



**BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, ASETİLKOLİNESTERAZ
VE KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Beratiye İNANÇAKIR

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK**

**2015
Her hakkı saklıdır**

AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDANKAPASİTELERİNİN
BELİRLENMESİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

BERATİYE İNAN ÇAKIR

KİMYA ANABİLİM DALI

AĞRI

2015

Her hakkı saklıdır

AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ,ASETİLKOLİNESTERAZ II ENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ”** adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder,tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

- Tezimin tamamı her yerde erişime açılabilir.
- Tezim sadece Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

X Tezimin 2 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerde erişime açılabilir.

03/09/2015

BERATİYE İNAN ÇAKIR



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç. Dr. Murat ŞENÜRK danışmanlığında, Beratiye İNAN ÇAKIR tarafından hazırlanan bu çalışma, 03/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından KİMYA Anabilim Dalı BİYOKİMYA Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği (3/3) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Murat ŞENÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat GÜNEY

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İmdat AYGÜL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve ... / ... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ocak AKDEMİR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK (KBAG-1002) projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 114Z731

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

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü 04100 Ağrı Telefon: +90 (472) 215 50 82

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI FLAVONOİDLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Beratiye İNAN ÇAKIR

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Mevcut çalışmada morin ve rutin gibi bazı flavonoidlerin muhtemel antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri değerlendirildi. Sığır karaciğer karbonik anhidraz II izoenziminin saflaştırılması için daha önceki araştırmacıların sentezlediklerinden farklı bir afinite jeli hazırlandı. Matriks olarak Selüloz; uzantı kolu olarak benzoilklorür ve ligand olarak sülfanilamid kullanıldı. Ayrıca bu flavonoidlerin asetilkolinesteraz ve sığır karaciğer karbonik anhidraz II üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Flavonoidlerin radikal giderme aktivitelerini değerlendirmek için hidrojen peroksit giderme aktivitesi çalışıldı. Ayrıca flavonoid yapısına sahip olan kuarsetin referans antioksidan olarak kullanıldı. Kullanılan flavonoidler kuvvetli antioksidan aktivitesi sergilediler.

2015, 79sayfa

Anahtar kelimeler: Afinite jeli, antioksidan aktivite, karbonik anhidraz, flavonoid, enzim inhibitör

ABSTRACT

MS. Thesis

DETERMINATION OF SOME FLAVONOIDS' ANTIOXIDANT CAPACITY AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS ON ACETYLCHOLINESTERASE AND CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES

Beratiye İNAN ÇAKIR

Ağrı İbrahim Çeçen University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

In the present study, some flavonoids such as morin and rutin were evaluated for possible antioxidant and radical scavenging activity. It is aimed in this study to design new affinity gel for bovine liver carbonic anhydrase II different from which have been used so far. Cellulose has been used as matrix, benzoyl chloride as spacer arm and sulfonamide as ligand. Also the inhibitory effects of these flavonoids on acetylcholinesterase and cattle liver carbonic anhydrase isoenzyme II were investigated. In order to evaluate radical scavenging activity of flavonoids, hydrogen peroxide activity is studied. Also quercetin is used as reference antioxidant since its flavonoid structure. The flavonoids which are used in this study exposed high antioxidant activity.

2015, 79 pages

Keywords: Affinity gel, antioxidant activity, carbonic anhydrase, flavonoids, enzyme inhibitor

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Murat Şentürk'e, laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı yüksek lisans öğrencisi Habib Çelik'e, yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösterip bana katlandıkları için eşim Zeynel Abidin'e ve kayınvalidem Seyran Çakır'a, düzenli çalışmama izin verdikleri için oğlum Bekir Turab ve kızım Zeyneb Betül'e, çalışmam sırasında yardımcı geçen herkese teşekkürlerimi borç bilirim

