BChE enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği



**Şekil 4.40.** BChE enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği

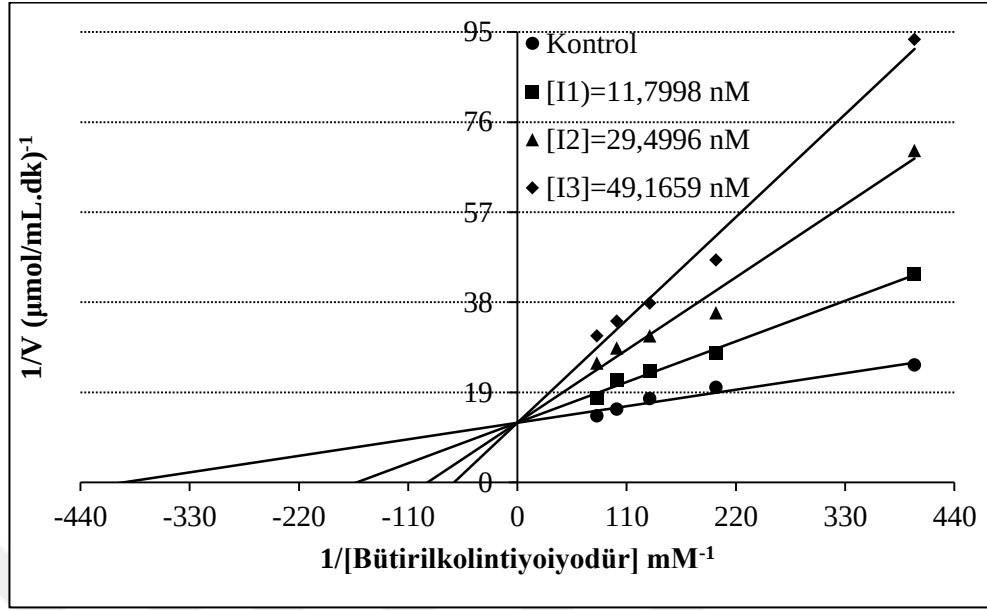


**Şekil 4.41.** BChE enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği

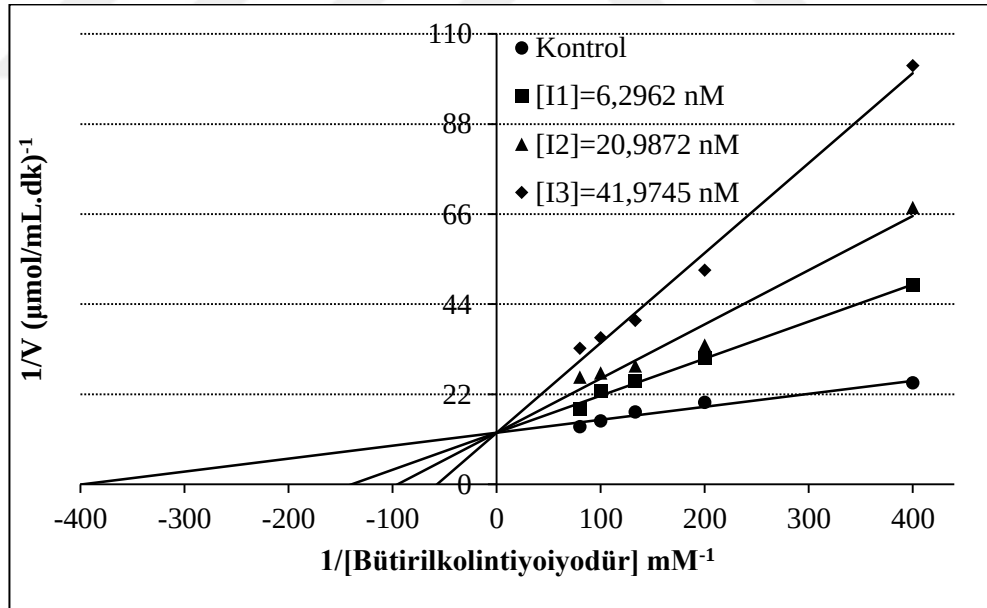


**Şekil 4.42.** BChE enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği

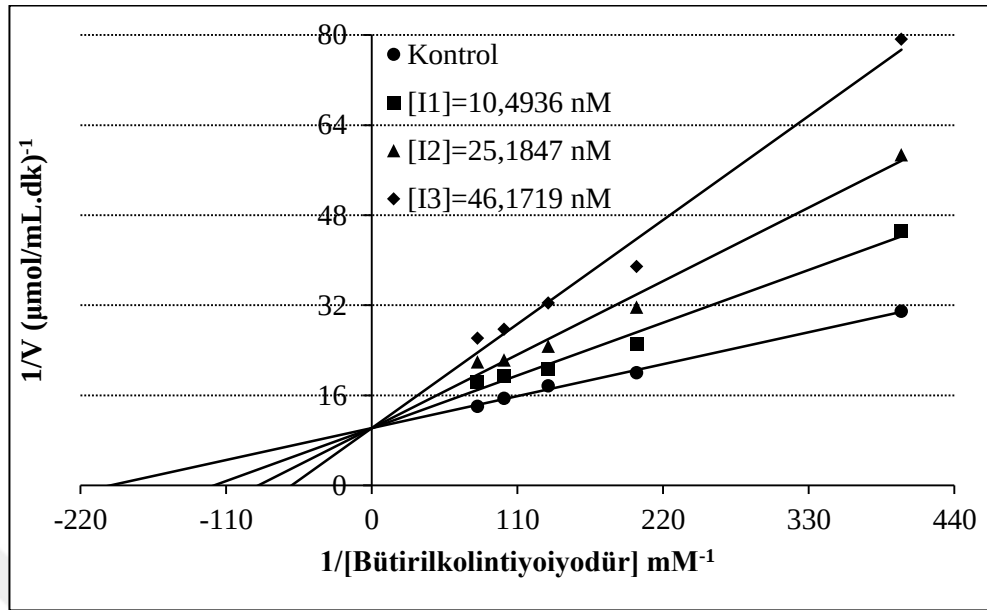
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı bütirilkolintiyoyodür substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.43-4.48’de gösterildi.



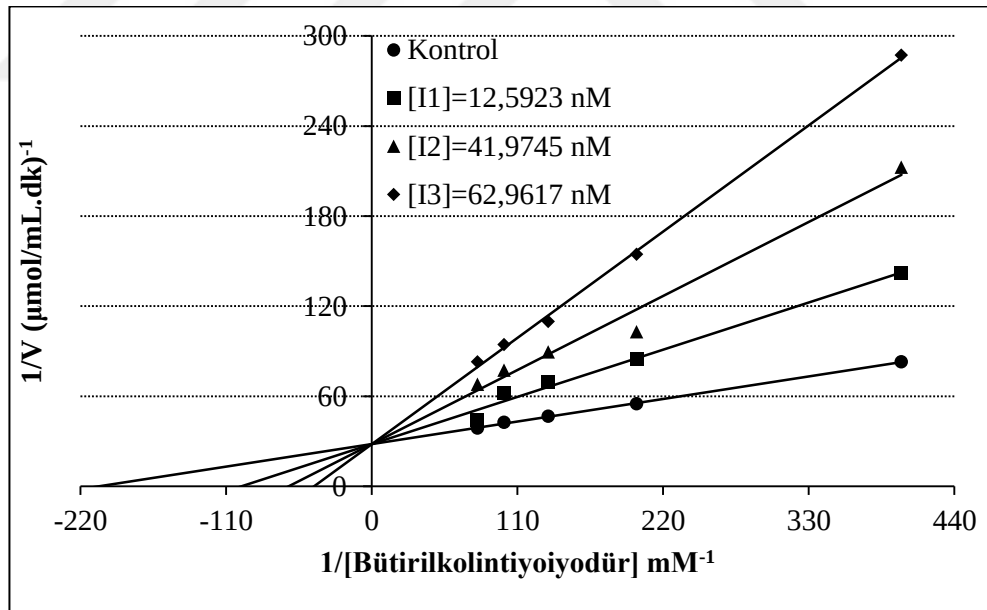
Şekil 4.43. BChE enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



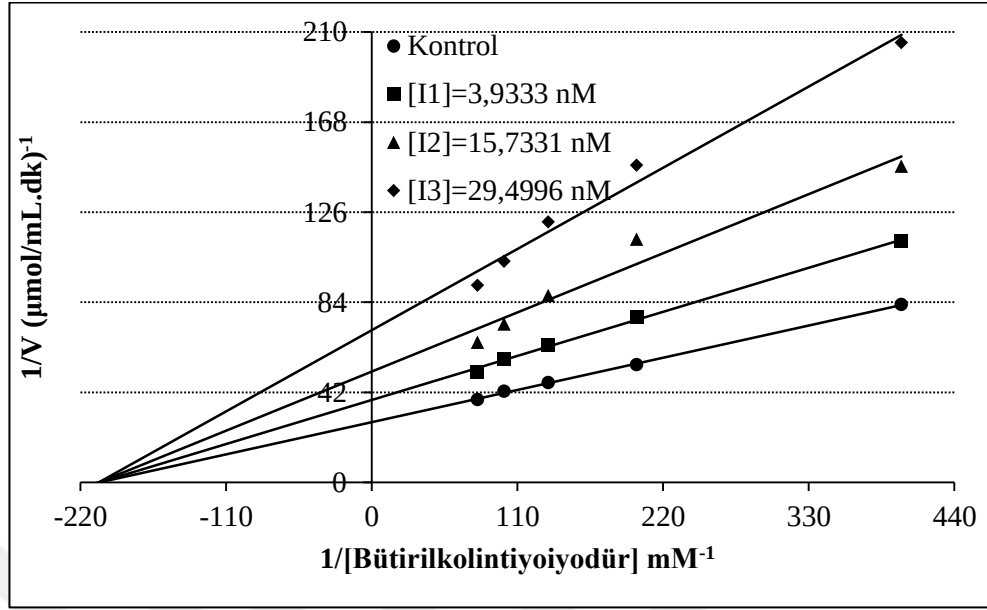
Şekil 4.44. BChE enzimi üzerine 6-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



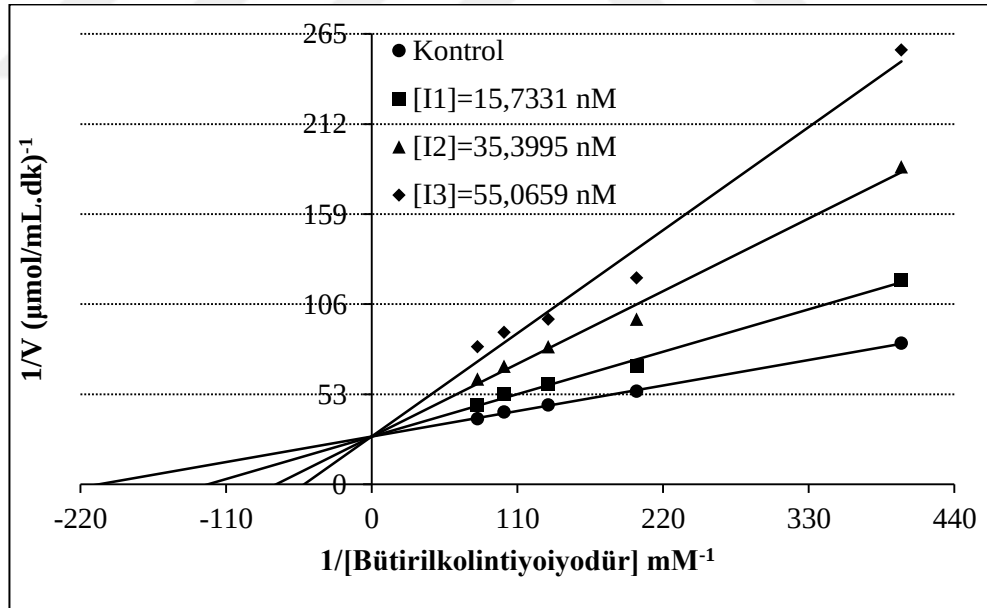
Şekil 4.45. BChE enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.46. BChE enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



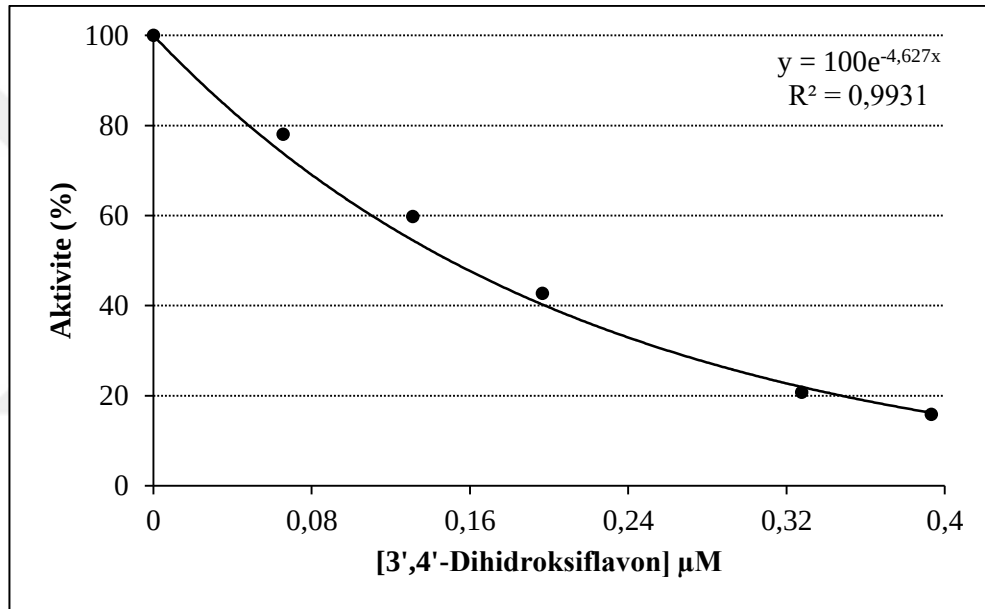
Şekil 4.47. BChE enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



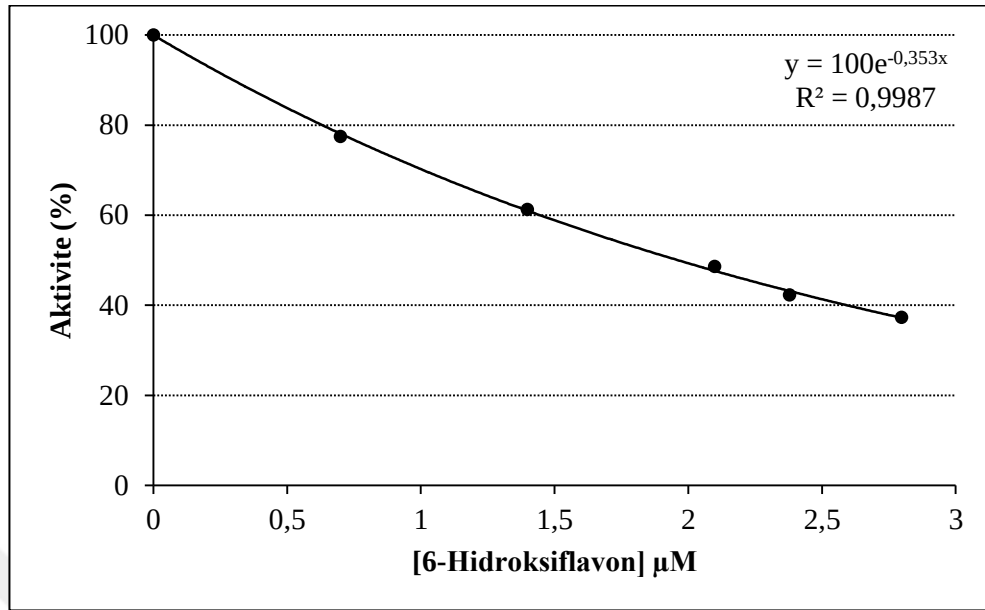
Şekil 4.48. BChE enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.1.5. LPO için bulunan inhibisyon sonuçları

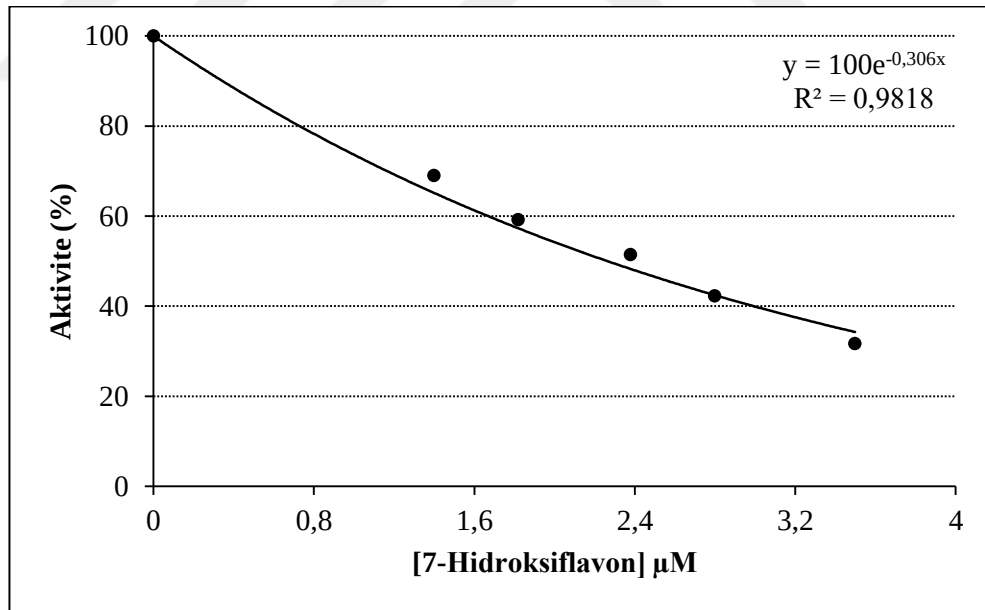
Bu çalışmada flavon türevlerinin sığır sütünden saflaştırılan LPO enzimi üzerine ABTS substratı için etkileri incelendi. Bu amaçla, sabit ABTS konsantrasyonunda (1 mM) ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonlarında her bir inhibitör için aktivite ölçümleri alındı. Elde edilen bu değerlerden Aktivite (%)-[İnhibitör] grafikleri çizilerek  $IC_{50}$  değerleri bulundu. Çizilen grafikler Şekil 4.49-4.54'de gösterildi.



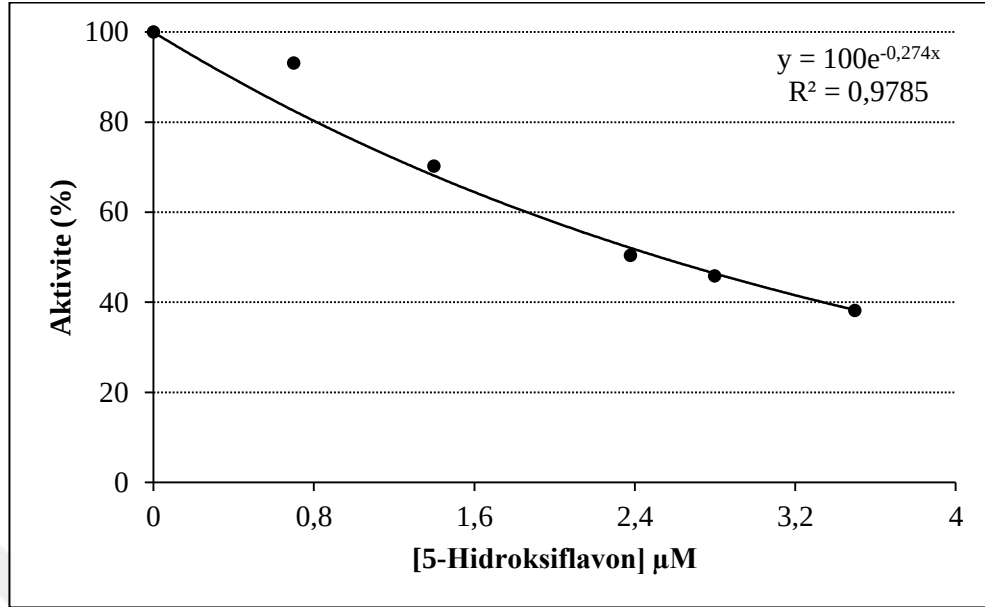
**Şekil 4.49.** LPO enzimi için 5 farklı 3',4'-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[3',4'-Dihidroksiflavon] grafiği



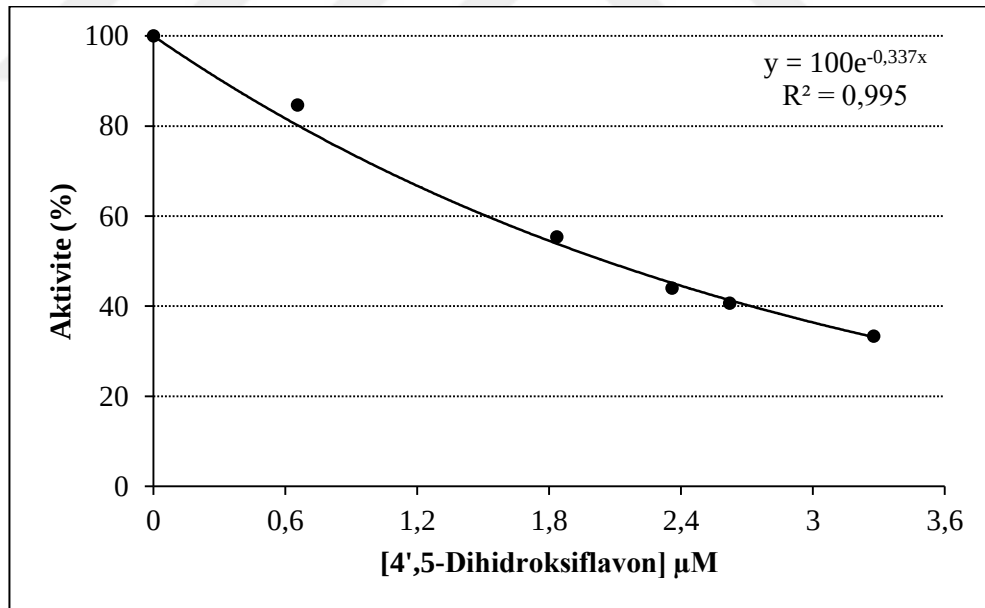
**Şekil 4.50.** LPO enzimi için 5 farklı 6-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[6-Hidroksiflavon] grafiği



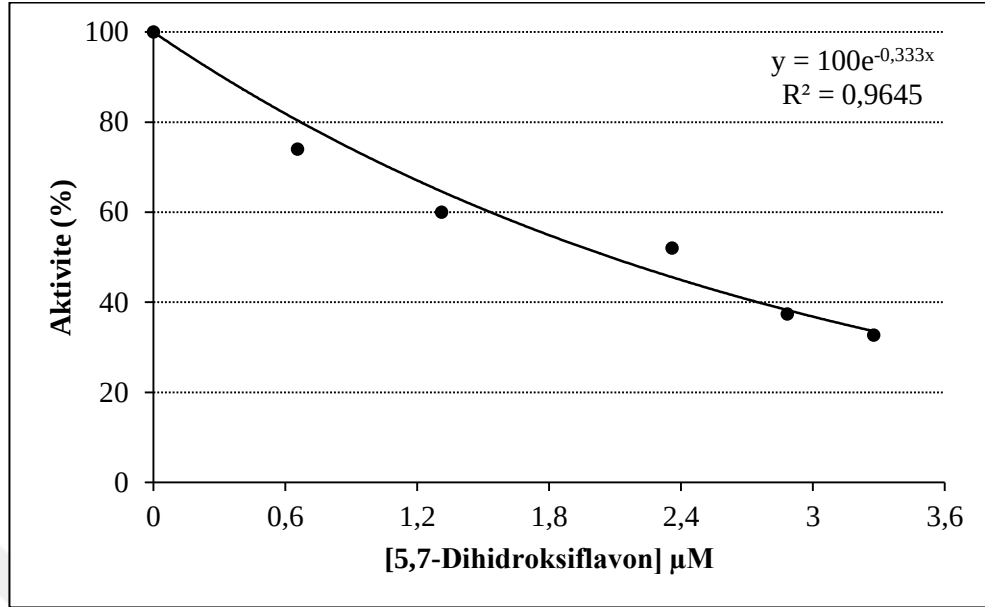
**Şekil 4.51.** LPO enzimi için 5 farklı 7-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[7-Hidroksiflavon] grafiği



**Şekil 4.52.** LPO enzimi için 5 farklı 5-Hidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5-Hidroksiflavon] grafiği

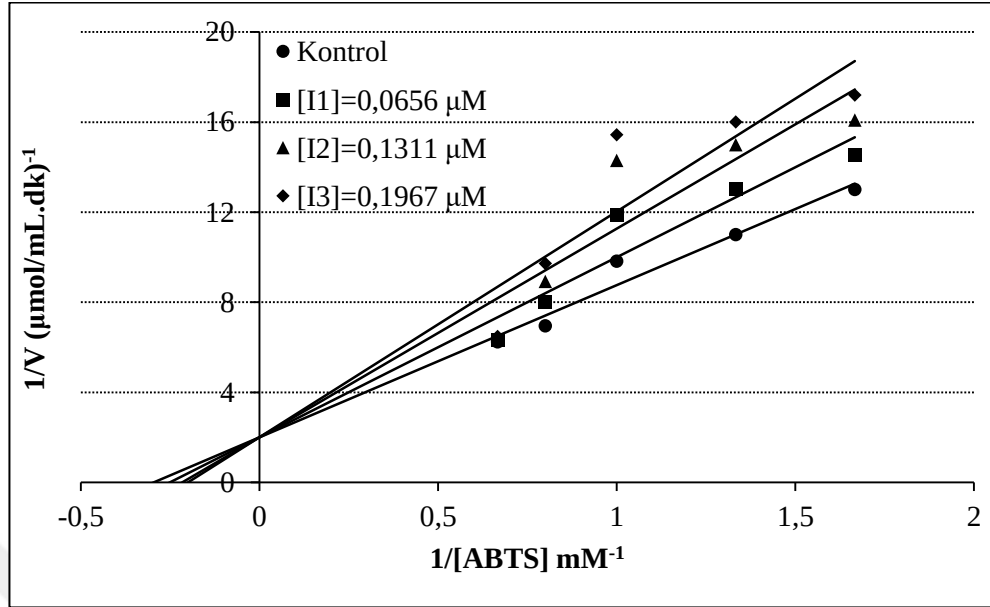


**Şekil 4.53.** LPO enzimi için 5 farklı 4',5-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[4',5-Dihidroksiflavon] grafiği

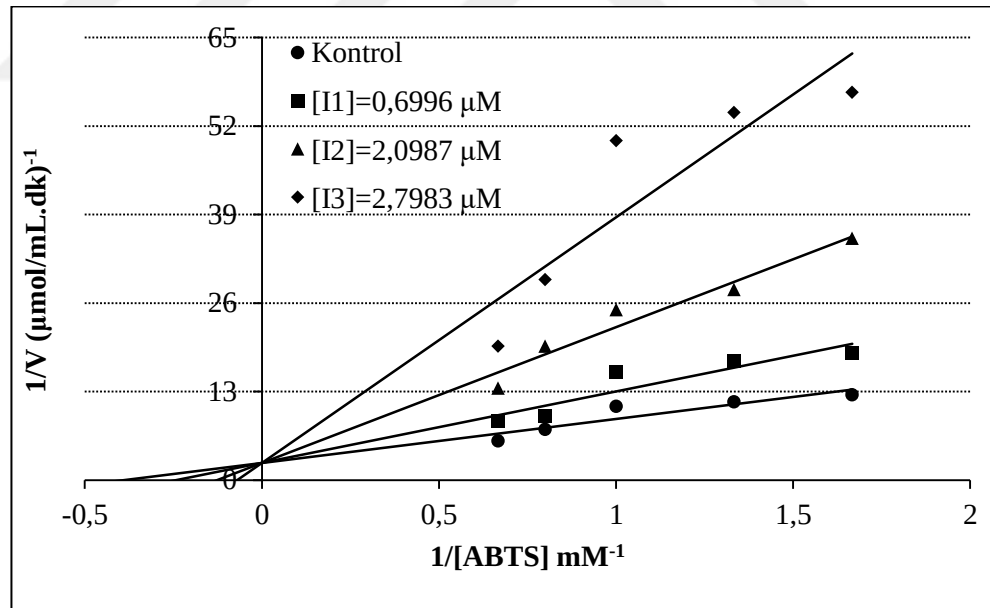


**Şekil 4.54.** LPO enzimi için 5 farklı 5,7-Dihidroksiflavon konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[5,7-Dihidroksiflavon] grafiği

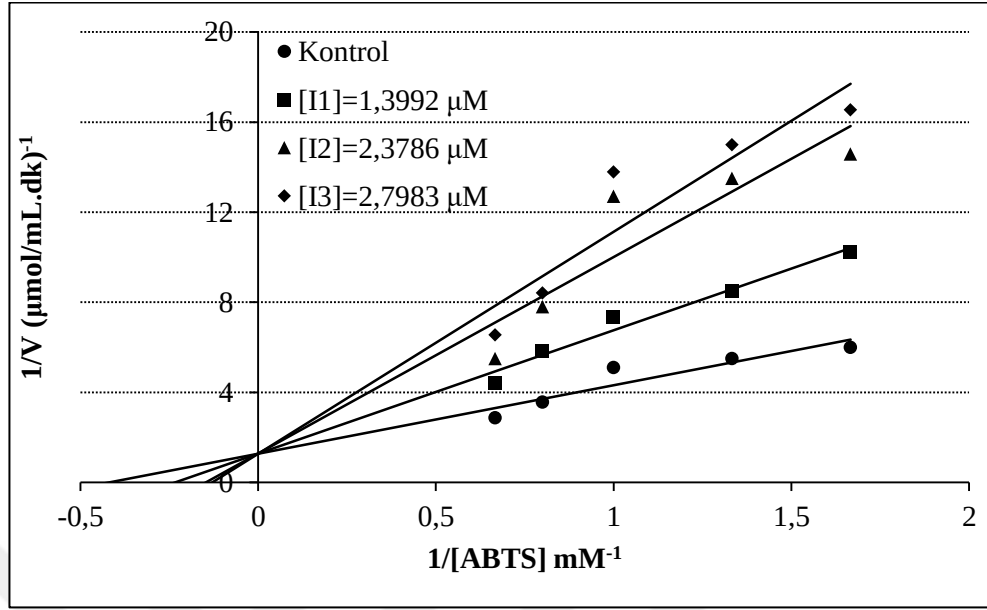
Daha sonra inhibisyon tiplerinin belirlenmesi ve  $K_i$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla 5 farklı ABTS substrat konsantrasyonunda ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen bu değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri bulundu. Bu grafikler Şekil 4.55-4.60'da gösterildi.



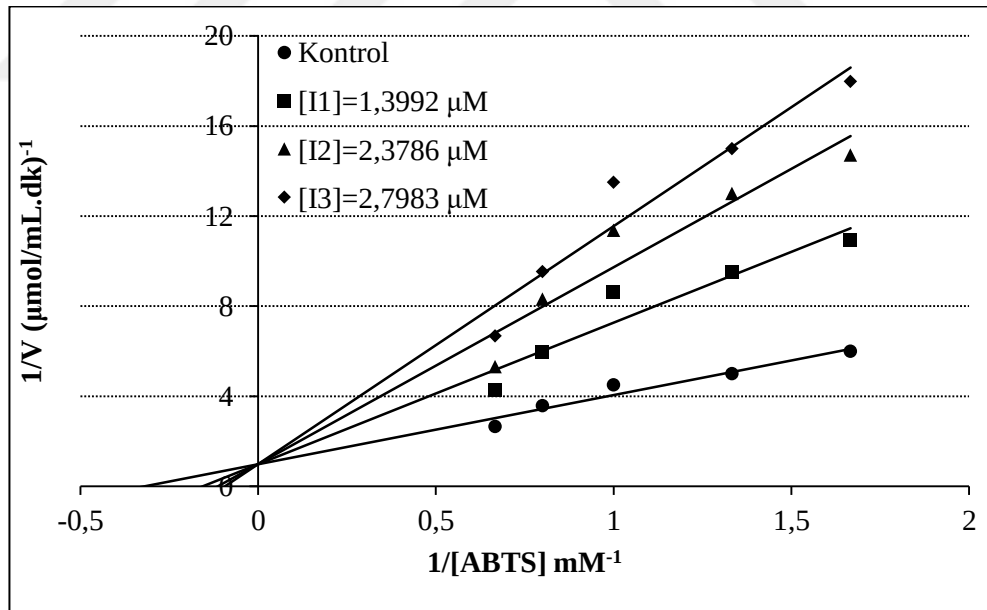
Şekil 4.55. LPO enzimi üzerine 3',4'-Dihidroksiflavyon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



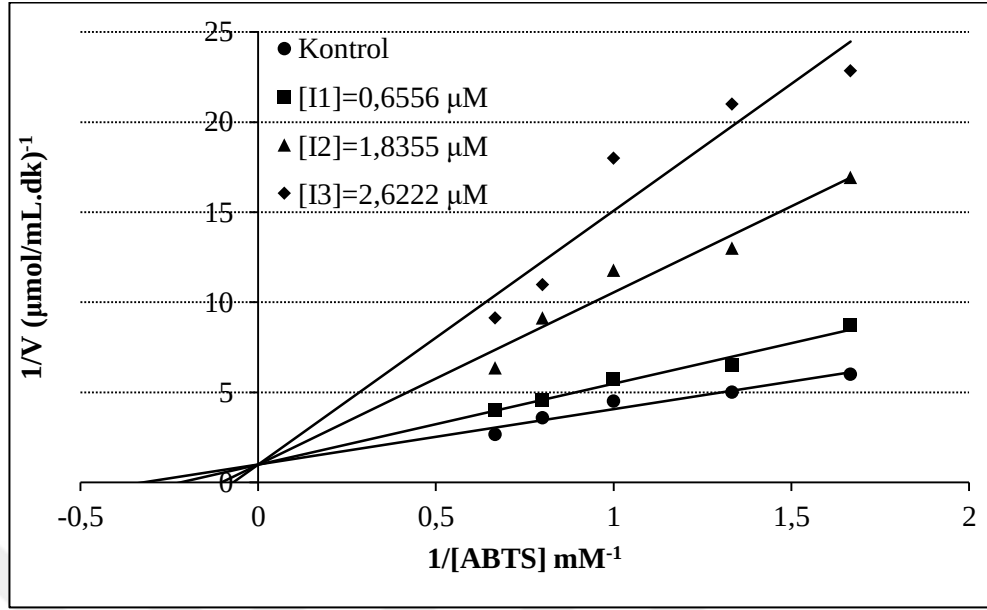
Şekil 4.56. LPO enzimi üzerine 6-Hidroksiflavyon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



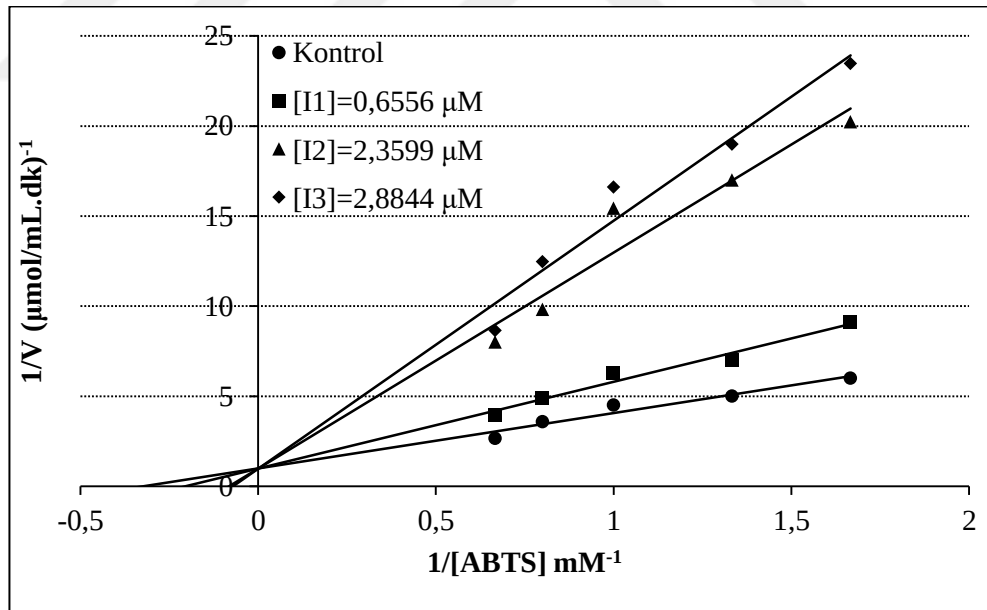
Şekil 4.57. LPO enzimi üzerine 7-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.58. LPO enzimi üzerine 5-Hidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.59. LPO enzimi üzerine 4',5-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

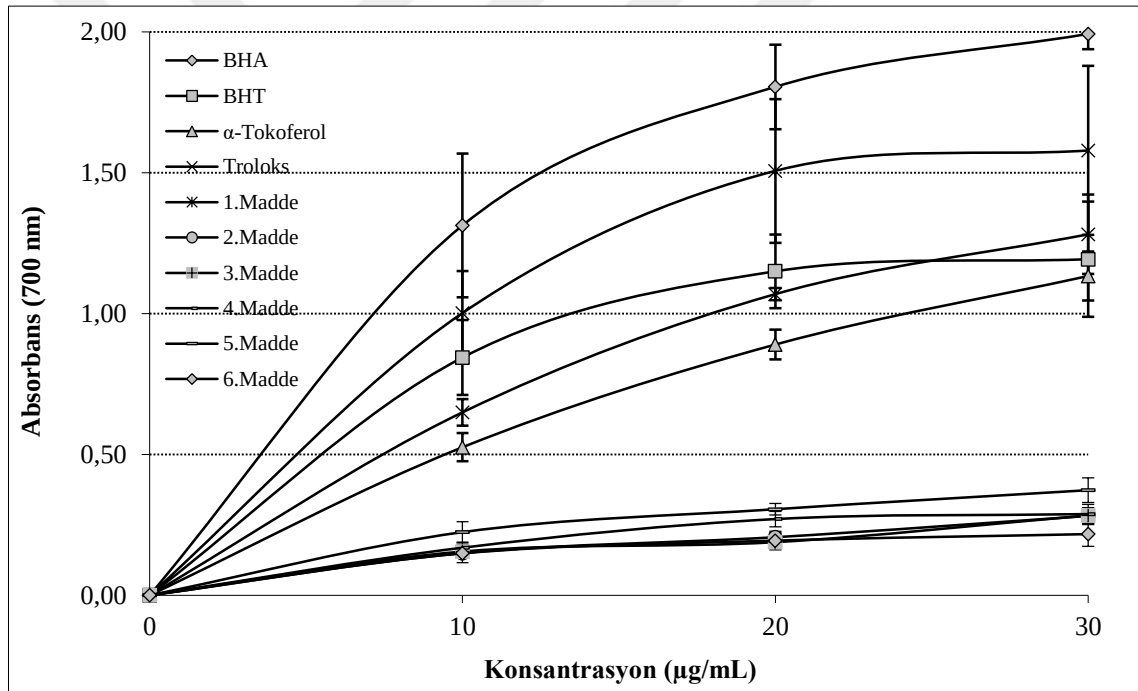


Şekil 4.60. LPO enzimi üzerine 5,7-Dihidroksiflavon'un inhibisyon tipini gösteren Lineweaver-Burk grafiği

## 4.2. Antioksidan Kapasite Tayini Bulguları

### 4.2.1. $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$ iyonları indirgeme kapasitesi bulguları

Bu yöntemin uygulanması esnasında test çözeltisinin açık sarı rengi çözelti ortamında bulunan antioksidan maddelerin indirgeme kapasitelerinden dolayı mavi-yeşil renge dönüşüm olmaktadır (Gülçin *et al.* 2006a). Tez kapsamında kullanılan flavon türevlerinin indirgeme kapasiteleri artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

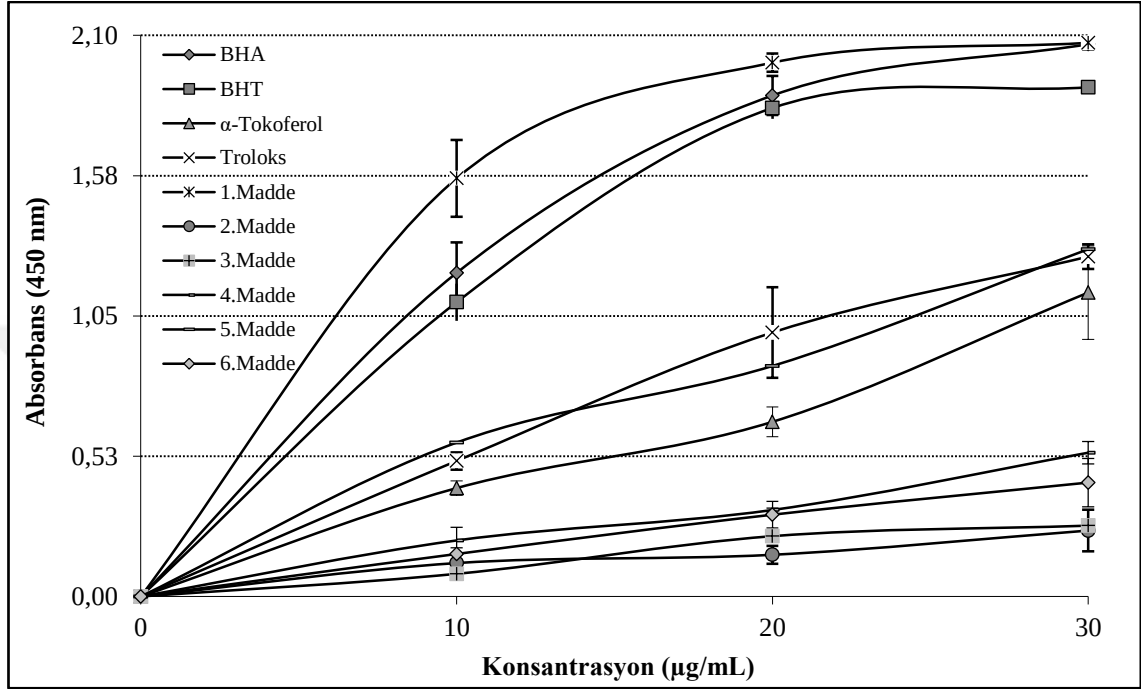


**Şekil 4.61.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) flavonların ferrik ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan bileşikler (BHT, BHA, Troloks ve  $\alpha$ -Tokoferol) ile mukayesesi

### 4.2.2. $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^{+}$ indirgeme (Kuprak metodu) bulguları

Tez kapsamında çalışılan flavon türevi bileşiklerin kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iyonlarını indirgeyebilme yeteneklerinin artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak artış

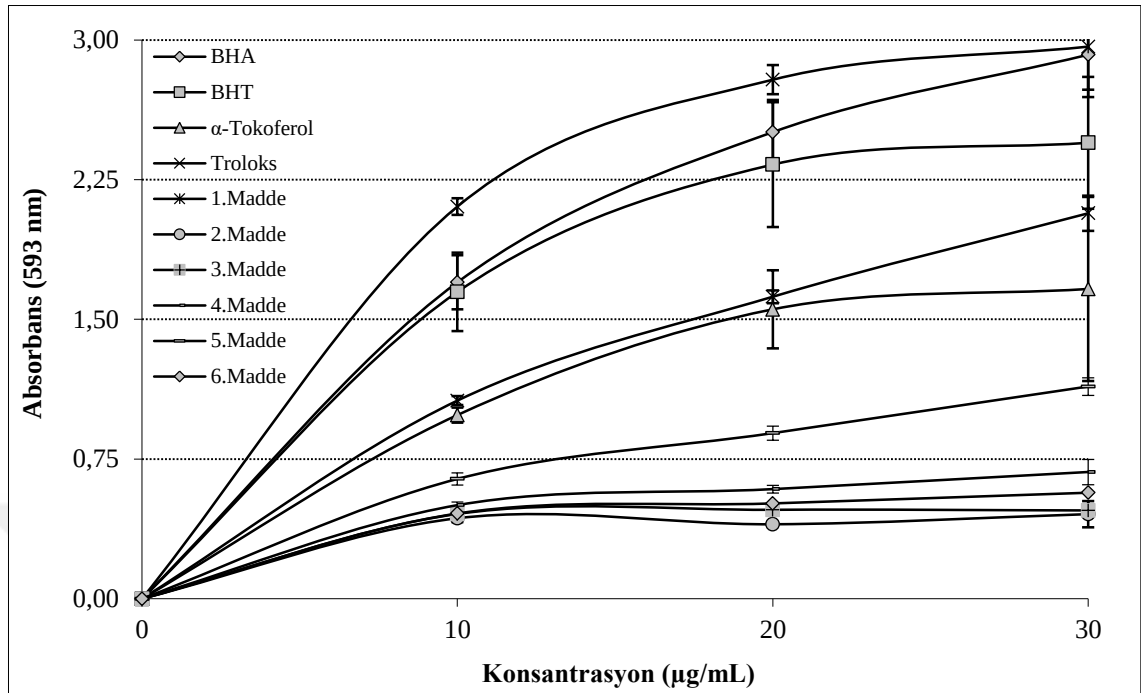
gösterdiği gözlemlendi. Elde edilen veriler standart antioksidan moleküllerle kıyaslandı ve elimizdeki bileşiklerin indirgeme yetenekleri bu sayede yorumlandı.