BERATİYE İNAN ÇAKIR

Ekim 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Flavonoidler	1
1.1.1. Flavonoidlerin yapı özellikleri ve sınıflandırılması	1
1.1.2. Flavonoid sınıfları	4
1.1.2.1. Flavonlar	4
1.1.2.2. Flavonoller	5
1.1.2.3. Flavanonlar	7
1.1.3. Flavonoidlerin tıbbi ve biyolojik özellikleri	9
1.1.3.1. Flavonoidlerin antioksidan etkileri	10
1.1.3.2. Flavonoidlerin antikarsinojenik etkileri	12
1.2. Asetilkolinesteraz	12
1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması	13
1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu	15
1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri	16
1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları	17
1.3. Antioksidanlar	19
1.3.1. Antioksidanların sağlık açısından önemi	20
1.3.2. Antioksidanların etki mekanizmaları	21
1.3.3. Antioksidanların sınıflandırılması	23
1.3.3.1. Doğal antioksidanlar	24
1.4. Karbonik Anhidraz	25
1.4.1. Fizyolojik fonksiyonları	25
1.4.2. Karbonik anhidraz izoenzimleri	27
1.4.3. Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları	30
1.4.3.1. α -Karbonik anhidrazlar	32
1.4.3.2. β -Karbonik anhidrazlar	33
1.4.3.3. γ -Karbonik anhidrazlar	33

1.4.4. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	34
1.4.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması	35
1.4.6. Karbonik anhidrazın önemli inhibitörleri	38
2. KAYNAK ÖZETLERİ	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	44
3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar	44
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	45
3.1.3.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler	45
3.2. Antioksidan Çalışmaları.....	45
3.2.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi	45
3.2.2. Afinite kolonunun paketlenmesi	47
3.2.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	47
3.3. CA Enzim aktivitesi tayini	47
3.3.1. Hidrataz aktivitesi	47
3.3.2. Esteraz aktivitesi	48
3.4. Protein Tayini.....	50
3.4.1. Kalitatif protein tayini	50
3.4.2. Kantitatif protein tayini	50
3.5. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar	51
3.5.1. Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	51
3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	51
3.7. bCA II Enzim Aktivitesi Üzerine Fenolik Asitlerin Etkilerinin Belirlenmesi	51
3.8. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları	54
4.1.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi bulguları	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
E:C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
HCA-I	: İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA-II	: İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
LOO•	: Lipit peroksit radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
PG	: Propil galat
S	: Substrat
V	: Enzimatik reaksiyon hızı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCA	: Triklorasetik asit
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
Troloks	: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Flavan ve Flavonların Çekirdek İskeleti.....	5
Şekil 1. 2. Quercetin'in Yapısı.....	7
Şekil 1. 3. Naringenin'in Yapısı	8
Şekil 1. 4. Kafeik Asit'in Yapısı.....	9
Şekil 1. 5. Asetilkolinesterazın Üç Boyutlu Yapısı	13
Şekil 1. 6. Asetilkolinin Yapısı	14
Şekil 1. 7. Asetilkolinesterazın Kataliz Reaksiyonu	14
Şekil 1. 8. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu	16
Şekil 1. 9. Asetilkolinesteraz İnhibisyon Mekanizması	18
Şekil 1. 10. Antioksidan Maddelerin Etki Mekanizması	21
Şekil 1.11. BHA'nın Etki Mekanizması	22
Şekil 1.12. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	24
Şekil 1.13. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değişirici.....	276
Şekil 1.14. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri	28
Şekil 1. 15. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119).....	31
Şekil 1.16. CA Enziminin CO ₂ ⁻ Hidratasyon Reaksiyonunu Kataliz Mekanizmasının Şematik Gösterilişi	36
Şekil 1.17. CAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligantı (His94, His 96, His119) görülmektedir. Anyon değiş-tokuşunun karboksiterminal kısmında gerçekleşmektedir	37
Şekil 1.18. CA-II ile İnhibitörler Arasındaki Komplekslerin Yapılarının Şematik Çizimleri (A° İnhibe olmayan enzim B Bisülfür)	39
Şekil 1.19. Bazı Sülfanamidlerin Açık Formülleri	411
Şekil 3.1. Benzilselüloz-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	46

Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	49
Şekil 3.3. Ellman Reaktifi ile Asetiltiyokolinden AChE Enzimi Varlığında Tiyokolin Oluşum Reaksiyonu	53
Şekil 4.1. Flavonoidlerin 10 µg/ml konsantrasyonunda H ₂ O ₂ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan kuersetin ile karşılaştırması.	54
Şekil 4. 2. Morin için % aktivite-[I] grafiği	56
Şekil 4. 3. Rutin için % aktivite-[I] grafiği	57
Şekil 4. 4. bCA II enzimi için Aktivite-[S] grafiği.	58
Şekil 4. 5. eeAChE enzimi için morinin K _i grafiği.....	59
Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ²⁺ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Flavonoidlerin hetero halkadaki $-C3-$ yapısına göre sınıflandırılması	3
Çizelge 1.2. Doğal Hidroksiflavonoller	6
Çizelge 1.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (Lindskog 1997)	30
Çizelge 1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyon Türleri	35
Çizelge 4.1. Flavonoidlerin hidrojen peroksit giderme aktivitelerinin IC_{50} değerlerinin bir standart antioksidan olan kuersetin ile karşılaştırması	55
Çizelge 4. 2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri	55

1. GİRİŞ

1.1. Flavonoidler

Flavonoidler bitki kaynaklı bileşikler olup doğada yaygın olarak bulunurlar. 1936 yılında limon kabuğundatesbit edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliğini ve kırılgenliğini azaltmada kullanılması, flavonoidlere verilen önemi artırmıştır. Bu nedenle 1940'lı yıllardan sonra flavonoidlere karşı ilgi artmaya başlamıştır. 1970'lerde flavonoidlerle ilgili daha kapsanlı araştırmalar yapılmıştır. Günümüzde bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır(Bilaloğlu and Harmandar 2002). Birkilerde flavonoid bileşikler antioksidan aktivite, enzim inhibitörü ve ayrıca zararlı ışınlardan koruma gibi bir dizi özelliklere sahiptir(Harborne and Mabry 1982).

Son yirmi yılda, geleneksel tıpta flavonoid bileşiklere karşı ilgi artmış ve yapılan araştırmalar sonucu, flavonoid bileşiklerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteler gösterdiği saptanmıştır. Örneğin, flavonoid bileşiklerin antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antimutajenik, antiülserojen, antiviral, hepatoprotektif ve hipolidemik etkiye sahip oldukları açıklanmıştır. Quercetin ve kaempferolun *in vitro* ve *in vivo* denemelerde antimutajenik ve antikarsinojenik etkiler gösterdikleride gözlemlenmiştir(Bors and Saran 1987).

1.1.1. Flavonoidlerin yapı özellikleri ve sınıflandırılması

Bitkilerin sekonder metabolitleri olan flavonoid bileşikler önemli bir sınıfı teşkil eder. Flavonoid bileşiklerin karbon iskeletleri, iki fenil grubunun propan zinciri ile bağlanması sonucu oluşur. Bu bileşikler 15 karbon atomundan meydana gelir ve difenilpropan ($C_6 - C_3 - C_6$) yapısındadır. Flavonoid bileşikler fenil gruplarının

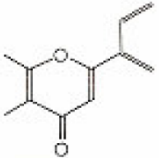
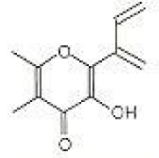
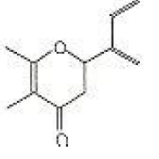
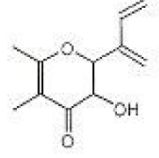
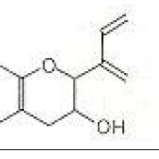
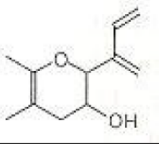
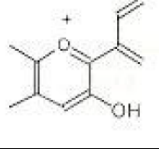
propan zincirine değişik pozisyonlarda bağlanması sonucunda farklıalt sınıflara meydana gelir.