**Şekil 4.62.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) flavonların kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan bileşikler (BHT, Troloks, BHA ve  $\alpha$ -Tokoferol) ile mukayesesi

#### 4.2.3. FRAP yöntemi bulguları

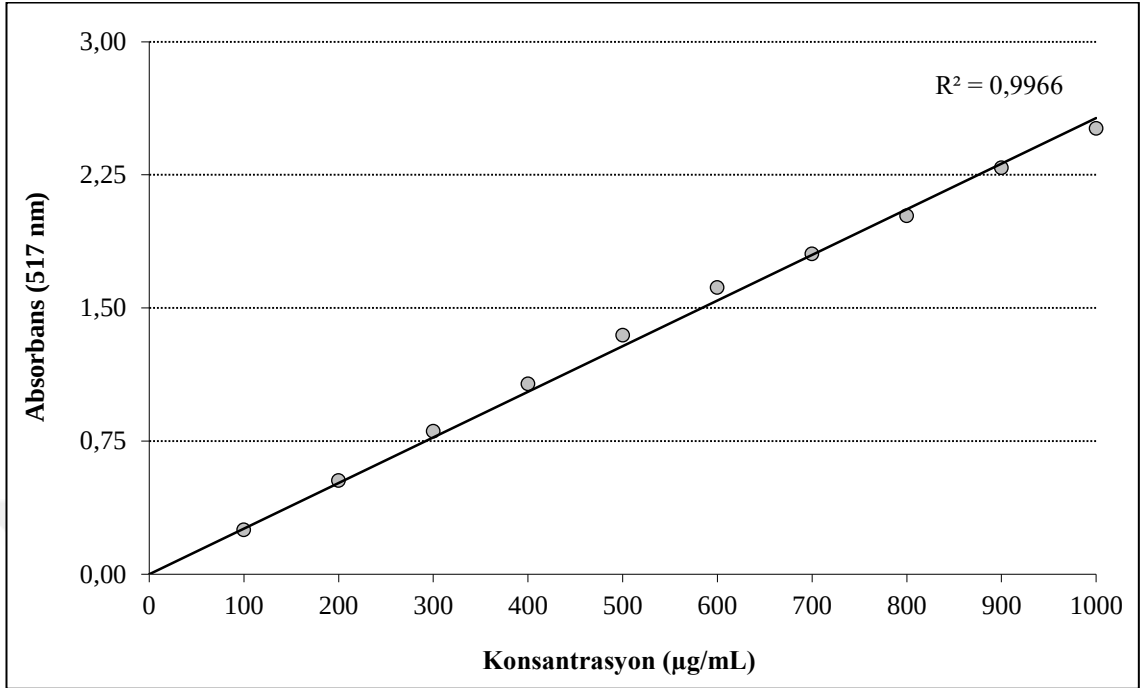
FRAP yönteminde ferrik ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iyonları ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonlarına indirgenir. Oluşan ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile 593 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli bir kompleks oluşturur.



**Şekil 4.63.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) flavonların FRAP yöntemine göre araştırma bulguları ve sonuçların standart antioksidanlarla mukayesesi

#### 4.2.4. DPPH giderme kapasitesi bulguları

Çalışmada kullanılan standart antioksidan (BHA, BHT, α-Tokoferol ve Trolox) bileşikleri ile flavon türevlerinin DPPH radikali süpürme tayini için ilk basamakta standart grafik azırlandı ( $r^2$ : 0,9966).



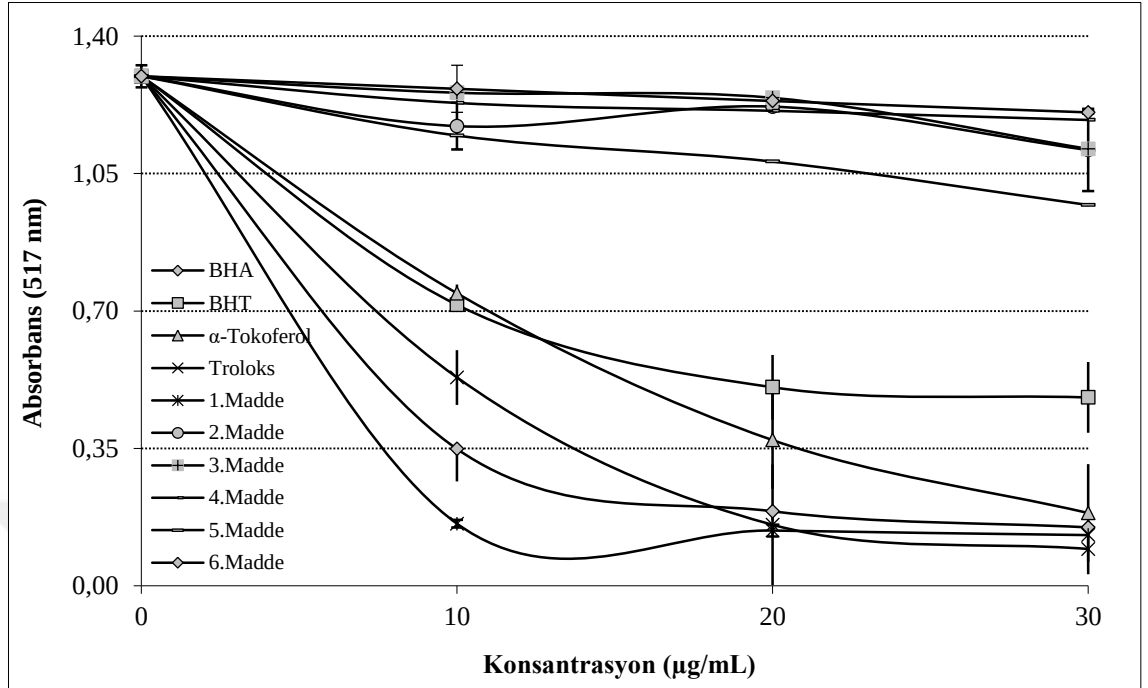
**Şekil 4.64.** DPPH radikali giderme kapasitesi için hazırlanan standart grafik

Deney ortamında gerçekleşen reaksiyondan sonra arda kalan DPPH radikal miktarı çizilen standart grafik sayesinde elde edilen denklemle hesaplandı ( $R^2$ : 0,9966).

$$(\text{Absorbans } \lambda_{517}) = 0,0025 \times [\text{DPPH}] - 0,0491$$

Hesaplamalar için aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

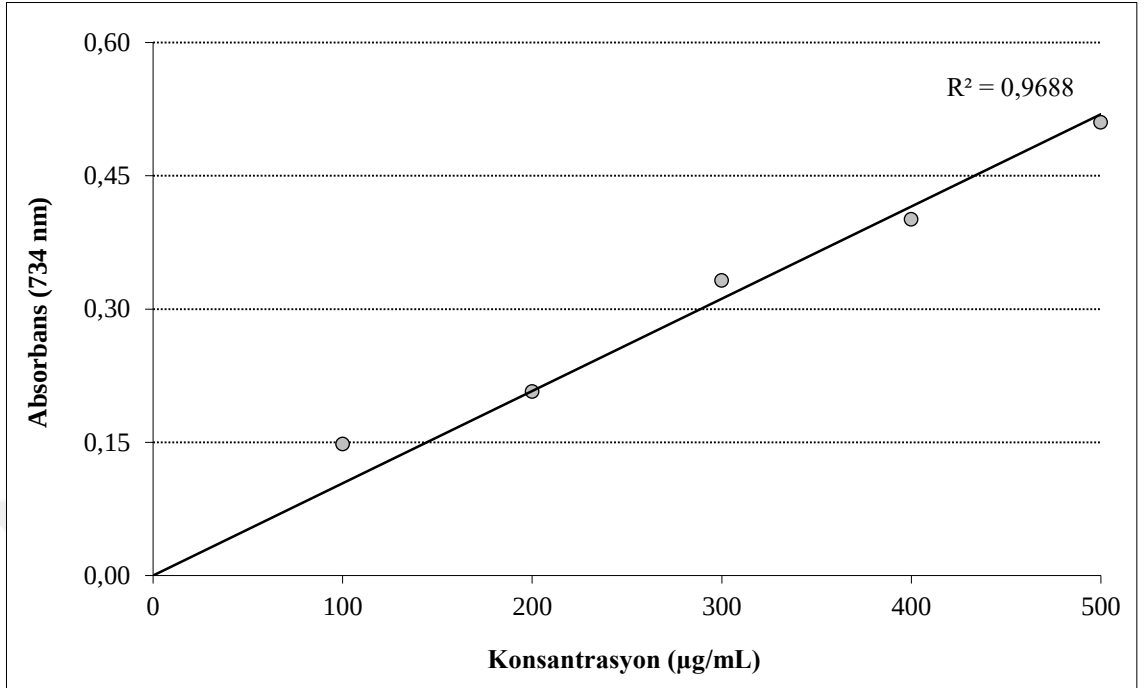
$$\text{DPPH} \cdot \text{giderme aktivitesi (\%)} = \left( 1 - \frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$



**Şekil 4.65.** Flavonların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH radikali süpürme kabiliyetlerinin grafiksel sunumu

#### 4.2.5. ABTS radikali süpürme kabiliyeti bulguları

Bu amaçla ilk basamakta ABTS'den  $ABTS^{+•}$  radikali oluşturuldu. Radikalin oluşması için bir erlen içerisinde pH 7,4-0,1 M fosfat tamponu içerisinde 2 mM konsantrasyona sahip ABTS hazırlandı. Daha sonra 2,45 mM potasyum persülfat eklendi (Gülçin 2007).  $ABTS^{+•}$  radikali giderme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla standart bir grafik oluşturuldu ( $r^2:0,9688$ ).



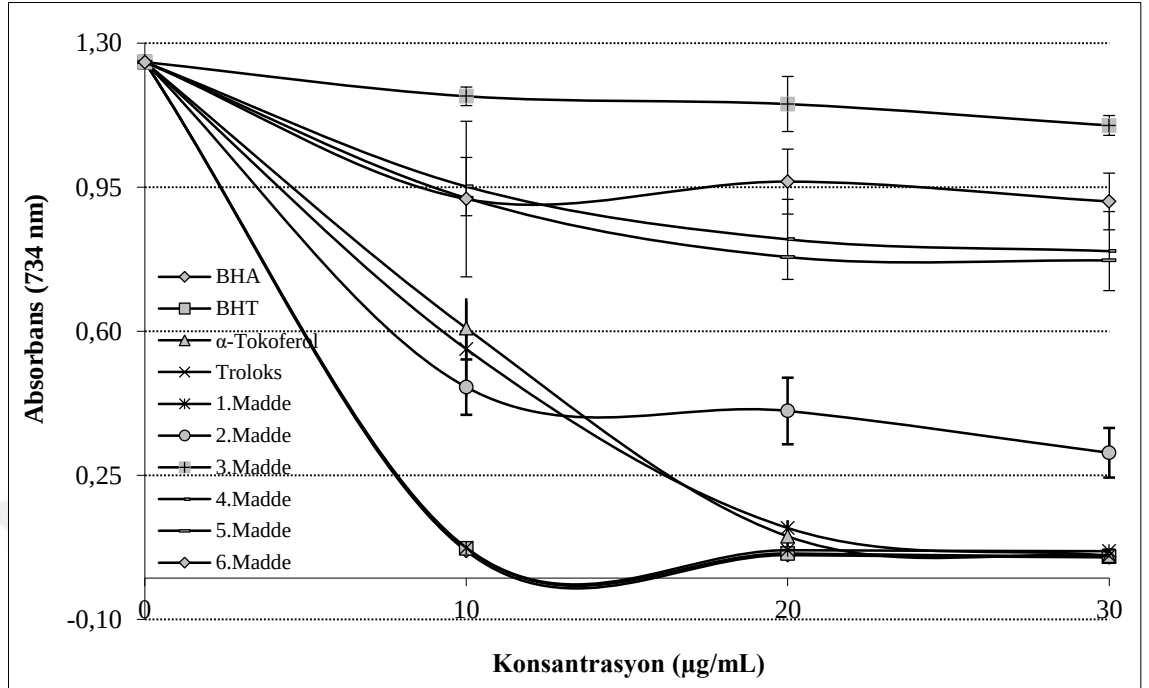
**Şekil 4.66.** ABTS<sup>•+</sup> giderme kapasitesi tayini için hazırlanan standart grafik

Meydana gelen reaksiyondan sonra arda kalan ABTS<sup>•+</sup> radikali miktarı çizilen standart grafikten elde edilen denklem aracılığıyla hesaplandı ( $R^2:0,9688$ )

$$(\text{Absorbans } \lambda_{734}) = 0,0009 \times [\text{ABTS}] + 0,0442$$

hesaplamalar verilen eşitliğe göre yapıldı.

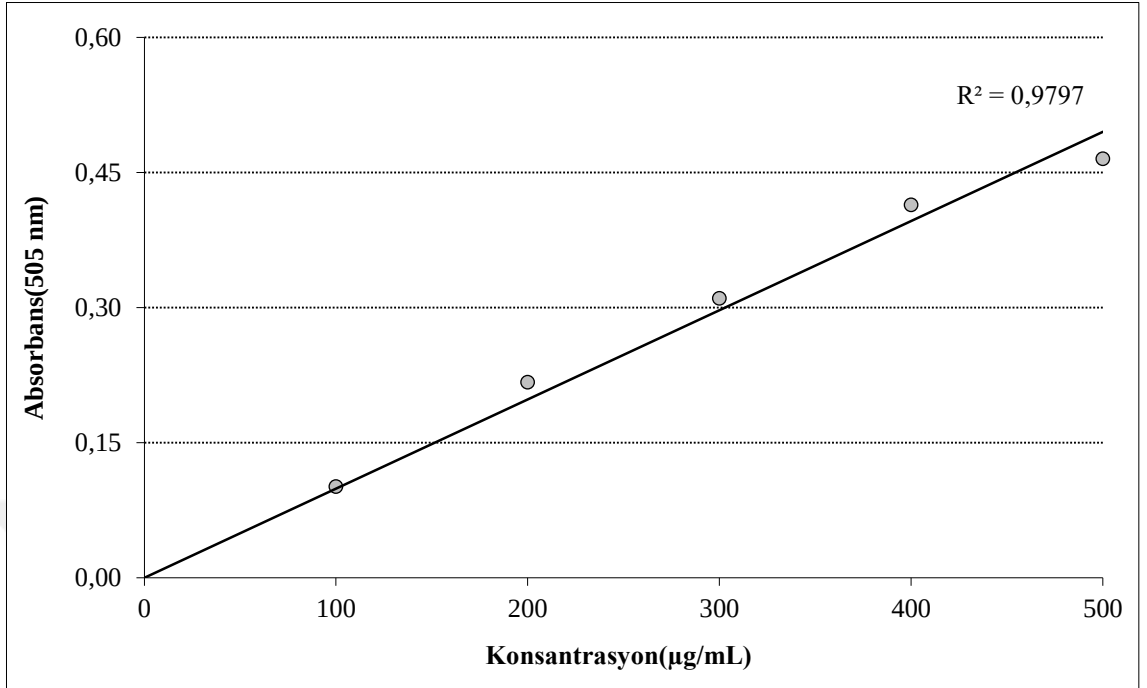
$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ Giderme (\%)} = \left( 1 - \frac{\lambda_{734-N}}{\lambda_{734-K}} \right) \times 100$$



**Şekil 4.67.** Flavonların ABTS<sup>+</sup> radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (BHT, BHA, Troloks ve α-Tokoferol) mukayesesi

#### 4.2.6. DMPD radikali süpürme kapasitesi bulguları

DMPD<sup>+</sup> giderme kapasiteleri tayini için ilk basamakta standart grafik hazırlandı. Geriye kalan DMPD<sup>+</sup> miktarı standart grafikten elde edilen denklem sayesinde hesaplandı.

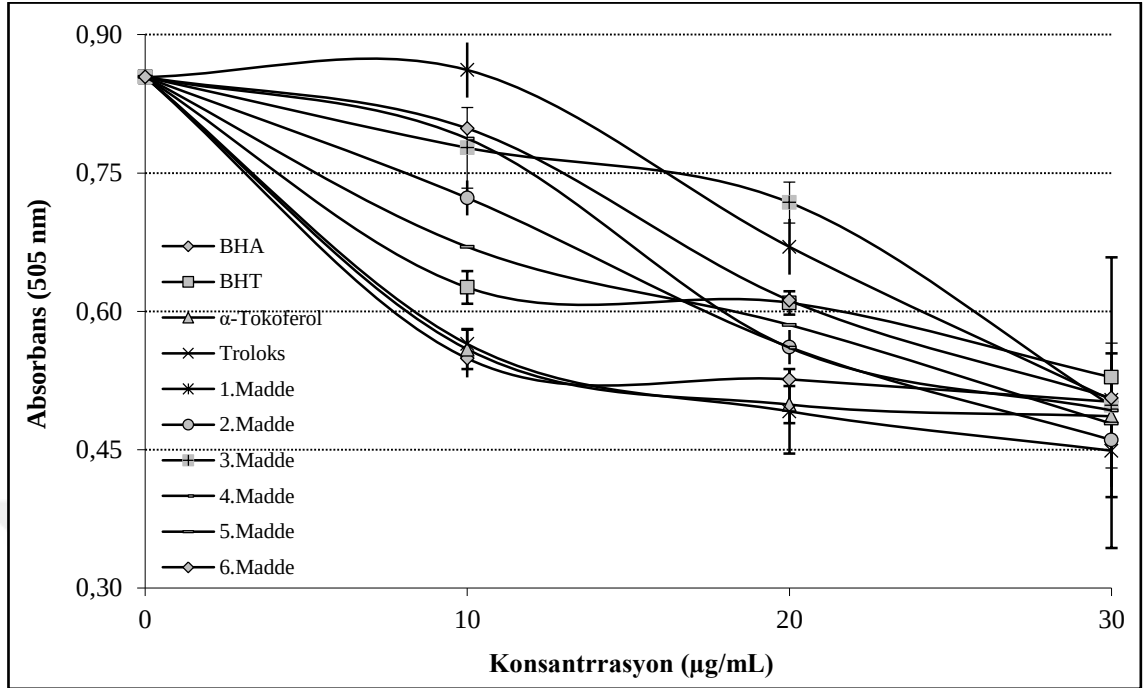


**Şekil 4.68.** DMPD<sup>•+</sup> radikali süpürme kapasitesi için çizilen standart grafik

$$(\text{Absorbans } \lambda_{505}) = 0,0025 \times [\text{DMPD}] - 0,0239$$

DMPD<sup>•+</sup> miktarındaki azalma verilen eşitlik sayesinde hesaplandı.

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

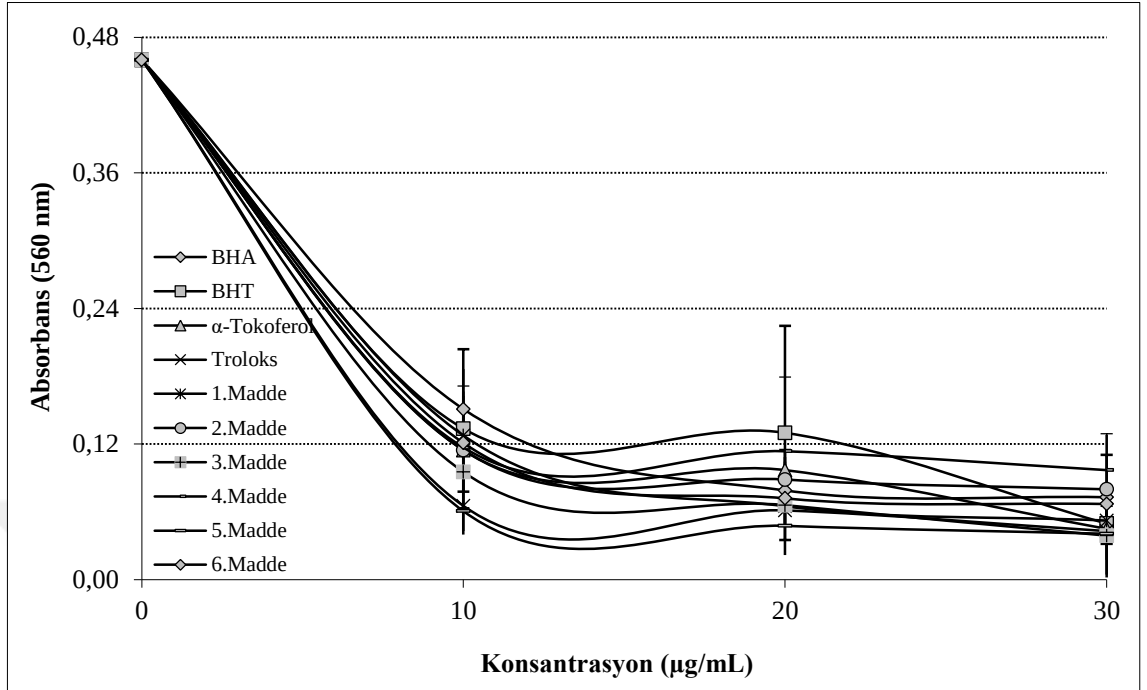


**Şekil 4.69.** Flavonların (10-30 µg/ml) konsantrasyonlarındaki DMPD<sup>++</sup> giderme aktivitelerinin grafiksel sunumu

#### 4.2.7. Süperoksit radikali süpürme kapasitesi bulguları

Kullanılan metiyonin / riboflavin / ışık metoduna göre deney ortamında söndürülen süperoksit anyon radikalleri verilen denklem sayesinde % olarak hesaplanarak belirlendi.

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



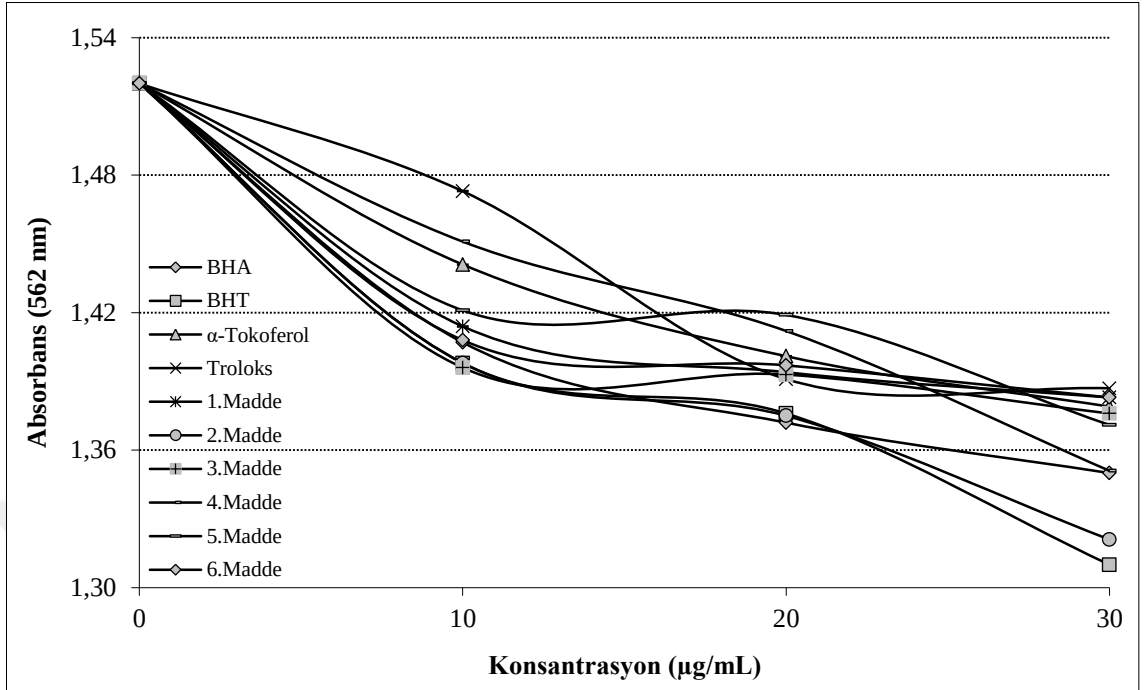
**Şekil 4.70.** Flavonların süperoksit anyon radikalleri süpürme kapasitelerinin grafiksel sunumu

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

Metal şelatlama aktivitesinde azalan absorbans ferrozün bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösterir. Şelatlanan metal iyonu miktarı aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$\text{Ferröz iyonları } (\text{Fe}^{2+}) \text{ şelatlama aktivitesi}(\%) = \left( \frac{\lambda_{562-K} - \lambda_{562-N}}{\lambda_{562-K}} \right) \times 100$$

Formülde verilen  $\lambda_{562-K}$  değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozün ve  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbans değeridir.  $\lambda_{562-N}$  ise su veya etanol ekstratlarının ya da çalışmada kullanılan standart antioksidanların absorbans değeridir (Gülçin *et al.* 2004e).



**Şekil 4.71.** Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/mL) flavonların ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması.

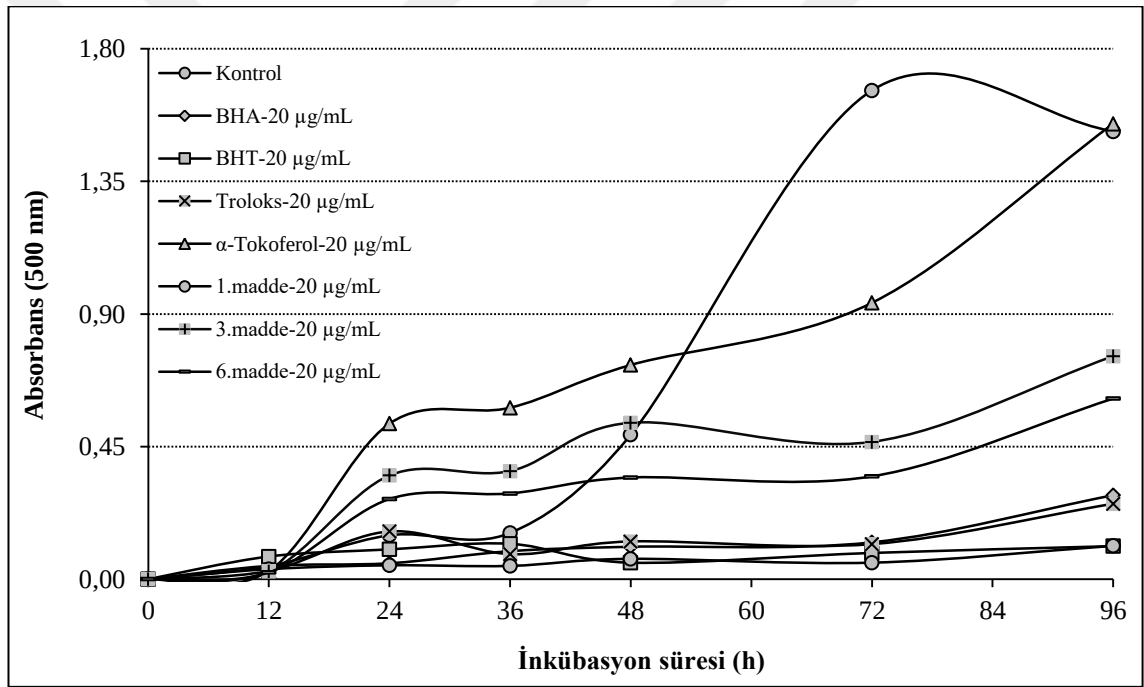
#### 4.2.9. Total antioksidan aktivite bulgular

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin total antioksidan aktivitesi “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) yükseltgenir. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tiosiyanat ( $\text{SCN}^-$ ) ile  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  kompleksi oluşturur. Oluşan bu kompleks ise spektrofotometrik olarak 500 nm’de maksimum absorbans verir. Gözlemlenen yüksek absorbans değeri, peroksidasyon sonucu meydana gelen peroksit miktarının fazlalığını anlamına gelir (Şekil 4.72 ve 4.74).

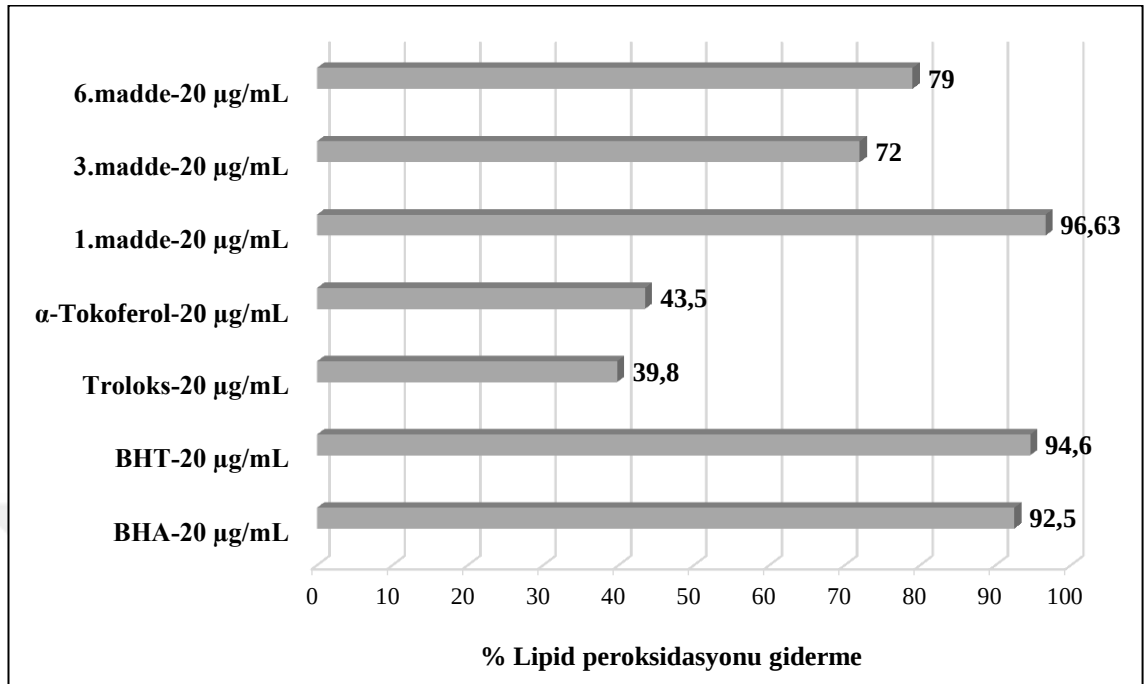
Flavon türevlerinin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten hesaplandı.

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

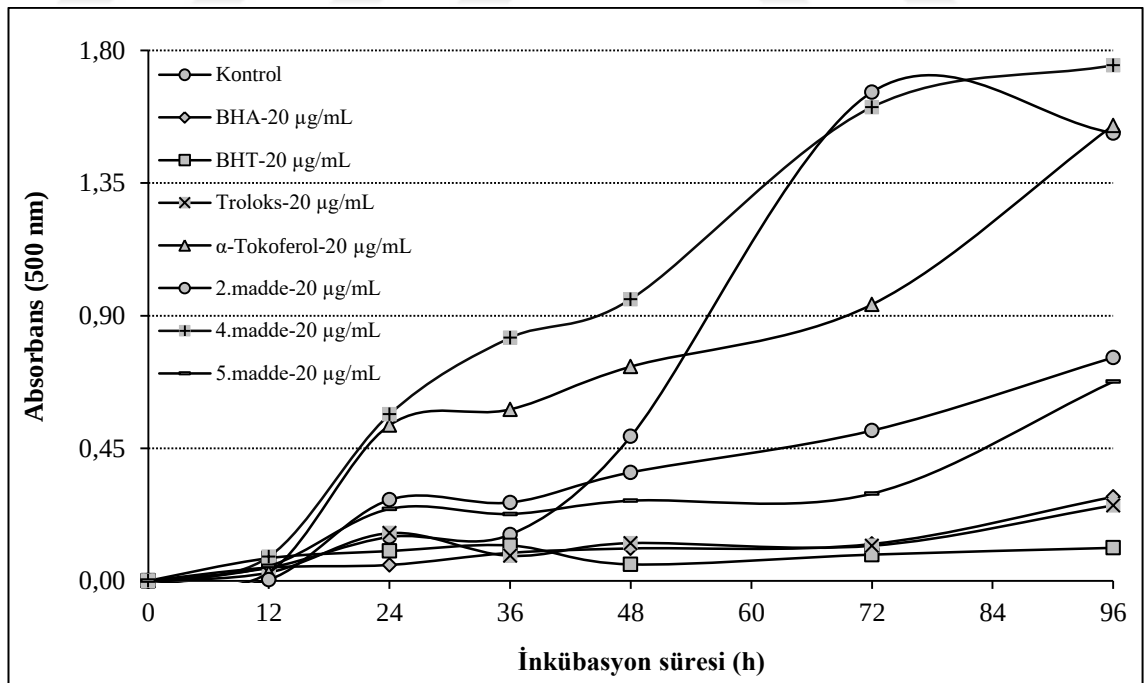
Burada  $\lambda_{500-N}$ , numune veya standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbands değerini,  $\lambda_{500-K}$  ise linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbands değerini gösterir. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks standart antioksidan bileşikleri kullanıldı (Şekil 4.75 ve 4.77).



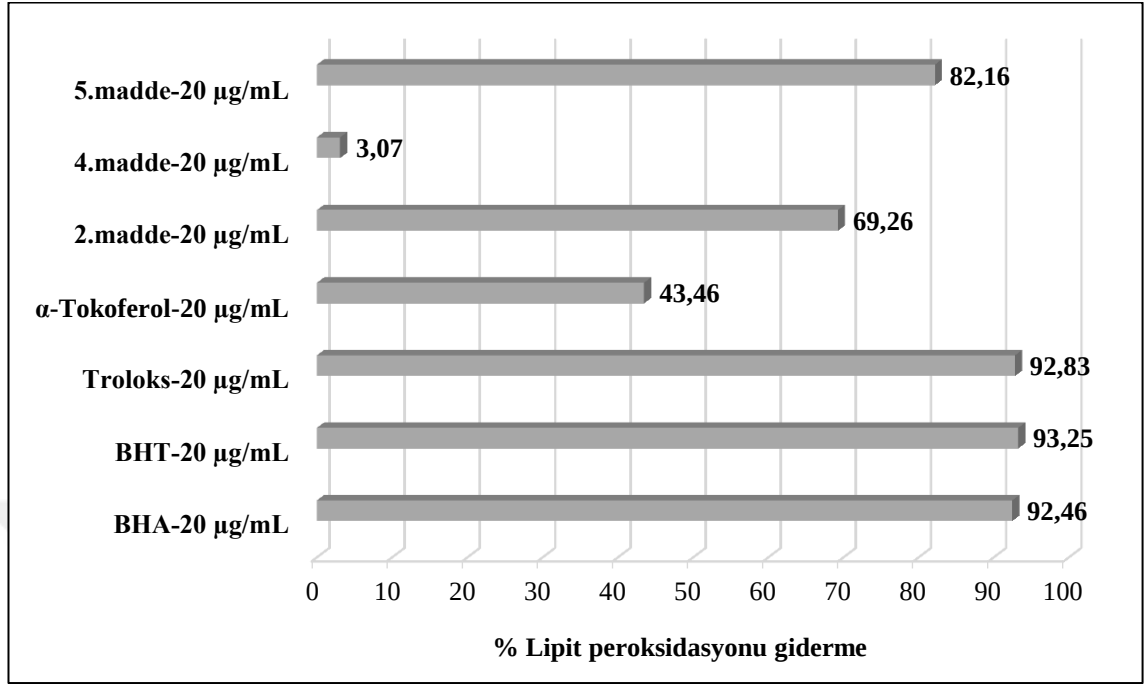
**Şekil 4.72.** 1,3,6 maddelerinin (20 µg/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması



**Şekil 4.73.** 1,3,6 maddelerinin (20 µg/mL) lipit peroksidasyonu % giderme aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması



**Şekil 4.74.** 2,4,5 maddelerinin (20 µg/mL) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması



**Şekil 4.75.** 2,4,5 maddelerinin (20 µg/mL) lipit peroksidasyonu % giderme aktivitesinin aynı konsantrasyondaki BHA, BHT, α-Tokoferol ve Troloks ile karşılaştırması

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antioksidan aktivite, aromatik halkada bulunan hidroksi gruplarının sayısı ve pozisyonuyla ilişkilidir. Fenol halkasındaki hidroksi grupların sayıca artmasıyla oksidasyon önleyici ve hidrojen donörü gibi etkilerde artış olduğu kabul edilmektedir. Antioksidan aktivitenin temelinde, herhangi bir serbest radikalın elektronlarını nötr hale getirebilme yeteneği yatar (Gülçin 2012).

Çalışmada kullanılan bileşiklerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla birçok biyoanalitik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler, çözücü ortamı, hedef reaktif oksijen türleri ve reaksiyon mekanizmaları açısından birbirlerinden farklıdırlar. Bununla beraber total antioksidan kapasite tayin yönteminde bütün bu faktörlerin etkileri kombine edilmiş haldedir. Bu metotta bütün oksidan ajanların varlığında sistemin total oksidasyonu ölçülmektedir. Buna beraber iyi bilinmelidir ki antioksidan aktivite bir antioksidanın tamamen konjuge dien yapısı, aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısı ve bu grupların loklizasyonuna bağlıdır. Bu açıdan bakıldığında farklı çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirleriyle karşılaştırılması zor bir durumdur. Bu yüzden bir yöntemin seçilmesi temel etken reaksiyon mekanizmasının bilinmesi temel faktör faktördür. Kullanmış olduğumuz *in vitro* analitik yöntemleri belirlemek amacıyla; diğer oksidan türler ve biyolojik hedefler ile etkileşimleri, konsantrasyonlar, onların oksidatif stres için önemi ve oksidasyon kaynakları gibi çok önemli bilgi ve bulgular ile ortam şartları çok iyi bilinmeli ve buna göre hazırlanmalıdır (Gülçin 2012).

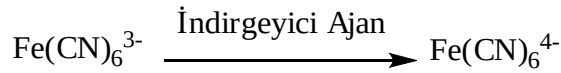
Tez kapsamında hidroksillenmiş bazı flavon türevlerinin (7-Hidroksiflavon, 5-Hidroksiflavon, 6-Hidroksiflavon, 4'-5-Dihidroksiflavon, 5,7-Dihidroksiflavon, 3',4'-Dihidroksiflavon) antioksidan ve antiradikal kapasitelerini belirlemek için gerçekleştirilen biyoanalitik yöntemler; FRAP yöntemine göre  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ indirgeme kapasitesi, kuprak yöntemine göre  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^{+}$  indirgeme kapasitesi,  $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$  transformasyonu metoduna yöntemine göre indirgeme kapasitesi, ferrozin reaktiflerinin kullanılmasıyla iki farklı şekilde ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) şelatlama aktivitesi, DMPD<sup>+</sup>,

DPPH ve ABTS<sup>+</sup> radikalleri giderme aktiviteleri ve son olarak riboflavin-metiyonin-ışık üçlü sisteminde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi, tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini gibi biyoanalitik yöntemler kullanılmıştır. Bu amaçla çalışılan flavon bileşikler firmalardan hazır olarak satın alındı. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen antioksidan ve antiradikal yöntemlerle elde edilen sonuçlar, gıda ve farmokoloji endüstrisinde yaygın olarak kullanılan BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve  $\alpha$ -Tokoferolün suda çözünen bir analogu olan Troloks gibi standartlar kullanılarak değerlendirildi.

Fenolik bileşikler ve flavonoidler bitkilerde var olan antioksidan etkiye sahip bileşiklerdir. Bitkisel sekonder metabolit olarak önem taşıyan bu bileşenler antimikrobiyal etki gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduklarından insan diyetinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir (Nizamlioğlu and Nas 2010; Gülçin 2002). Çıkış maddeleri fenol olan fenolik bileşikler ve flavonoidler polifenoller olarak da adlandırılırlar. Bitkilerde fotomorfogenez reaksiyonları sonucunda oluşurlar. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için güneş ışığı önemli rol oynar. Gallik asit, kuersetin, epikatekin ve *p*-kumarik asit gibi önemli polifenoller metal şelatlayıcı ve lipid peroksidasyonu durdurucu gibi etkilerle oksidasyonu azaltırlar (Gülçin 2002).

Antioksidan etkiye sahip bileşikler; peroksitleri parçalama, radikal giderme, geçiş metali iyonlarını bağlama ve hidrojen abstraksiyonunu önleme gibi değişik mekanizmalarla aktivite gösterebilirler (Diplock 1997; Gülçin 2002). İndirgeme kapasitesi, bir bileşiğin antioksidan etki göstermesindeki en önemli parametrelerden bir tanesidir (Meir *et al.* 1995). İndirgeme kapasitesini belirlemek için farklı çalışma ekipleri tarafından geliştirilen ve modifiye edilen birçok yöntem mevcuttur (Wood *et al.* 2006). Bu çalışma kapsamında; ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduyla  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ indirgeme kapasitesi bunlara ek olarak kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarını ( $\text{Cu}^{+}$ ) indirgeme kapasitesi yöntemleri en yaygın olanlarıdır (Gülçin 2002).