Sistematik bir sınıflandırma yapılırken flavan ve flavon bileşiklerin yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarının yapısında (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırma yapılır. B halkasında olan atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır.

Propan zincirine fenil gruplarının 1,2- pozisyonlarından eklemlenmesi ile 1,2-difenilpropan yapısı oluşur. Bu yapıda propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C-3) oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile halkalaşmasıyla oluşan hetero halka içeren üç halkalı yapıya izoflavan denir.

Difenilpropan yapısı içeren doğal maddeler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoidler olmak üzere, üç ana gruba ayrılırlar. Bu grupların her biri de kendi içlerinde çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoid yapılarında C₃- sisteminin oluşturduğu heteroatom içeren halka, değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilirler. Hetero halkanın yükseltgenme derecesi flavonoidlerin alt sınıflarını belirleyen bir göstergedir. C₃- sisteminin yükseltgenme derecesine bağlı olarak, bilinen flavonoid sınıfları ve bitkilerde yaygın olan örnekleri Çizelge1.1.'de verilmiştir (Bilaloğlu and Harmandar 2002).

Çizelge 1. 1. Flavonoidlerin hetero halkadaki /- C₃ -/ yapısına göre sınıflandırılması

Flavonoid sınıfları	/ - C ₃ - / Yapısı	Örnekler	A ve B halka hidroksillerinin pozisyonları
FLAVONLAR		Apigenin Luteolin	5,7,4' 5,7,3',4'
FLAVONOLLER		Quercetin Myricetin	5,7,3' 5,7,3',4'
FLAVONONLAR		Naringenin	5,7,4'
FLAVANONOLLER		Fussin	7,3',4'
FLAVAN-3-OLLER (Katekinler)		Katekin	5,7,3',4'
FLAVAN-3,4-DİOLLER		Leucocyanidin	5,7,3',4'
ANTOSİYANİDİNLER		Cyanidin	5,7,3',4',5'

1.1.2. Flavonoid sınıfları

Tüm monomerik flavonoidler iki aromatik halkanın üç karbon atomlu zincir $-C_3-$ üzerinden birleşmesiyle oluşan C15 iskeleti içerirler. Difenilpropan yapısındaki propan zincirinin çeşitli yollarla değişikliğe uğramasından farklı flavonoid sınıfları ve alt sınıfları oluşur.

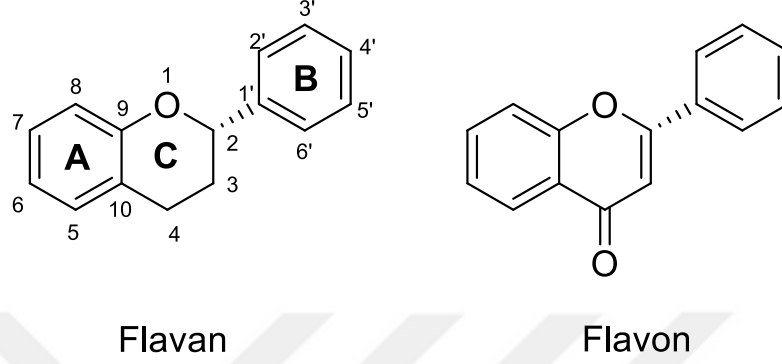
Üç karbonlu zincirin oksijen üzerinden aril halkası ile siklikleşmesinden trisiklik sistem oluşur. Altı üyeli heterosiklik halkanın oluşmasıyla flavonoid ve izoflavonoidler, beş üyeli halkanın oluşmasıyla ise auronoidler meydana gelir. İzoflavonoid iskeletinin oksijen üzerinden yeniden siklikleşmesi, tetrasiklik bir sistem olan pterokarpanoidleri oluşturur. Böyle trisiklik veya tetrasiklik sisteme sahip olmayan, aromatik halkalar arasında asiklik sistem içeren ise kalkonoidler denir (Bilaloğlu and Harmandar 2002).