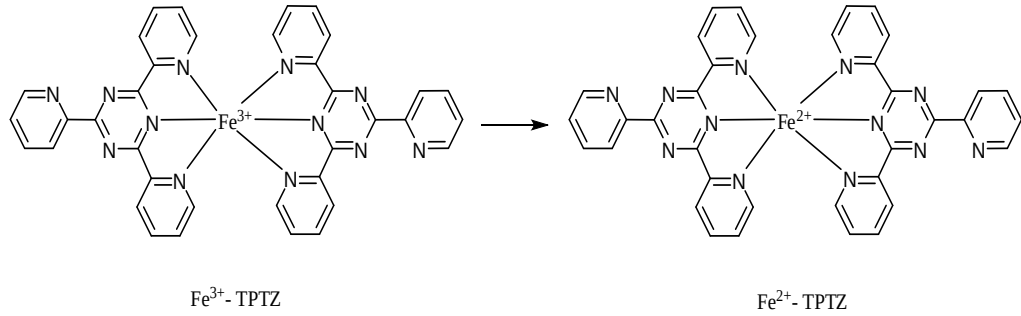
Ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesini ölçmek amacıyla  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3+}$ 'nin  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{2+}$ 'ye dönüşümü incelenmiştir. Bu gözlemler için deney ortamına  $\text{FeCl}_3$  eklenir. Sonuç olarak Prussian mavisi renginde bir kompleks ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) oluşması sağlanır. Oluşan bu kompleks 700 nm'de maksimum absorbans verir (Gülçin 2012).



Test çözeltisinin açık sarı olan rengi, antioksidan etkiye sahip olan maddelerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak mavi-yeşil tonlarına dönüşür. Uygulanan işlemler sonunda tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin troloksa eşdeğer  $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3+}$  indirgeme kapasitesi sergilediği gözlemlenmiştir.

( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) kompleksinin ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) kompleksine indirgendiği kısaca FRAP yöntemi olarak adlandırılan yöntem bir başka indirgeme yöntemidir. Düşük pH ortamında  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ'ün  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ'ye indirgenmesiyle renkli bir kompleksi oluşur. Bu şartlarda oluşan  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ kompleksi oksidan etkiye sahiptir. Ek olarak redoks potansiyeli 0.70 V'tur (Benzie and Strain 1996). Antioksidanların varlığı ve düşük pH ortamında  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ kompleksi renkli  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ kompleksine indirgenir. Bu kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir (Prior *et al.* 2005; Gülçin 2012).

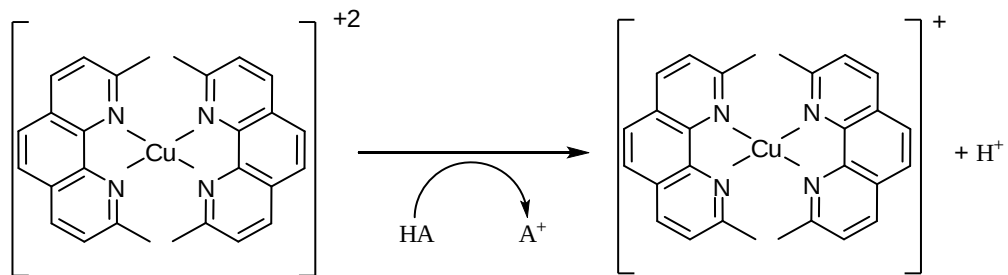
Sonuç olarak tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin troloks eşdeğer karakter gösterdiği gözlemlenmiştir.



**Şekil 5.1.** FRAP yönteminde deney ortamında gerçekleşen ferrik iyonlarının ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenme reaksiyonu

Gülçin ve ekibi tarafından oldukça sık başvurulanan Kuprak yöntemi Apak ve çalışma ekibi tarafından geliştirilmiştir. Daha sonraları bu yöntemin temeline dayanarak aynı ekip tarafından birçok biyoanalitik versiyon geliştirilmiştir (Gülçin *et al.* 2010a; Gülçin *et al.* 2010b).

Kuprak yöntemi; bir kromojenik redoks reaksiyonu olup fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH 7,0) gerçekleştirilen ve bu özelliği ile dikkat çeken bir yöntemdir. Bu yöntemde antioksidan etkiye sahip bileşikler tarafından kuprik iyonlarının ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $\text{Cu}^+$ ) indirgenmesi baz alınmıştır. Çözelti ortamında neokuprinin varlığıyla  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ 'e indirgenir. Neokuprin heterosiklik yapıya sahip organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır.



**Şekil 5.2.** Antioksidan etkiye sahip olduğu düşünülen bir bileşik ile neokuprin arasında oluşan reaksiyon. Bu reaksiyon sonucu oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde absorbans artışı esas alınmaktadır.

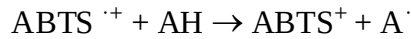
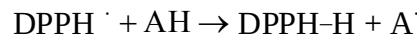
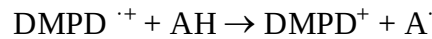
Ölçülen absorbans miktarındaki artış indirgenme miktarının, yani numunenin antioksidan kapasitesinin bir kriteri olarak değerlendirilir (Apak *et al.* 2005; Gülçin

2012). 450 nm'deki absorbans ölçüm sonuçlarına dayanarak tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin troloks eşdeğer karakter sergilediği gözlemlenmiştir.

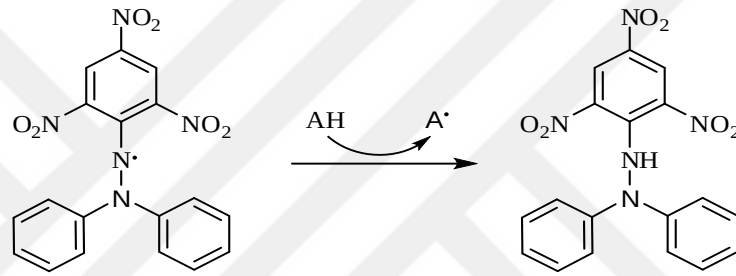
**Çizelge 5.1.** Çalışmada kullanılan flavonların 20 µg/mL konsantrasyonda ferrik ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ve kuprik iyonlarının ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme kapasitelerini standart antioksidanlarla mukayesesi

| Antioksidanlar                       | $\text{Fe}^{3+}$ İndirgeme Metodu | Kuprak Metodu | FRAP Metodu |
|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------|-------------|
| <b>BHA</b>                           | 1,806                             | 1,962         | 2,505       |
| <b>BHT</b>                           | 1,199                             | 1,407         | 2,240       |
| <b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b> | 0,890                             | 1,006         | 1,554       |
| <b>Troloks</b>                       | 1,069                             | 0,854         | 1,621       |
| <b>1.Madde</b>                       | 1,507                             | 0,117         | 2,786       |
| <b>2.Madde</b>                       | 0,206                             | 1,603         | 0,400       |
| <b>3.Madde</b>                       | 0,188                             | 0,084         | 0,477       |
| <b>4.Madde</b>                       | 0,270                             | 2,015         | 0,588       |
| <b>5.Madde</b>                       | 0,305                             | 0,086         | 0,889       |
| <b>6.Madde</b>                       | 0,194                             | 0,077         | 0,512       |

$\text{ABTS}^{\cdot+}$ ,  $\text{DMPD}^{\cdot+}$ ,  $\text{DPPH}^{\cdot}$  ve  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikallerini kullanarak yapılan yöntemler saf antioksidan maddelerin, bitkisel ekstraktların, yiyecek ve içeceklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan en yaygın spektrofotometrik radikal giderme metotlarıdır. Ek olarak bu yöntemler hızlı, basit, tekrarlanabilir ve seçici oldukları için çalışılan bileşiklerin radikal giderme kapasitelerini belirlemek amacıyla kullanımları oldukça yaygındır (Özçelik *et al.* 2003; Gülçin 2012). Bunlardan pembe renkli  $\text{DMPD}^{\cdot+}$ , yeşil-mavi renkli  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  ve menekşe renkli  $\text{DPPH}^{\cdot}$  kromojenlerini kullanmak oldukça kolaydır. Yüksek duyarlılığa sahip olan bu yöntemler pek çok benzer çalışmada kolay bir şekilde kullanılabilirler (Awika *et al.* 2003).

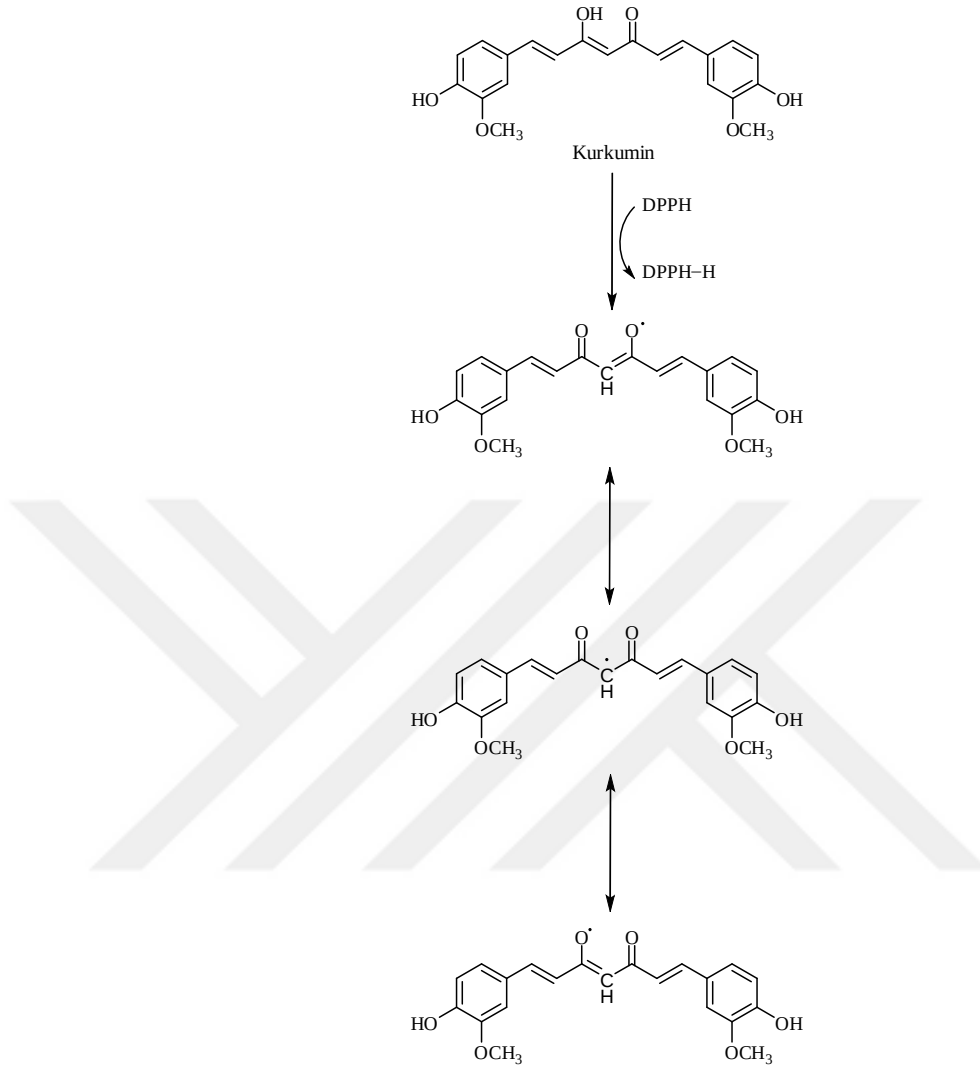


Antioksidan kapasite belirlemek amacıyla kullanılan ilk yöntemlerden birisi de DPPH<sup>•</sup> radikali giderme tayin yöntemidir. Bu radikali kararlı, uzun ömürlü, azot merkezli ve mor renkli bir serbest radikaldır. Bu yöntem hidrojen verici gruplara sahip antioksidanların varlığında, alkolde çözünen DPPH<sup>•</sup> radikallerinin indirgenmesine ve DPPH<sup>•</sup> radikallerine karşı antioksidanların indirgeme kabiliyetlerinin ölçüm esasına dayanır. Bu işlemler sonunda radikal olmayan ve 517 nm’de absorbands veremeyen DPPH-H molekülü oluşur. Sonuçta DPPH<sup>•</sup> serbest radikali miktarındaki azalma 517 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (Gülçin 2002; Gülçin 2012).

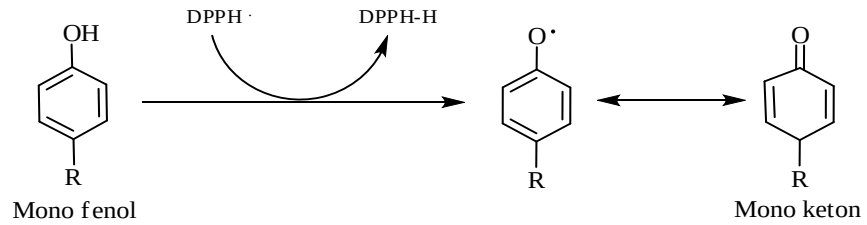


**Şekil 5.3.** DPPH<sup>•</sup> serbest radikalinin giderilmesi mekanizması

Gülçin tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kurkuminin DPPH<sup>•</sup> serbest radikal giderme mekanizması aydınlatılmıştır (Ak and Gülçin 2008).



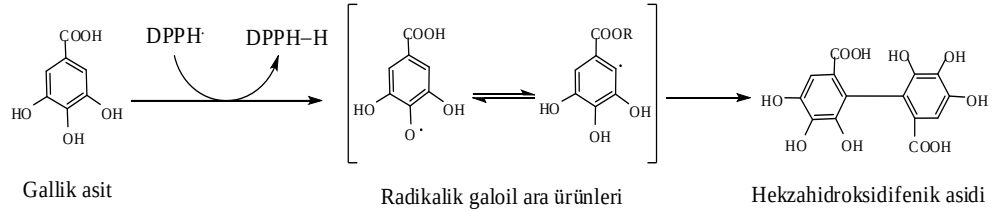
**Şekil 5.5.** DPPH serbest radikali ile kurkumin arasındaki ön görülen mekanizma



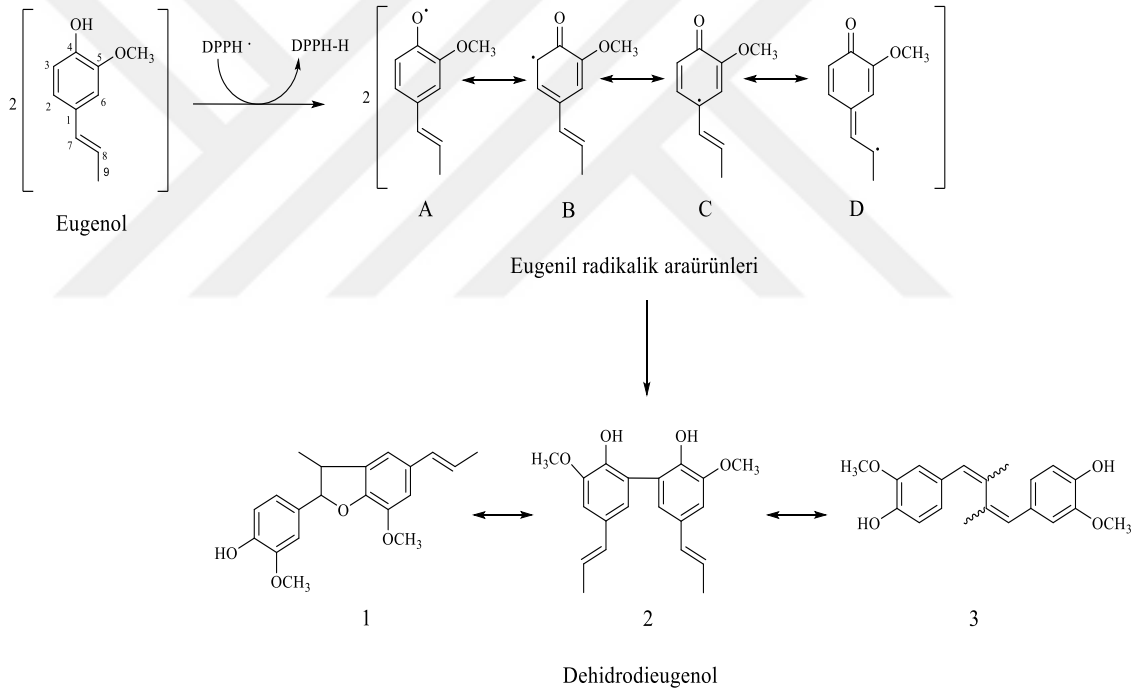
**Şekil 5.6.** Mono fenoller için muhtemel DPPH·-serbest radikali giderme mekanizması

*p*-kumarik asit, *p*-Hidroksibenzoik asit ve ferulik asit gibi mono fenoller ise bir fenolik grup kapalı olduğundan dolayı ancak bir DPPH· ile etkileşebilirler. Polifenol radikallerinin yüksek aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Ayrıca polifenol

radikalleri farklı C-C ve C-O grupları üzerinden kapling reaksiyonları vererek dimerleşirler.



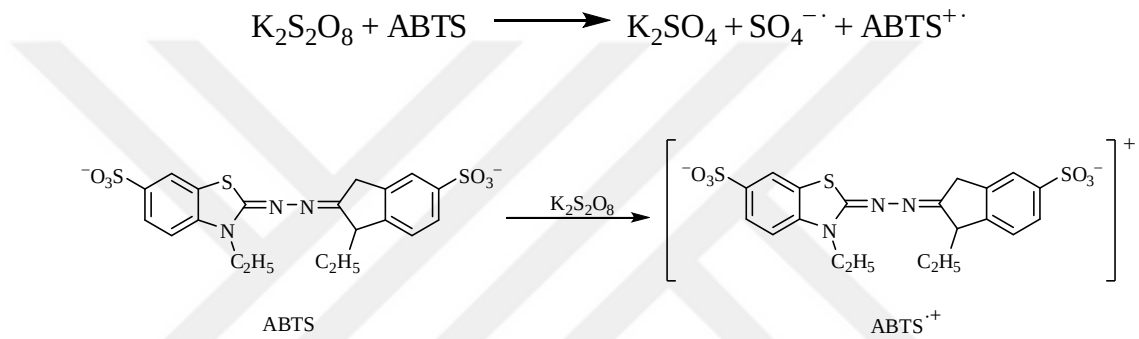
**Şekil 5.7.** Gallik asit molekülünün birebir DPPH· serbest radikalini söndürmesi ve radikalik galoil ara ürününün önerilen oluşum mekanizması



**Şekil 5.8.** Eugenol molekülünün DPPH· serbest radikalini söndürmesi ve radikalik Eugenil ara ürünlerinin oluşumu mekanizması

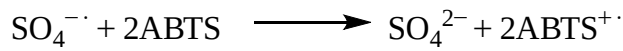
DPPH· serbest radikali giderme aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında tez kapsamında kullanılan flavon türevlerinin DPPH serbest radikali giderme kapasitelerini yorumlamak amacıyla  $IC_{50}$  değerleri çizilen grafik yoluyla hesaplandı. Azalan grafik esas alınarak yapılan yorumlamada bileşiklerin troloks standardı gibi davrandıkları gözlemlendi.

Bu çalışmalara ek olarak  $ABTS^{+\cdot}$  radikali giderme kapasitesi tayin yöntemi de gerçekleştirildi. Bu bağlamda; ABTS oksidanlar tarafından yükseltgendi ve sonuçta  $ABTS^{+\cdot}$  radikali oluşturuldu. Oksidan olarak  $K_2S_2O_8$  kullanılabildiği gibi  $Mn_2O_3$ 'de kullanılabilir.  $ABTS^{+\cdot}$  hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler için uygulanabilir. Burada tanımlanan  $ABTS^{+\cdot}$  radikali oluşumu için uygulanan yöntem, ABTS ve potasyum persülfat ( $K_2S_2O_8$ ) arasındaki reaksiyon sonucu direkt oluşan mavi yeşil  $ABTS^{+\cdot}$  kromoforunun 734 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

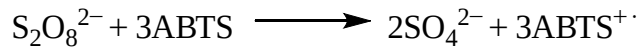


**Şekil 5.9.**  $ABTS^{+\cdot}$ 'nin kimyasal yapısı ve  $K_2S_2O_8$  ile ABTS'nin yükseltgenmesi mekanizması

Peroksidisülfatın parçalanması elektron transferinden sonra gerçekleşir. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali aşağıdaki reaksiyona göre tepkime verir.



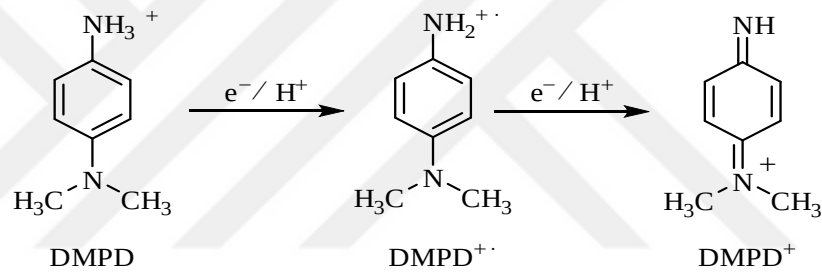
Ve net denklem:



$ABTS^{+\cdot}$  radikal giderme yöntemi geniş pH aralıklarında kullanılabilen bir yöntemdir.  $ABTS^{+\cdot}$  gıda maddelerinde antioksidanlarla yaklaşık 30 dakika gibi kısa bir sürede reaksiyon verebilir. Ek olarak,  $ABTS^{+\cdot}$  hem suda hem de organik çözücülerde çözünür ve iyonik şiddetten etkilenmez (Gülçin 2012).

ABTS<sup>•+</sup> radikali giderme aktivitesi yönteminde kullanılmak amacıyla ABTS<sup>•+</sup> radikali için hazırlanan standart grafik çizildi. ABTS<sup>•+</sup> radikal giderme aktivitesi için IC<sub>50</sub> değerleri her bir standart ve her bir bileşik için hesaplandı. Bileşiklerin troloks standardı gibi davrandıkları gözlemlendi.

Antioksidan kapasite belirlemek için yapılan çalışmalarda kullanılan başka bir radikal giderme yöntemi ise DMPD<sup>•+</sup> radikal giderme yöntemidir. Bu yöntem; asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu olan DMPD<sup>•+</sup>'nin oluşma esasına dayanmaktadır. DMPD<sup>•+</sup> radikali 505 nm'de maksimum absorbands gösterir (Gülçin 2012).

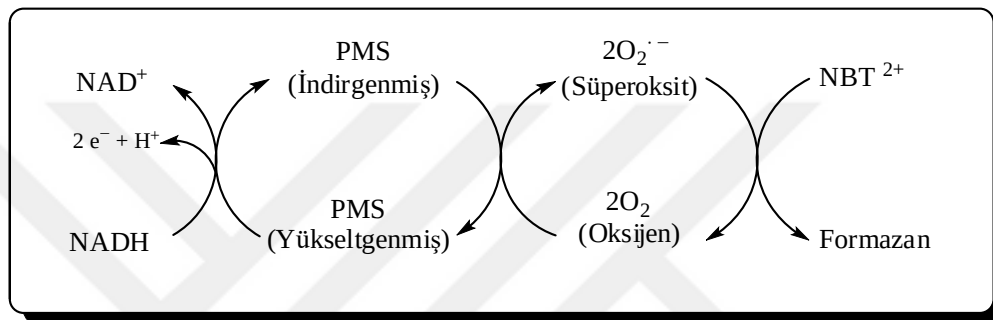


**Şekil 5.10.** Kararlı DMPD<sup>•+</sup> radikalinin oluşum ve giderilme mekanizması

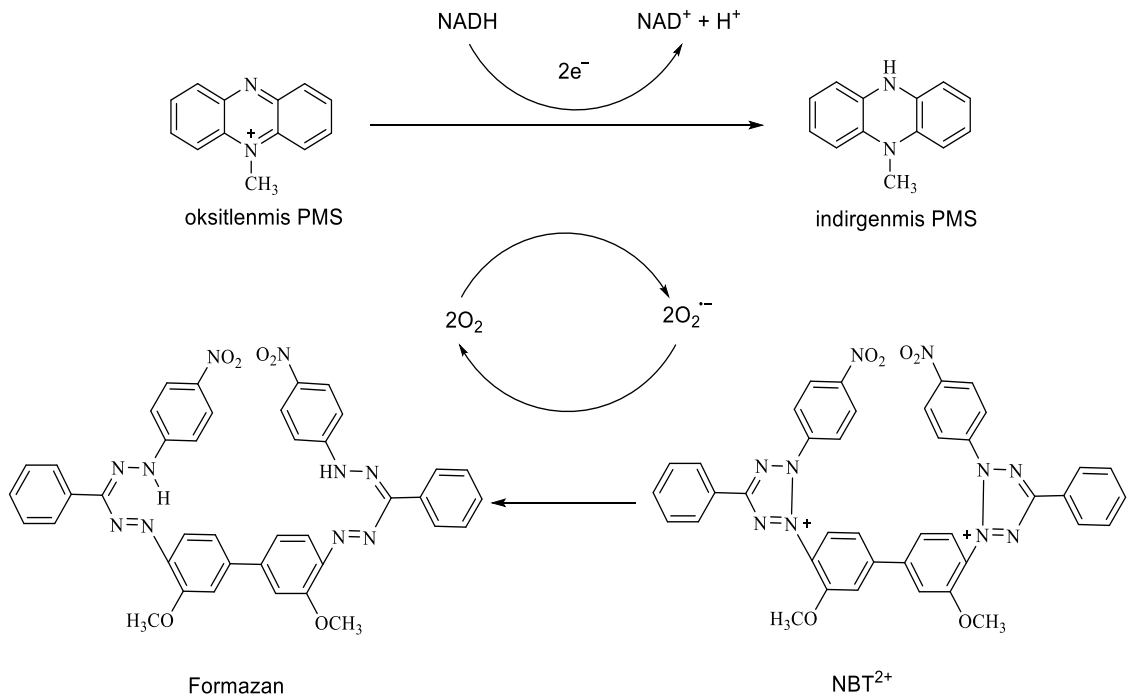
DMPD<sup>•+</sup> radikal giderme aktivitesi için IC<sub>50</sub> değerleri her bir standart ve her bir bileşik için hesaplandı. DMPD<sup>•+</sup> radikali giderme kapasitesini belirlemek için standart grafik çizildi. DMPD<sup>•+</sup> radikali giderme kapasitesi tayininden sonra geriye kalan DMPD<sup>•+</sup> radikal miktarı çizilen standart grafik yardımıyla hesaplandı. Numunelerin BHT standardı gibi karakter gösterdiği belirlendi.

Oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilen süperoksit anyon radikalleri katalaz ve peroksidaz enzimlerini inaktive edebilir. Ek olarak eritrosit membranını parçalayabilirler. DNA lipit ve protein gibi önemli biyomoleküllerde oksidatif hasara yol açan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi kendinden daha aktif olan reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olurlar (Gülçin 2005; Gülçin 2012).

Bu çalışmada süperoksit anyon radikali oluşturmak için riboflavin/metiyonin/ışık sisteminde kullanıldı. Elde edilen süperoksit anyon radikali  $\text{NBT}^{2+}$ 'yi formazana yükseltgime yeteneğine sahiptir. Bu yöntemde, süperoksit anyonunun yeşil rengi spektrofotometrik olarak 560 nm'de maksimum absorbans verebilen formazanın mavi rengine dönüşür. Antioksidan bileşikler NBT'nin mavi renkli formunun oluşmasını engellerler.

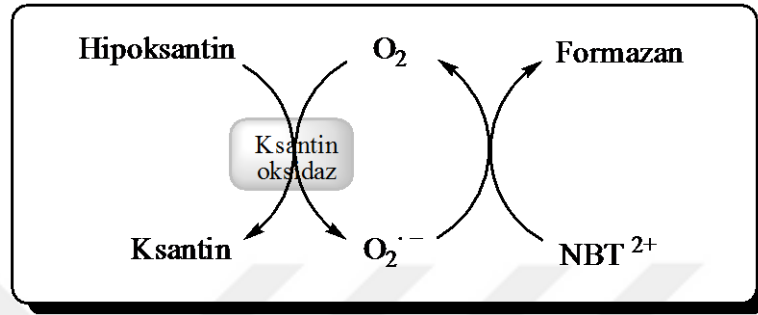


**Şekil 5.11.** NADH/PMS sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin  $\text{NBT}^{2+}$ 'yi formazana yükseltgemesi

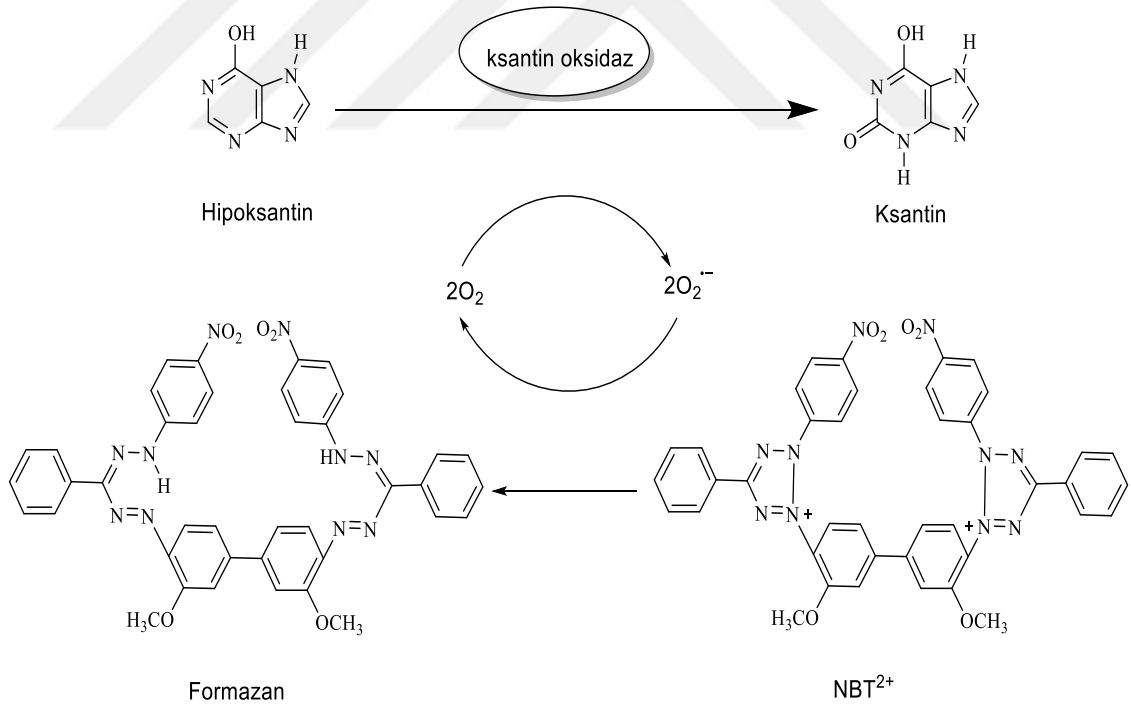


**Şekil 5.12.** NADH/PMS sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin  $\text{NBT}^{2+}$ 'yi formazana yükseltgime mekanizması

Süperoksit anyon radikali giderme kapasitesini belirlemek amacıyla kullanılan bir başka biyoanalitik yöntem pH 7’de süperoksit anyonu oluşturan ksantin/ksantin oksidaz sistemidir.



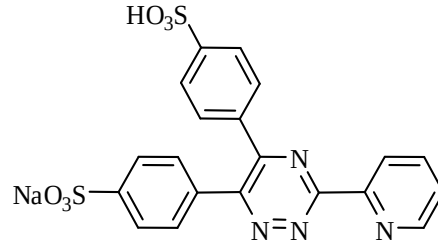
**Şekil 5.13.** Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde oluşan süperoksit anyon radikallerinin  $NBT^{2+}$ ’yi formazana yükseltmesi



**Şekil 5.14.** Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin  $NBT^{2+}$ ’yi formazana yükseltme mekanizması

Antioksidan bir molekülün ferrozin reaktifi ile metal şelatlama aktivitesinin ölçümü, test çözeltisi ile önceden hazırlanmış ferröz iyonu çözeltisinin muamelesiyle oluşan  $Fe^{2+}$ -

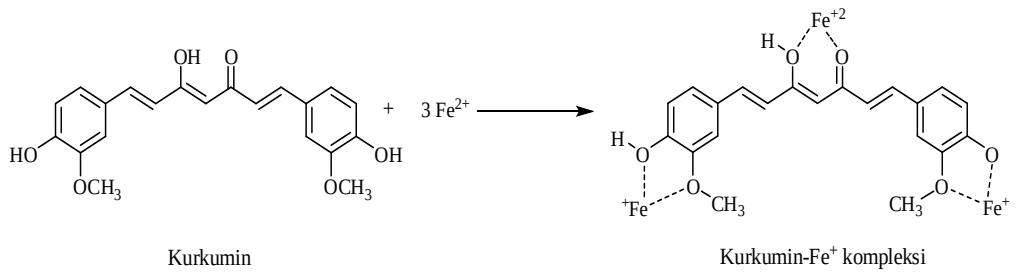
ferrozin kompleksinin 562 nm’de absorbans ölçümüne dayanır. Meydana gelen kompleks kırmızı renklidir.



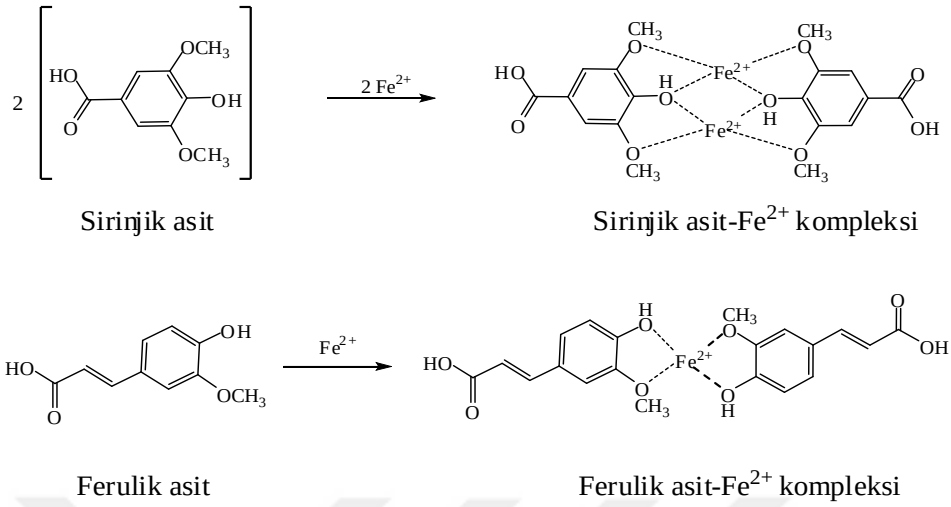
**Şekil 5.15.** Ferrozinin molekülünün yapısı

Şelatlayıcı ajanların sekonder antioksidan olarak etki ettiği bilinmektedir. Bu bileşikler metal iyonlarının redoks potansiyellerini azaltır ve bu sayede metal iyonlarının okside formlarını stabilize ederler.

Bir gıda maddesi olan kurkumin ferröz-ferrozin kompleksinin oluşumunu engeller (Gülçin 2012).



**Şekil 5.16.** Kurkuminin ferröz iyonlarını (Fe<sup>2+</sup>) şelatlama reaksiyonu



**Şekil 5.17.** Siringik asit ve ferulik asitin ferröz iyonu (Fe<sup>2+</sup>) ile bağlanma mekanizmaları

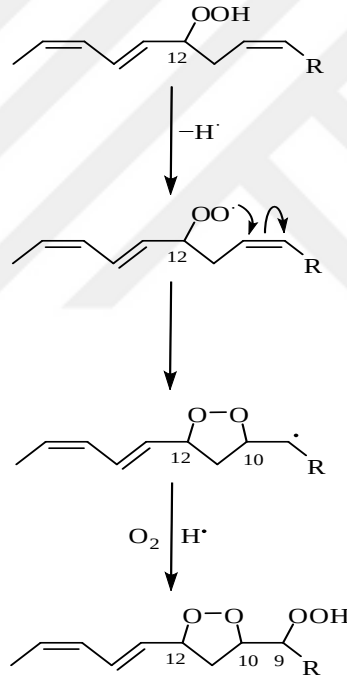
Tez kapsamında kullandığımız flavon türevlerinin ferrozin reaktifi ile yapılan metal şelatlama kapasitesi bakılmış ve sonuçlar standart antioksidanlarla kıyaslanmıştır. Bu yöntemde azalan absorbans; ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının şelatlandığını gösteren bir belirteçdir.

**Çizelge 5.2.** Çalışmada kullanılan flavonlara ve standart antioksidanlara ait radikal giderme ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili IC<sub>50</sub> (µg/mL) değerleri

| Antioksidanlar     | DPPH <sup>•</sup><br>Giderme | ABTS <sup>•+</sup><br>Giderme | DMPD <sup>•+</sup><br>Giderme | O <sub>2</sub> <sup>•-</sup><br>Giderme | (Fe <sup>2+</sup> ) Metal<br>Şelatlama |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>BHA</b>         | 21,00                        | 4,68                          | 36,47                         | 11,00                                   | 34,65                                  |
| <b>BHT</b>         | 21,00                        | 4,71                          | ****                          | 10,07                                   | 23,10                                  |
| <b>α-Tokoferol</b> | 19,80                        | 5,37                          | ****                          | 12,03                                   | 34,65                                  |
| <b>Troloks</b>     | 15,07                        | 5,68                          | 32,41                         | 11,57                                   | 49,50                                  |
| <b>1.Madde</b>     | 18,73                        | 6,03                          | 43,31                         | 12,38                                   | 34,65                                  |
| <b>2.Madde</b>     | 17,33                        | 10,19                         | 33,00                         | 13,59                                   | 39,21                                  |
| <b>3.Madde</b>     | 17,33                        | 33,00                         | 40,76                         | 11,36                                   | 46,20                                  |
| <b>4.Madde</b>     | 17,33                        | 21,66                         | 34,65                         | 13,86                                   | 34,65                                  |
| <b>5.Madde</b>     | 12,11                        | 23,10                         | 34,65                         | 10,83                                   | 34,65                                  |
| <b>6.Madde</b>     | 11,45                        | 25,67                         | 36,47                         | 11,00                                   | 34,65                                  |

Total antioksidan kapasitesi, gıda ve tıbbi biyoaktif bileşenler için bir parametre olarak kullanılır. Bu metot, lipid peroksidasyonu gibi oksidatif bozulmayı önlemek için bir

bileşiğin kabiliyeti olarak tanımlanmıştır. Lipit peroksidasyonu, hidrojen zengin metilen grupları içeren çoklu doymamış yağ asitlerinin ROS saldırısına uğramasıyla başlayan zincirleme tepkimelerdir. Lipit oksidasyonu, bir dizi serbest radikal zincir reaksiyonları sonucu oluşur ve birçok biyolojik hasarla ilişkilidir. Genelde biyoaktif bir maddenin olası etkisini belirlemek için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu azaltabilme kabiliyeti test edilir. Peroksitler linoleik asitin oksidasyonu boyunca oluşur. Antioksidanların varlığında linoleik asitin oksidasyonu azalır. Bu yüzden antioksidanlar, lipit peroksidasyonunun inhibe edilmesinde ve ROS'in zararlı etkilerine karşı korunmada çok önemli rol oynarlar (Gülçin 2012).



**Şekil 5.18.**  $\alpha$ -Linoleik asitten otooksidasyon sonucu endoperoksit'e dönüşümü

Tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin total antioksidan aktivitesi “Tiosiyanat Metoduna” göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ferrik iyonlarına ( $\text{Fe}^{3+}$ ) yükseltir. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tiosiyanat ( $\text{SCN}^-$ ) ile 500 nm’de maksimum absorbans veren  $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$  kompleksini oluşturur. Görülen yüksek absorbans değeri, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazla olduğunun göstergesidir. Deney periyodik olarak 12 saatte bir ölçüm alınarak toplam 72/96 saatte

geçekleştirildi. Bileşiklerimizin 10 µg/mL konsantrasyonundaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin 500 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlendi. Daha sonra absorbansa karşı inkübasyon süresine ait grafik çizildi ve sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Ek olarak standart antioksidanlar ve bileşiklerin linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri hesaplandı. Bileşiklerimizin troloks ve BHT eşdeğer davranış gösterdikleri gözlemlendi.

Doktora programı kapsamında ilerletilen tez çalışmaları içeriğimizi belirlerken günümüz literatürü dikkate alınmış var olan ekipmanlarımız doğrultusunda yol haritası çizilmiştir. Bu bağlamda ilk etapta yukarıda bahsettiğim antioksidan çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra metabolik öneme sahip bir dizi enzimle kinetik çalışmalar yapılmıştır. Sırasıyla hCA I ve hCA II, AChE, BChE ve LPO üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesiyle çalışmamız sonlandırılmıştır.

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1) enzimi, genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> transportunu sağlayan bir enzimdir ek olarak çoğu dokuda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> birikiminde de görev almaktadır. Eritrosit içeren birçok dokuda başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Karbonik anhidraz enzimi pH düzenleyici bir enzim olarak bilinmektedir ve reaksiyon hızını arttırarak saniyede 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> arttırarak karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü sağlar (Gülçin *et al.* 2004f). Bu dokulara; gastrik mukoza, böbrek ve göz lensi örnek olarak verilebilir. Çalışmalar devam ettikçe sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, histokimyasal metotlarla kaslar, çeşitli bakteriler, balık eritrositleri, sıçan tükrüğü, sıçan eritrositleri, beyin ve endometrium dokularından, sığır kemiği, sığır lökositleri, tükürük bezleri, prostat, sinir miyelin kılıfı, pankreas ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış akabinde karakterize edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

Çalışma kapsamında kullandığımız hCA I ve II izoenzimleri insan eritrositlerinden afinite kromatografisi metodu ile saflaştırıldı. Bunun için Sepharose-4B-L-tirozin kimyasal yapısına sahip jel tarafımızdan hazırlanmıştır. Afinite jeli, Sepharose 4B katı

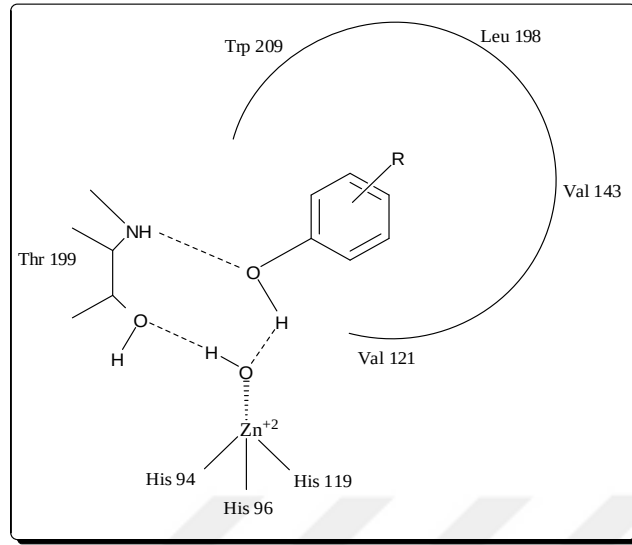
destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlanmış, daha sonra sülfonamit diazolanarak L-Tirozine kenetlendirilmiştir. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-Tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamit oluşturur. Sülfanilamit enzimin spesifik bir inhibitörü olduğu için afinite jelinde ligant olarak kullanılmıştır (Farell *et al.* 1997; Akincioğlu *et al.* 2013). Tirozinin kullanma amacı ise enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamaktır ve bu nedenle tirozin uzantı kolu olarak seçilmiştir. Zira karbonik anhidrazın aktif bölgesi enzimin globüler yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğu X ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Cuatrecasas 1970). Bu durumda hazırlanan afinite jeline belirtilen derinliğe erişebilmek için istenilen uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır (Chegwidden *et al.* 2000). Hazırlanan jel kullanılarak hCA I ve II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Jele tutunan hCA I ve II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 1 M NaCl (pH 6,3) ve 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/ 0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH 5,6) tampon çözeltileri kullanıldı.