1.1.2.1. Flavonlar

Flavonlar, flavonoidlerin bitkilerde yaygın olarak bulunan bir sınıfıdır. Flavonların çekirdek iskeleti şekil 9 da verilmiştir. Bu bileşiklerin hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dehidro türevleridir. Bitkilerdeki bulunma şekli hem glikozitleri, hem de serbest (aglikon) halindedir. Günümüzde bitkilerden 300'ün üstünde flavon aglikon izole edilmiştir.

Flavon bileşiklerinin en basit üyeleri, halkalarında metoksil ve/veya hidroksil grupları bulundurantürevleridir. Yapılarında sadece oksijen fonksiyonu ($-OH$ ve/veya $-OCH_3$ grupları) içermelerinedeni ile bu tür maddelere oksijenli veya O-substitue flavonlar da denir. Flavonların O-substitue türevleri doğada yaygındır. Flavonlar

yapılarında bulunan, O- substituentlerin (hidroksi ve/veya metoksil gruplarının) sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler(Bilaloğlu and Harmandar 2002).



Şekil 1. 1. Flavan ve flavonların çekirdek iskeleti.

1.1.2.2. Flavonoller

Flavonoller, C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfıdır. Bunlar C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzo-Y- piran çekirdeği içerirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Bitkilerde flavonol bileşikler, flavonoidlerin yapı çeşitliliği en fazla olan ve en çok bulunan sınıfıdır. Flavonoller, kristalimsi veya amorf nitelikli olup, flavonlara benzer şekilde açık sarı veya sarı renklidirler. Bu bileşikler genellikle flavonlara kıyasla oksijenli ortamda daha dayanıksızdırlar.

Flavonolun farklı pozisyonlarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleri bitki aleminde daha yaygındır. Günümüze kadar bitkilerden 400'ün üstünde flavonol aglikon izole edilmiştir.

Flavonol bileşiklerde, flavonlar gibi, yapılarında bulunan -OH ve/veya -OCH₃ gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. Flavonol çekirdeğinde hidroksil grubu bulunduğundan, böyle bir sınıflandırmada, C-3 pozisyonundaki

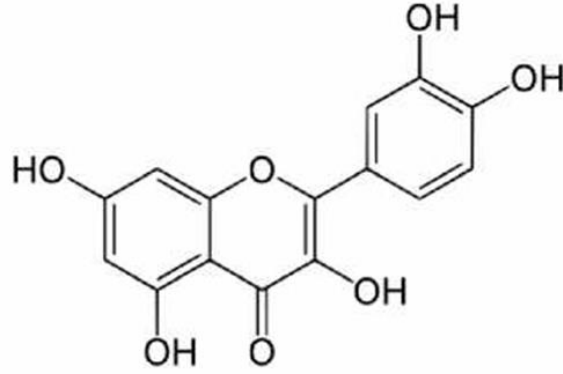
hidroksil grubu dikkate alınmaz. Bitkilerden elde edilen ve farklı pozisyonlarda hidroksil taşıyan flavonollerden bazıları Çizelge1.2.' de verilmiştir (Broussalis *et al* 1998;Marco *et al* 1990).

Çizelge 1.2. Doğal Hidroksiflavonoller

Adları	Hidroksil gruplarının pozisyonları									Elde edilme kaynakları
	C-5	C-6	C-7	C-8	C'-2	C'-3	C'-4	C'-5	C'-6	
5,7-diOH flavonol (Galangin)	OH	-	OH	-	-	-	-	-	-	<i>Achyrocline flaccida</i>
5,6,7,3',4'-pentaOH flavonol (Quercegetin)	OH	OH	OH	-	-	OH	OH	-	-	<i>Eriocaulon L.</i>
5,7,3',4',5'-pentaOH flavonol (Myricetin)	OH	-	OH	-	-	OH	OH	OH	-	<i>Hamamelidaceae</i>

Flavonoller kendi aralarında Mono- O-substitue flavonoller, Di- O-substitue flavonoller,Tri- O-substitue flavonoller, Tetra- O- substitue flavonoller, Penta- O-substitue flavonoller olmak üzere alt gruplarına ayrılırlar.