Amstrong ve arkadaşları tarafından değiştirilen esteraz aktivitesi belirleme yönteminin esası karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (Amstrong *et al.* 1966). Karbonik anhidraz enzimi, *p*-nitrofenilasetatı *p*-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de maksimum absorbans vermektedir.

**Çizelge 5.3.** hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren flavon türevlerinin ortalama  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri

| Flavon türevleri       | İzoenzimler                                                                   |                                                                              |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                        | hCA I (nM)                                                                    | hCA II (nM)                                                                  |
| 3',4'-Dihidroksiflavon | $IC_{50}$ : 38,5082<br>$K_i$ : 17,5129±0,6438<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı   | $IC_{50}$ : 33,0070<br>$K_i$ : 28,1566±10,1317<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 6-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 46,2098<br>$K_i$ : 53,2637±10,4154<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmasız | $IC_{50}$ : 34,6574<br>$K_i$ : 14,6679±2,9306<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı  |
| 7-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 46,2098<br>$K_i$ : 32,6242±1,2565<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı   | $IC_{50}$ : 38,5082<br>$K_i$ : 21,9575±4,9697<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı  |
| 5-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 38,5082<br>$K_i$ : 34,4628±7,004<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı    | $IC_{50}$ : 49,5105<br>$K_i$ : 13,2813±0,9508<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı  |
| 4'-5-Dihidroksiflavon  | $IC_{50}$ : 46,2098<br>$K_i$ : 37,9864±13,7985<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı  | $IC_{50}$ : 43,3217<br>$K_i$ : 17,4890±4,2475<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı  |
| 5,7-Dihidroksiflavon   | $IC_{50}$ : 43,3217<br>$K_i$ : 30,5617±8,2804<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı   | $IC_{50}$ : 33,0070<br>$K_i$ : 34,3382±3,7631<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmasız |

Yapılan çalışmalarda enzimin aktif bölgesinde bulunan  $Zn^{2+}$  iyonu ile fenollerin fonksiyonel aromatik -OH gurubunun bağlandığını gösterilmiştir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla -OH'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin hCA ya bağlandığı tespit edilmiştir (Şentürk *et al.* 2009).



**Şekil 5.19.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan  $Zn^{2+}$  iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon etkileri incelendi.. AChE asetilkolinin hidrolizini sağlar, nörotransmitter olan asetilkolinin iletimini sağladıktan sonra yıkımını katalizler. Asetilkolin biyolojik açıdan önem taşıyan bir esterdir (Nacmansohn 1952). Daha önceleri araştırmacılar tarafından bu esterlin sadece sinir uçlarından etkilediği iki sinir ucu arasında iletim sağladığı düşünülüyordu. Son zamanlarda artan çalışmalarla birlikte asetilkolinin sadece bu görevi yaptığı değil aynı zamanda sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da rol aldığı tespit edilmiştir (Wilson and Nachmansohn 1952; Carlson 1992). AChE asetilkolin adlı nörotransmitteri asetat ve kolin olarak parçalarken, diğer nörotransmitterler; dopamin, serotonin ve norepinefrini parçalamazlar. Bu nörotransmitterler sinaptik boşluk tarafından emilirler ve merkezi sinir iletiminde önemli görevler üstlenirler. AChE başlıca beyinde, sinir hücrelerinde, eritrositlerde ve kasta bulunur, psöodokolinesterazda aynı mekanizmaya sahiptir fakat plazmada bulunmakta ve asetilkolin yıkımını dolaşımda sağlamaktadır (Wilson and Nachmansohn 1954).

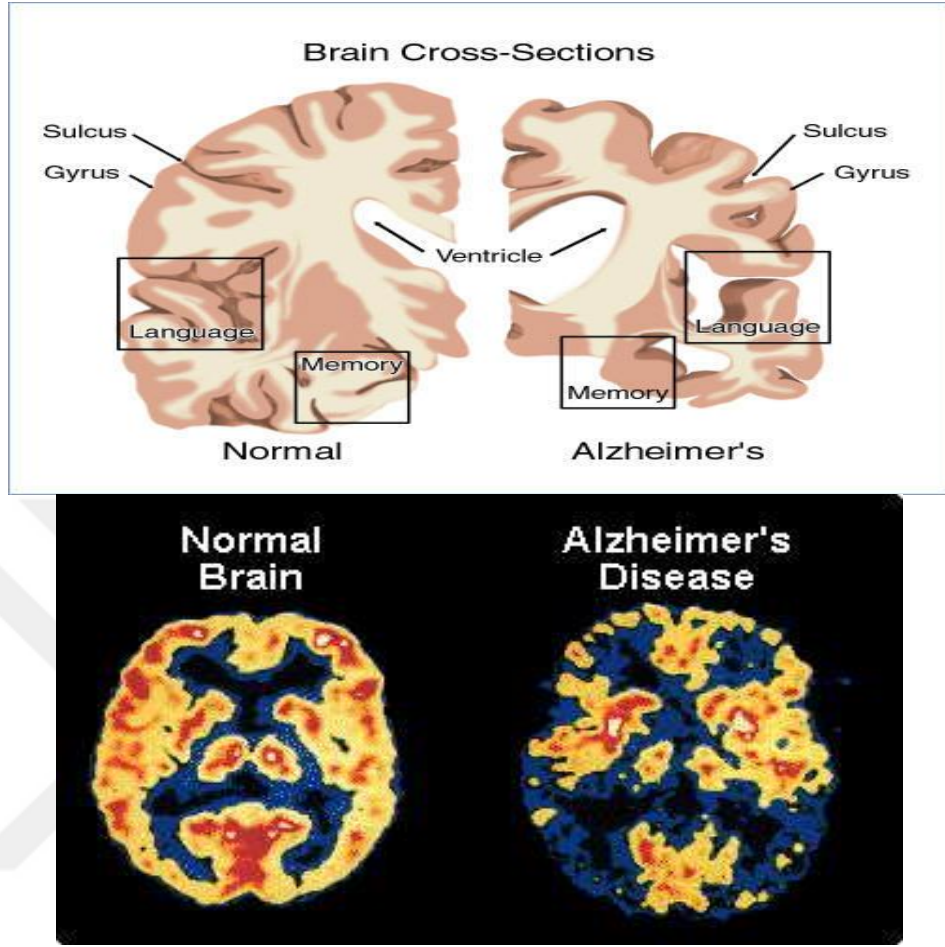
Oksidan moleküller, aktive edilmiş nötrofiller ve makrofajlardan üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve ağırlı patojenik

hastalıklara sebep olmaktadır (Gibson and Huang 2005; Fawole *et al.* 2010). Genellikle yaşı bireylerde rastlanan

Alzheimer hastalığı farklı biyokimyasal yollarda meydana gelen sorunlar neticesinde baş gösterir. Bu hastalık beyindeki nörotransmitterlerin azalmasına sebep olur ve en fazla azalma gösteren nörotransmitter asetilkolindir. Hastalığın tedavisi ya da engellenmesi için asetilkolin yıkımının azaltılması gerekmektedir. Bu durum asetilkolini yıkan AChE'nin inhibisyonu ile sağlanabilir. Alzheimer hastalığı için kullanılan ve dizayn edilen ilaçlar asetilkolin seviyesini kontrol etmede kullanılır ve ilaç dizaynı ona göre yapılır (Heinrich and Teoh 2004).

Günümüze kadar konuyla alakalı sürdürülen çalışmalar, genellikle AChE üzerine inhibisyon etkisi için çalışılan ilaçlar ve inhibitör olarak dizayn edilen ilaçlar üzerine olmuştur. Bu ilaçların; gastrointestinal sistem rahatsızlıkları, hepatotoksisite, bulantı, kusma, ishal, baş dönmesi gibi birçok yan etkileri vardır (Schulz 2003; Mukherjee *et al.* 2007). Yan etkilerin bu denli ciddi ve sık rastlanabilir olması araştırmacıları yeni ilaç arayışına itmektedir. Çalışmamızda kullandığımız flavon türevleri bu amaçla kullanılabilir mi soruuna cevap bulmak için AChE üzerine inhibisyon çalışmaları düzenlenildi. Flavonlar fenolik bileşikler sınıfındandır ve fenolik bileşikler serbest radikal süpürme özelliklerine sahiptirler. Serbest radikaller doku ve hücrelerde birçok hastalığa sebep olmaktadır ve bu hastalıklardan biride Alzheimer hastalığıdır. Fenolik bileşikler serbest radikalleri giderdiği gibi onların neden olduğu hastalıkları da engellerler.

AChE enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılan bileşiklerin  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri belirlendi. Bu çalışma Ellman metoduna (Ellman 1961) göre belirlendi. Sonuçların nM seviyede olması antioksidan ve radikal giderme özelliği taşıyan bileşiklerin etkili bir şekilde kullanılabileceği yorumu yapıldı. Elde edilen veriler göz önüne alındığında bu bileşiklerin farmakolojik çalışmalarda yol gösterici olabileceği bunun yanısıra bulunan sonuçların alzheimer hastalığı ve hastalığın tedavisinin araştırılması açısından tetikleyici bir unsur olabileceği düşünülmüştür.



**Şekil 5.20.** AD hastalarının beyinlerinde dil ve hafıza kısımlarında meydana gelen bozukluklar ve PET görüntüleri.

Kolin esterazlar; AChE ve Bütirilkolin esteraz olarak ikiye ayrıldığı bilinmektedir. Ester içeren bileşiklerin metabolizmasında önemli rol oynayan BChE; ACh'yi hidrolize edebilir. Alzheimer hastalığında düzeyi azalmaz bu durumda düzeyinin arttığı bile gözlenmiştir. Normal şartlarda beyinde AChE baskındır fakat AD hastalarının beyinde AChE aktivitesi değişmeden kalırken veya azaldığında BChE aktivitesi yükselir. BChE normal durumlarda veya AChE aktivitesi azaldığında kolinerjik nöronlardaki asetil kolin seviyesini modüle ettiği için dikkat çekmiştir. Sonuç olarak AChE'nin yanında BChE'de AD hastalığında önemli bir role sahip olduğu bilinmelidir. Tüm bu bilgiler ışığında BChE'nin üzerine flavon türevlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin  $K_i$  ve  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir.

**Çizelge 5.4.** Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren flavon türevlerinin  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri

| <b>Kolinesterazlar</b>  |                                                                                           |                                                                                           |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Flavon türevleri</b> | <b>AChE (nM)</b>                                                                          | <b>BChE (nM)</b>                                                                          |
| 3',4'-Dihidroksiflavon  | $IC_{50}$ : 43,3217<br>$K_i$ : 14,8754 $\pm$ 1,985<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı   | $IC_{50}$ : 33,0070<br>$K_i$ : 8,7322 $\pm$ 0,6618<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı   |
| 6-Hidroksiflavon        | $IC_{50}$ : 49,5105<br>$K_i$ : 13,4841 $\pm$ 3,0220<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  | $IC_{50}$ : 24,7553<br>$K_i$ : 5,6941 $\pm$ 2,0058<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı   |
| 7-Hidroksiflavon        | $IC_{50}$ : 53,3190<br>$K_i$ : 18,2651 $\pm$ 6,7566<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmasız | $IC_{50}$ : 30,1368<br>$K_i$ : 18,6500 $\pm$ 2,2632<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  |
| 5-Hidroksiflavon        | $IC_{50}$ : 46,2098<br>$K_i$ : 13,9762 $\pm$ 6,4788<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  | $IC_{50}$ : 43,3217<br>$K_i$ : 15,6301 $\pm$ 3,6101<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  |
| 4'-5-Dihidroksiflavon   | $IC_{50}$ : 40,7736<br>$K_i$ : 12,3405 $\pm$ 2,9974<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  | $IC_{50}$ : 18,2407<br>$K_i$ : 16,3150 $\pm$ 4,8685<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmasız |
| 5,7-Dihidroksiflavon    | $IC_{50}$ : 36,4814<br>$K_i$ : 13,9553 $\pm$ 2,7339<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  | $IC_{50}$ : 38,5082<br>$K_i$ : 20,3612 $\pm$ 3,0225<br><b>Inhibisyon Tipi:</b> Yarışmalı  |

Çalışmamızın son aşamasında ise LPO enzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Günümüzde peroksidazlar gibi ticari değere sahip enzimlerin kullanım sahalarının geniş olmasından dolayı bu enzimlerin saf olarak, yüksek verimde ve düşük maliyette elde edilmeleri oldukça önemlidir.

Laktoperoksidaz; bakterilerin büyümesinin baskılanmasında ve bakteri inhibisyonunun desteklenmesinde antibakteriyal hipotiyosiyanat oluşturması ile bilinen (Shah 2000) ve süt endüstrisinde, süt işleme tesislerinde nakil esnasında sütün muhafazası için kullanılan bir enzimdir (Uguz and Ozdemir 2005).

Laktoperoksidaz ile çalışan bilim insanları enzim üzerine farklı moleküllerin inhibisyonunu araştırmışlar ve saflaştırma için çok çeşitli kromatografik yöntemler denemişlerdir. Bu bağlamda tez kapsamında çalışılan flavon türevlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

**Çizelge 5.5.** LPO'nun aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren flavon türevlerinin  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri

| Flavon türevleri       | LPO ( $\mu$ M)                                                                  |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 3',4'-Dihidroksiflavon | $IC_{50}$ : 0,1498<br>$K_i$ : 0,3731 $\pm$ 0,0296<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 6-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 1,9636<br>$K_i$ : 0,9147 $\pm$ 0,2696<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 7-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 2,2652<br>$K_i$ : 1,4221 $\pm$ 0,2803<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 5-Hidroksiflavon       | $IC_{50}$ : 2,5297<br>$K_i$ : 1,2578 $\pm$ 0,0987<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 4'-5-Dihidroksiflavon  | $IC_{50}$ : 2,0568<br>$K_i$ : 1,0048 $\pm$ 0,3609<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |
| 5,7-Dihidroksiflavon   | $IC_{50}$ : 2,0815<br>$K_i$ : 0,9328 $\pm$ 0,1943<br>İnhibisyon Tipi: Yarışmalı |

Sonuç olarak;

1. Flavonların çalışılan konsantrasyonlarda (10-30  $\mu$ g/ml), artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak total antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamada, DPPH ve ABTS gidermelerinde artış gözlenmiştir.
2. Ferröz iyonlarını şelatlama aktivitesi, DMPD ve süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı pozitif bir korelasyon gözlenmiştir.
3. Antioksidan çalışmalarında standart olarak, BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks kullanıldı. Mukayeseler sonucunda kullanılan flavonların kullanılan standartların aynı konsantrasyonlarındaki aktivitelerine eş değer veya daha yüksek olduğu belirlendi.
4. Karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B L-tirozin afinite jeli kullanılarak eritrositlerden saflaştırıldı.

5. Son olarak elde edilen CA izoenzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda esterase aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%) - [I] grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.
6. LPO enzimi sığır sütünden saflaştırıldı. Daha sonra uygun inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%) - [I] grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.
7. Ticari olarak satın alınan AChE ve BChE enzimleri içinde aynı şekilde uygun inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%) - [I] grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.

## KAYNAKLAR

- Abuja, P.M., Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density-lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4091-4096.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbaba, Y., Akıncıoğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 35-42.
- Akıncıoğlu A., Kocaman E., Akıncıoğlu H., Salmas R.E., Durdağı S., Gülçin İ., Supuran C.T., Göksu S., 2017. The synthesis of novel sulfamides derived from b-benzylphenethylamines as acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 74, 238-250.
- Akıncıoğlu, A., Topal, M., Gülçin, İ., Göksu, S., 2013. Novel Sulphamides and Sulphonamides Incorporating the Tetralin Scaffold as Carbonic Anhydrase and Acetylcholine Esterase Inhibitors. *Archiv der Pharmazie* 2014, 347, 68–76.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. MIMOZA yayınları, Kuzucular Ofset, Konya, 1-60, s106-111.
- Altınışik, M., 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Aydın.
- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlerinin 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., Altun, M., 2005. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)- neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. *Free Radical Research*, 39, 949-961.
- Åqvist, J., Kazemi, M., Isaksen, V.G., Brandsdal, O.B., 2017. Entropy and Enzyme Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 50, 199-207.
- 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., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biology and Chemistry*, 214, 5137.
- Arosio, B., Gagliano N., Fusaro LMP., 2000. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acut liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology and Toxicology*, 87, 229-233.
- Arouma, O.I., Cuppett, S.L., 1997. Antioxidant methodology-*In vivo* and *in vitro* concepts. AOCS Press. USA, pp 141-172.

- Atkins CA., Patterson BD., Graham D., 1972. Plant carbonic anhydrases. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218-223.
- Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- Baki, S., 2016. Gıda Maddelerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Tayini için Yeni Bir Elektrokimyasal Yöntem Geliştirilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 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.
- Barbosa de Matos, R., Braga-de-Souza, S., Seara Pitanga, B.P., Amaral da Silva, V.D., Viana De Jesus, E.E., Pinheiro, A.M., Dias Costa, M.F., El-Bacha, R.S., 2014. Flavonoids modulate the proliferation of neosporea caninum in glial cell primary cultures. *The Korean Journal of Parasitology*, 52:6, 613-619.
- Basaga, H.S., 1990. Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 989-998.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D. and Vuotto, M.L., 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 240-248.
- Bates, C.J., 1995. Vitamin A. *Lancet*, 345, 31-35.
- Bazinet, L., Doyen, A., 2017. Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:4, 677-700.
- Bener, M., 2013. Besin Özütleri Ve Serumda Antioksidan Kapasite Ölçümü İçin Moleküler Spektroskopik Sensörler Geliştirilmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 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.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrelioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Bilge, M., 2010. Hemodiyaliz Hastalarında Serbest Radikallerin Organizmaya Ve Antioksidan Savunma Sistemleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Blekas, G., Boskou, D., 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and a-tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. *Grasas Aceites*, 49, 34-37.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.

- Boots, J.W., Floris, R., 2006. Lactoperoxidase: From catalytic mechanism to practical applications. *International Dairy Journal*, 16, 1272–1276.
- Bottcher, K., Waheed, A., Sly, W. S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the Crab Gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- Bramley, P.M., 2000. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 54, 233-236.
- Brooks, J. D., Ward, W. E., Lewis, J. E., Hilditch, J., Nickell, L., Wong, E., Thompson, L.U., 2004. Supplementation with flax seed alters estrogen metabolism in postmenopausal women to a greater extent than does supplementation with an equal amount of soy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 318-325.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2777.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44, 1482-1489.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, 44, 491-495.
- Cadenas, E., Packer, L., 1996. Handbook of antioxidants. Marcel and Dekker Inc, 23-25, New York.
- Canfield, L.M., Valenzuela, J.G., 1993. Cooxidations, significance to carotenoid action *in vivo*. *Annual New York Academic Science*, 691, 192-199.
- Carlo, G., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 4, 337-353.
- Carlson, P., 1992. Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya (Editör: Telefoncu, A.) Kırıkkaleli. 420.
- Carter, J. F., 1993. Potential of FS oil in baked goods and other products in human Nutrition. *Cereals Foods World*, 38, 753-759.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi, 1-174. In Ed. B. Cemeroğlu, meyve sebze teknolojisi. 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- Chan, K.M., Decker, E.A., 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 34, 403.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.

- Chiou, S.Y., Huang, C.F., Hwang, M.T., Lin, G., 2009. Comparison of Active Sites of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase Based on Inhibition by Geometric Isomers of Benzene-di-N-Substituted Carbamates. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 23, 5.
- Chodzaoglou, S., 2013. Otizm Spektrum Bozukluklarında Nöronal Nitrik Oksit Sentaz ve Superoksit Dismutaz Genlerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul.
- 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.
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Henichart, J.P., 1992. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 211-219.
- Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245-3059.
- Curan, R., Hildebrandt, L., Schoemer, S., 2002. Influence of flaxseed oil administration on glycemic response in active, healthy adults. *Topics in Clinical Nutrition*, 17, 28-35.
- Çakatay, U., Kayalı R., 2006. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.
- Çelik, H., Özgen, M., Serçe, S., Kaya, C., 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117, 345-348.
- Çınar İ., Çolakoğlu AS., 2004. Ön işlem ve depolama koşullarının portakal kabuğu karotenoidlerinin stabilitesi üzerine etkileri. *Gıda Teknolojisi Derneği, Türkiye 8. Gıda Kongresi, Bursa*.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., 2004, Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's Disease. the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 453-478.
- Davies, K., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, 61, 1-31.
- Dembele, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 1999. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 731-742.
- Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C., Almeida L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Diplock, A.T., 1997. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease. *Free Radical Research*, 27, 511-532.
- 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.

- Doumonted, C. and Rousset, B., 1983. Identification, purification and characterization of a non-home lactoperoxidase in bovine milk. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 14166.
- Drew, J., 2000. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287, 1960–1964.
- Dvir, A., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., Sussman, L.J., 2010. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 187, 10–22.
- Elmastas, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y., 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 258-266.
- Elmastas, M., Türkekul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148.
- Ergün, A., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ., Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan M.K., Küçükersan, S., Önel, A.G., Muğlalı, Ö.H., Şehu, A., 2002. Yemler, yem hijyeni ve teknolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık, 465, Ankara.
- Farell, J. M., Barber, M., Krause, D., Litovitz, T.A., 1997. Effects of low frequency electromagnetic fields on the activity of ornithine decarboxylase in developing chicken embryos. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43, 91-96.
- Fawole, O.A., Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Light, M.E., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2010. Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 235–241.
- Feldstein, J.B., Silverman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72: 55-63.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D'angelo, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 420-425.
- Flemmig, J., Gau, J., Schlorke, D., Arnhold, J., 2015. Lactoperoxidase as a potential drug target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20, 447-461.
- Flohe, R.B., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: Function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13, 1145-1155.
- 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.
- Frel, B., 1994. Natural antioxidants in human health and disease, Academic Press. Sandiego. pp 387-409.

- Fridovich, I., 1983. Superoxide radical:an endogenous toxicant. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 23, 239-257.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1523-1540.
- Galijasevic, S., Hodzic, E., 2014. Melatonin mediates classic lactoperoxidases catalytic mechanism. International Journal of Pharmacology, 4, 1-6.
- Gibson, G.E., Huang, H.M., 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 26, 575-578.
- Gil, M. I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., 1999. Effect Of Postharvest Storage And Processing On The Antioxidant Constituents (Flavonoids And Vitamin C) Of Fresh-Cut Spinach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2213-2217.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. Archiv der Pharmazie, 346, 783-792.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. International Journal of Academic Research, 5, 149-154.
- Göçer, H.,Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62, 821-825.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal antioksidanlar. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 23, 85-89.
- Göksu, S., Naderi, A., Akbaba, Y., Kalın, P., Akıncıoğlu, A., Gülçin, A., Durdagi, S., Salmas, R.E., 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel benzylsulfamides using molecular modeling and experimental studies. Bioorganic Chemistry, 56, 75-82.
- Gören, A. C., Bilsel, G., Bilsel, M., 2007. Rapid and simultaneous determination of 25-OH-vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in human serum by LC-MS/MS: Validation and uncertainty assesment. Journal of Chemical Metrology, 1, 1-10.
- Gören, A. C., Çıkırıkçı, S., Çergel, M., Bilsel, G., 2009. Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC-tandem mass spectromery. Food Chemistry, 113, 1239-1242.
- Gray, J.I., 1978., Measurment of lipit oxidation. Journal of the American Oil Chemists' Society, 55, 539-46.
- Gutierrez, F., Albi M.A., Palma R., Rios J.L., Olias J.M., 1989. Bitter taste of virgin olive oil; correlation of sensoryevaluation and instrumental HPLC analysis. Journal of Food Science, 54, 68-70.
- 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. Doktora tezi, 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., 2006. 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., 2009a. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. *Chemico-Biological Interaction*, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 287-293.
- Gülçin, İ., Beydemir, S. 2013. Fenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13, 408-30.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. *In vitro* antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, I.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) *Acta Alimentaria*, 34, 193-202.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2227-2238.
- Gülçin, İ., 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., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.İ., 2002. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 33, 167-171.
- Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, 685-695.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., Köksal, E., 2007c. A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6, 410-418.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., Topal, F., 2010. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25, 44-53.

- 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., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activities of an Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34, 175-188.
- 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., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004b. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205-215.
- 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., 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., 2004e. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), *Italian Journal of Food Sciences*, 16, 17-30.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel M., Erdoğan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, 76, 585-593.
- Gülçin, İ., Topal, F., Oztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel M., 2011. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 5, 158-175.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halliwell, B., 1989. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. *Acto Neurologica. Scandivanica*, 126, 23-33.
- Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. *Drug*, 42, 569-605.
- Halliwell, B., 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.
- Halliwell, B., 1996. Oxidative stres, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25, 57-74.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, p.543, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1996. Free radicals in biology and medicine, pp11-21.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed., Clarendon Press Oxford, pp.530-533.

- Han, J., Choi, H.Yeon, Dayem, A.Abdal, Kim, K., Yang, G., Won, J., Do, S.Hee, Kim, J.H., Jeong, K.S., Cho, S.G., 2016. Regulation of adipogenesis through differential modulation of ros and kinase signaling pathways by 3,4'-dihydroxyflavone treatment. *Journal of Cell Biochemistry*, 118, 1065-1077.
- Harborne, J.B., 1994. *The Flavonoids advances in research since 1986*. Chapman and Hall/CRC, p.638, USA.
- Hasler, CM., 2000. Plants as medicine: The role of phytochemicals in optimal health. In *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*, edited by F. Shahidi and C.T. Ho, pp.1-12. Champaign, Illinois: AOAC Press.
- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J.Ethnopharmacol.* 92, 147–162.
- Hossain, M.K., Choi, H., Hwang, J.-S., Dayem, A.A, Kim, J.-H., Kim, Y.B., Poo, H., Cho, S.-G., 2014. Antiviral activity of 3,4'-dihydroxyflavone on influenza A virus. *Journal of Microbiology*, 52, 521-6.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Imtaiyaz Hassan, M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W.S., 2013. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1570–1582.
- Jacob, B.M., Anthony, K.E., Sreekumar, B., Haridas, M., 2000. Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk. *Life Sciences Including Pharmacology Letter*, 66, 2433–2439.
- Jacop, R., 1996. Three eras of vitamin C discovery. *Subcell Biochemistry*, 25, 1-16.
- Jasril, L.Y., Mooi, A.M., Ali, M.A., Sukari, A.A., Rahman, A.G., Othman, H.k., 2003. Antioxidant and antitumor promoting activities of the flavonoids from *Hedychium thyriforme*. *Pharmaceutical Biology*, 41, 506-511.
- Jegannathan, R.K, Nielsen, H.P., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H.B., Bejar, S., 2016. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36, 246–258.
- Jittrepotch, N., Ushio, H., Ohshima, T., 2006. Effects of EDTA and a combined use of nitrite and ascorbate on lipid oxidation in cooked Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 99, 70-82.
- Joseph, P.V., Jacob, C. and Maridas, M., 2004. Purification of sheep lactoperoxidase from colostrum: Characterization and antifungal studies. *International Journal of Chemical Sciences*, 2, 120-125.
- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M., 2007. Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi.Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 17, 61-66.

- Kalın, P., Gülçin, İ., Gören, A.C., 2015. Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*). Records of Natural Products, 9, 496-502.
- Katiyar, S.K., Mukhtar, H., 1997. Tea Antioxidants in cancer chemoprevention. Journal of Cellular Biochemistry Supplement, 27, 59-67.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. Biyokimya, Aktif Yayınevi, 97-125, Erzurum.
- Kehre J.P., Smith JV., 1994. Free radicals in biology: Sources, reactivities and roles in etiology of human diseases; in Frei B(ed): natural antioxidants in human health and disease. San Diego, Academic Press, 25-62.
- Knight, J., 1998. Free radicals: their history and current status in aging and disease. Annals of Clinical and Laboratory Science, 28, 331-46.
- Kocak, R., Turan Akın, E., Kalın, P., Talaz, O., Saracoglu, N., Dastan, A., Gülçin, İ., Durdagi, S., 2016. Synthesis of Some Novel Norbornene-Fused Pyridazines as Potent Inhibitors of Carbonic Anhydrase and Acetylcholinesterase. Journal of Heterocyclic Chemistry, 53, 2049-2056.
- Köksal, E., Tohma, S.H., Kılıç, Ö., Alan, Y., Aras, A., Gulcin, İ., Bursal, E., (2017). Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica* - Analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. Scientia Pharmaceutica, 15, 85(2).
- Kozics, K., Valovicova Z., Slamenova D. 2011. Structure of flavonoids influences the degree inhibition of Benzo(a)pyrene - induced DNA damage and micronuclei in HepG2 cells. Neoplasma, 58, 516-24.
- Köksal E., 2007. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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 silymarine. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24, 395-405.
- Köksal, Z., Kalın, R., Gerni, S., Gülçin, İ., Özdemir, H., 2017a. The inhibition effects of some natural products on lactoperoxidase purified from bovine milk. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2017, 31(9), e21939..
- Köksal, Z., Kalın, R., Gülçin, İ., Özdemir, H., Atasever, A., 2016. Impact of Some Avermectins on Lactoperoxidase in Bovine Milk. International Journal of Food Properties, 19, 1207-1216, 2016.
- Köksal, Z., Kalın, R., Camadan, Y., Usanmaz, H., Almaz, Z., Gülçin, İ., Gokcen, T., Gören, A.C., Ozdemir, H., 2017b. Secondary sulfonamides as effective lactoperoxidase inhibitors. Molecules, 22, 793.
- Krungkrai, S.R., Suraveratun, N., Rochanakij, S. Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. International Journal of Parasitology, 31, 661-668.

- 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.
- Langbakk, B. and Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Langbakk, B. and Flatmark, T., 1989. Lactoperoxidase from human colostrum. *The Biochemical Journal*, 259, 627-631.
- Lawson, L.D., 1998. Garlic: A review of its medicinal effects and indicate active compounds. In *Phytomedicines of Europe, Chemistry and Biological Activity*, edited by L.D. Lawson and R. Bauer, pp.176-209. Washington, DC: American Chemical Society.
- Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C., Mancini, R.A., 2005. The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in *n*-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70, 683-689.
- Macdonald, I.R., Martin, E., Rosenberry, T.L., Darvesh, S., 2012. Probing the Peripheral Site of Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 51, 7046–7053.
- Mazza, G., and Oomah, B.D., 1998. Flaxseed products for disease prevention, *Functional Foods Biochemical and Processing Aspects*, Technomic Publishing, Lancaster, PA, 91-138.
- 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.
- Miller, D.D., 1996. *Mineral. Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, pp. 618-649.
- Min, D.B., 1998. Lipid oxidation of edible oil. In *Food Lipids chemistry, nutrition, and biotechnology*, Akoh, C.C., Min, D.B., (Eds), Marcel Dekker, New York, pp. 283-296.
- Molnár, P., Deli, J., Matus, Z., Tóth, G., Steck, A., Pfander, H., 2000. Isolation and characterization of mutatoxanthin-epimers from red paprika (*Capsicum annuum*). *European Food Research Technology*, 211, 396-399.
- Monson, R.B., Rahemtulla F, Baldone D.C, Pruitt, K.M. Hjerpe, A., 1988. Purification and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry*, 27, 233-239.
- Moreau, N., Dufraisse C., 1922. *Comptes Rendus des Seances et Memoires de la Societe de Biologie*, 86, 321-326.
- 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.
- Mukai, K., Kanesaki, Y., Egawa, Y., Nagaoka S.I., 2000. Free radical-scavenging action of catechin and related compounds in homogeneous and micellar solutions. In *phytochemicals and phytopharmaceuticals*, edited by F. Shahidi and C.-T. Ho, pp. 222-238. Champaign, Illinois: AOAC Press.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W., 1996. *Fizyolojik öneme sahip lipidler*. N. Dikmen, T. Özgünen. Harper'ın Biyokimyası, 24. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Nachmansohn, D., 1952. In *Modern Trends in Physiology, Biochemistry*. Academic Press, New York. 229.

- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75, 237-240.
- Neto, C.C., 2007. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of in vitro anticancer studies. *The Journal of Nutrition*, 137, 1865-1935.
- Nizamlioğlu, N.M., Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 20-35.
- 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.
- Ozdemir, H. and Uguz, M. T., 2005. In vitro effects of some anaesthetic drugs on lactoperoxidase enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 491-495.
- Ozdemir, H., Aygul, I. and Kufrevioglu, O. I., 2001. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31, 125-134.
- Ozdemir, H., Hacibeyoglu, H. I., Uslu, H., 2002. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32, 143-155.
- 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.
- Öztaşkın, N., Taslimi, P., Maras, A., Gülçin, I., Göksu S., 2017. Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. *Bioorganic Chemistry*, 74, 104-114.
- 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., Hiramatsu, M., Toshikawa, T., 1999. Antioxidant Food Supplements in Human Health, San Diego: Academic Press, 255-268.
- Pan, G., Dutta, H.M., 1998. The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 133-137.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologiae Technologia*, 40, 97-106.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Pilátová, M., Stupáková, V., Varinská, L., 2010. Effect of selected flavones on cancer and endothelial cells. *General Physiology and Biophysics*, 29, 134-143.
- Pohanka, M., 2014. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 9809-9825.
- Polat Köse L., Gülçin İ., 2017. Inhibition Effects of some lignans on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Records of Natural Products*, 11, 558-561.
- 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.

- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Prior, R.L., Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Horticulture Science*, 35, 588-592.
- Rauha, J.P., Tammela, P., Summanen, J., Vuorela, P., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Kujala, T., Pihlaja, K., Törnquist, K., Vuorela, H., 1999. Action of some plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds on calcium fluxes in clonal rat pituitary GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 9, 66-69.
- Raves, M.L., Giles, K., Schrag, J.D., Schmid, M.F., Phillips, G.N., Chiu J.W., Howard, A.J., Silman, I., Sussman, J.L., 1998. Quaternary structure of tetrameric Acetylcholinesterase. *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, 351-35.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bioology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*; 20, 933-956.
- Rio, DD., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*, 15, 316-328.
- Saarenen, N.; Joshi, S. C.; Ahotupa, M.; Li Xiangdong; Ammala, J.; Makela, S.; Santti, R. 2001. No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78, 231-239.
- Saija, A., 1995. Flavonoids as antioxidant agents. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 481-486.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., 1998. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics*, 175, 85-94.
- Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492.
- Saleh, 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.
- Santos B.L. Oliveira M.N. Coelho P.L.C. Pitanga B.P.S. da Silva A.B. Adelita T. Silva V.D. Costa Mde F. El-Bachá R.S. Tardy M., 2015. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression *Chemico Biological Interactions*, 242, 123-138.
- Sarıca, S., 2003. Omega-3 Yağ Asitlerinin insan sağlığı üzerine etkileri ve tavuk etinin omega-3 yağ asitlerince zenginleştirilmesi. *Hayvansal Üretim*, 44, 1-9.
- Schulz, V., 2003. Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trial and guidelines fail to consider. *Phytomedicine* 10, 74-79.

- Scozzafava, A., Kalın, P., Supuran, C.T., Gülçin, İ., Alwasel, H.A., 2015. The impact of hydroquinone on acetylcholine esterase and certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 941–946.
- Sehitoglu, M.H., Han, H., Kalin, P., Gülçin, İ., Özkan, A., Aboul-Enein, H.Y., 2015. Pistachio (*Pistacia vera* L.) gum: a potent inhibitor of reactive oxygen species. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 264–269.
- Seifu, E., Elna, M.B., Donkin, E.F., 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its Potential applications: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 137–154.
- Seifu, E., Elna, M.B., Donkin, E.F., 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its Potential applications: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 137–154.
- Serafini, M., Del Rio, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report*, 9, 145–152.
- Serraino, M., Thompson L.U., 1992. Flaxseed Supplementation and Early Markers of Colon Carcinogenesis. *Cancer Letters*, 63, 159–165.
- Sethi, K.K., Vullo, D., Verma, S.M., Tanç, M., Carta, F., Supuran C.T., 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, IX and XII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrabromophthalimide moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 5973–5982.
- Shah, N.P., 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3–10.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Food phenolics sources chemistry effects applications. Technomic Publication, p 235–277, USA.
- Shimazaki, K., Nishio, M., Kawano, N., 1988. Separation of biologically active proteins from whey. *Rakuno Kagaku, Shokuhin no Kenkyu*, 37, 45–51.
- Shin, K., Hayasawa, H., and Lonnerdal, B., 2001. Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immuno adsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 984–989.
- Shindler, J.S., Bardsley, W.G., 1975. Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67, 1307.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291–295.
- 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.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

- Sjöblom, B., Polentarutti, M., Djinovi-Carugo, K., 2009. Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 10609-10613.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simoncic, M., Knez, Z., 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Smirnoff, N., 2001. L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitamin and Hormon*, 61, 241-66.
- Sorin, E.J., Alvarado, W., Cao, S., Radcliffe, A., La, P., An, Y., 2017. Ensemble molecular dynamics of a protein-ligand complex: residual inhibitor entropy enhances drug potency in butyrylcholinesterase. *Bioenergetics*, 6:1.
- Southorn, P.A., 1988. Free radicals in medicine. 1. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, 53, 381-389.
- Stadtman, E., 1992. Protein oxidation and aging. *Sciences*, 257, 1220-1224.
- Stahl, W., Sies, H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species. *Research Monographs*, 1-2.
- Stamler JS., Singel, DJ., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898-1902.
- Steven, S., 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 57, 737-769.
- Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J.P., Tammela, P., Marjamäki, K., Pasternack, M., Törnquist, K., Vuorela, H., 2001. Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in rat pituitary GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> cells. *European Journal of Pharmacology*, 414, 125-133.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Clare, B.W., 2002. Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 22, 329–372.
- Şanlı, Y. 1988. Veteriner Farmakoloji Kemoterapotik İlaçlar, Veteriner Fakültesi Yayınları, 658- 696p.
- Şehitoğlu, M.H., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I VE hCA-II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan A., Küfrevioğlu, Öİ. Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 3207-3211.
- 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.
- Tang L., Ye L., Singh R., Wu B., Lv C., Zhao J, Liu Z., Hu M., 2010. Use of glucuronidation fingerprinting to describe and predict mono- and dihydroxyflavone metabolism by recombinant UGT isoforms and human intestinal and liver microsomes. *Molecular Pharmaceutics*, 7, 664–679.
- Taslimi P., Akıncioğlu H., Gülçin İ., 2017. Synephrine and phenylephrine act as  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glycosidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonicanhydrase enzymes inhibitors. 31(11), e21973.
- Tee, E.S., 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31, 103-163.

- Thomas, M.J., 1995. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35, 21-39.
- Thompson, L.U., Li, T., Chen, J., Goss, P.E., 2000. Biological of dietary flaxseed in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 64, 50.
- Tobin, A. J., 1970. Carbonic anhydrase from parsley leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2656-2666.
- Tohma, H., Köksal, E., Kılıç, Ö., Alan, Y., Yılmaz, M.A., Gülçin, İ., Bursal, E., Alwasel, S.H. (2016). RP-HPLC/MS/MS analysis of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia L. species*. *Antioxidants*, 5, 38.
- Topal, F., Nar, M., Göçer, H., Kalın P., Koçyiğit, U.M., Gülçin, İ., 2016a. Antioxidant activity of taxifolin: an activity–structure relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 674-683.
- Topal, M., Göçer, H., Topal, F., Kalin, P., Polat Köse, L., Gülçin, İ., C.Çakmak, K., Küçük, M., Durmaz, L., Gören, A.C., Alwasel, S.H., 2016b. Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31,266-275.
- Treesuwan, W., Suramitr, S., Hannongbua, S., 2015. Elucidation of hydroxyl groups-antioxidant relationship in mono- and dihydroxyflavones based on O-H bond dissociation enthalpies. *Journal of Molecular Modeling*, 21,137.
- Tüzün, C., 1996. *Organik Kimya*, Ankara: Palme Yayıncılık, 597-598.
- Uguz, M. T., Ozdemir, H., 2005. Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial properties at different thiocyanate mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 397–401.
- Ünal, G., Gürkan, 2004 M.O. 2001. *İnsektisitler Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri*, Ethemoglu Ofset Matbacılık, 3- 24p.Öncüer,
- Vallance, P., Collier, J., 1994. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *British Medical Journal*, 13, 453-462.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I., DeWitt, D.L., 1999. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62, 294-296.
- Welk, A., Rudolph, P., Kreth, J., Schwahn, Ch., Kramer, A., Below, H., 2011. Microbicidal efficacy of thiocyanate hydrogen peroxide after adding lactoperoxidase under saliva loading in the quantitative suspension test. *Archives of Oral Biology*, 56, 1576 –1582.
- 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.
- Wilkenson, P., Leach, C., Ah-Sing E.E., Hussain, N., Miller G.J., Millward D.J., Griffin, B.A., 2005. Influence of linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis*. 181, 115-124.
- Wilson, I., B., Nachmansohn, D., 1954. In *Ion Transport Across Membranes*. Academic Press Inc., New York. 35s.

- Wood, R.J., Ronnenberg, A.G., 2006. In: Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J., (eds) Modern nutrition in health and disease, 10th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 248.
- Xia, W., Thomas, W., 2006. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 1786-1792.
- Xiao, L., Li, C., Xin, S. 2007. Isolation and purification of lactoperoxidase in bovine milk. *Zhongguo Rupin Gongye*, 35, 23-25.
- Xiong, X., Li, J., Wang, L., Zhong, J., Zi, X., Wang, Y. 2014. Low oxygen tension and relative defined culture medium with 3,4-dihydroxyflavone are beneficial for yak-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryo. *Reproduction in Domestic Animals* 49, 126-133.
- Yalçın, G., 2012. İğde (*Elaeagnus angustifolia* l.) bitkisinden çeşitli kısımlarının kimyasal bileşenlerinin farklı yöntemler kullanılarak antioksidan kapasitesinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yanbeyi, S., 1999. Aspirin ve antioksidant buthlylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismütaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Doktora Tezi, Samsun.
- 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.
- Yildirim, 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.
- Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 64-69.
- 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.
- Zor, M., 2007. Depolamanın ayva reçelinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Giresun’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Giresun’da tamamladı. 2005’te kazandığı Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği’nden 2010 yılında mezun oldu. 2011-2012 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2013-2014 Eğitim Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. 2013 yılında Arş. Gör. Ramazan KALIN ile evlendi ve bir erkek evlat annesidir.