Tetrahidroksiflavanollerin doğada en fazla yaygın olan üyelerinden biri de quercetindir. (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavonol). Quercetin farklı pozisyonlarda mono- ve dimetoksi türleri genellikle Asteraceae familyasının türlerinde yaygındır (Bilaloğlu and Harmandar 2002).



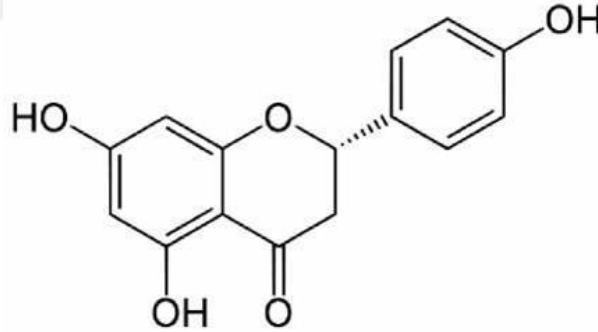
Şekil 1. 2. Quercetin'in yapısı.

1.1.2.3. Flavanonlar

Flavanonların çekirdek iskeletini dayanıksız dihidro-Y-piron halkası teşekkül eder. Bu sebeple flavanonlar asitler veya bazların etkileri ile kolaylıkla ayrışarak uygunhalkon yapılarını oluşturur. Flavanon yapısında bir asimetrik karbon atomu (C-2) bulunur. Flavanonlar genellikle halkonlarla birlikte bulunurlar ve çoğunlukla glikozillenmiş türevleri hainde rastlanırlar. Bu güne kadar 50'den fazla flavanon bitkilerden izole edilerek teşhis edilmiştir(Bilaloğlu and Harmandar 2002).

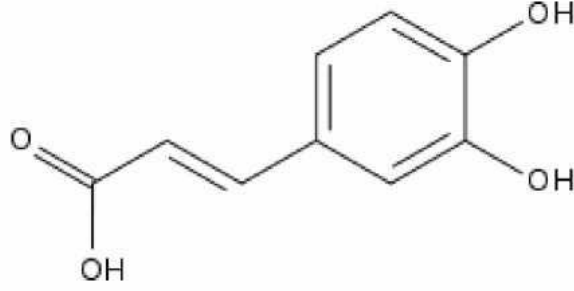
Flavanonların farklı pozisyonlarda oksijenlenmiş türevleri bitkilerden izole edilmiştir. Flavanonların basit üyeleri, aromatik halkaları farklı pozisyonlarda oksijenlenmiş (hidroksillenmiş ve/veya metoksillenmiş) bileşiklerdir. Oksijenlenmiş flavanonların en basit yapılı türevi, A halkası monohidroksi grubu içeren, 7-hidroksiflavanon *Ceratiolaericoides* türünden izole edilmiştir(Tanrisever *et al* 1987). Dihidroksiflavanonlardan 5,7- dihidroksiflavanon (pinocembirin) *Populus nigra*(Egger and Tissut 1968) ve 7,4'-dihidroksiflavanonona (liquiritigenin), *G.Uralensis* (Wang *et al* 1991), *Pterocarpus macrocarpus* (Verma *et al* 1986) ve başka bitki türlerinde rastlanır. *Bauhinia manca* bitkisinden liquiritigenin ile birlikte, 7-ve 4'-metil eterleri de izole edilmiştir(Achenbach *et al* 1988).

5,7,4'-Trihidroksiflavanon (naringenin) flavanonların çok yaygın olan üyelerindendir. Bu bileşik Asteraceae familyasının *Artemisia campestris*(Pascual *et al* 1986), *Grossheimia macrophylla*, , *Madia sativa* (Merikli *et al*1986), *Viguiera* türlerinden (Bohm *et al* 1992); Fabaceae familyasının *Glycyrrhiza glabra*(Achenbach *et al* 1988), *Pterocarpus marsupium*(Batirov *et al* 1987), *Vigna angularis*(Tripathi and Joshi 1988); Rosaceae familyasının *Cerasus tianschanika*(Abe *et al* 1987),*Rrunus cerasoides*(Sapko *et al* 1988), *P. Persica*(Bahaguna and Jangwan 1987); Rutaceae familyasının *Citrus callus cultures*(Chandra and Sastry 1988) ve başka familyalara ait türlerden de izole edilmiştir. Naringenin mono- ve dimetoksilenmiş türevleri bitki aleminde yaygındır. 7,4'-dihidroksi-5-metoksiflavanon Asteraceae familyasının *Achyroline alata*, *A.flaccida*(Barthe *et al* 1987), 5,4'dihidroksi-7-metoksiflavanon *Cistus incanus*, *C. laurifolius* (Cistaceae)(Broussalis *et al* 1988), *Encelia canescens*, *E. lasiniata*, türlerinden elde edilmiştir.



Şekil 1. 3. Naringenin'in yapısı.

Caffeic acid doğada çeşitli bitkilerde bulunan yapısal olarak sinnamik asite benzeyen fakat sinnamik asitten farklı olarak iki hidroksil grubu bulunduran, karsinojenik bir inhibitör olan fenolik bir bileşiktir. Kuvvetli bir antioksidandır ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir.



Şekil 1. 4. Kafeik asit'in yapısı.

1.1.3. Flavonoidlerin tıbbi ve biyolojik özellikleri

Bazı flavonoidlerin biyolojik aktivite göstermesinden dolayı, flavonoidlere karşı ilgi 1940'lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Bu ilginin başlıca nedenlerinden biri, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P-vitamin aktivitesi göstermesi olmuştur.

Flavonoidlerle yapılan ilk biyolojik aktivitelerde kılcal damar duvarlarına olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir(Ruzsnyak and Szent 1936). Bu maddelerin kılcal damara pozitif etkisi, genellikle kan sızdırmanın engellenmesinde, geçirgenliğin ve kırılabilirliğin ortadan kalkması yönünde etki göstermiştir(Jeney and Uri 1954).

Flavonoid maddelerin kan oluşturan bileşenler üzerindeki etkisi de açıklanmıştır. Örneğin; *Hedusarum L.* Bitkisinin total flavonodilerinin eritropoezi teşvik ettiği ve kanda lökositlerin miktarının arttırdığı belirtilmiştir(Ruş and Kulikov 1971). 3-Metilflavonoidlerin kanın formülü elementlerine (bu elementler kan hücrelerinin sedimentasyonunu ve agregasyonunu engellerler) etki gösterdikleri de belirlenmiştir(Robbins 1973).

Flavonoidler damarlara etkileri ile beraber, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddelerdirler. Başka bir araştırmaya göre kuersetin, rutin ve flavonoller nabızı

normalleştirme ve zayıf olarakta (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme özelliklerine sahiptirler(Jeney and Uri 1954).

Flavonoid maddelerin en kıymetli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna pozitif etkileridir. Flavonoid maddelerin karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı zehirsizleştirilmesi ve safra salgılanmasını hızlandırıcı etki ettikleri belirtilmiştir(Xadjay 1972; Davidovic and Klosterman 1954).Flavonoid maddelerin zehirsizleştirme etkisinin nedenlerinden birinin, idrar söktürücü özellikleri olduğu belirtilmiştir(Borkowski *et al* 1960).

1970’li yıllarda flavonoidlerin pratik kullanımı daha da hızlanmıştır. Yapılan birçok geniş çaplı araştırma sonucunda flavonoidlerin farklı farmakolojik ve biyokimyasal aktivitelere sahip oldukları tesbit edilmiştir. Flavonoidlerin antioksidan (Bors and Saran 1987), antimikrobiyal(Pratt and Hudson 1990), antiülserojenik, antiviral, hepatoprotectiv, hipolidemik (Wagner *et al* 1991; Hikino H. and Kiso 1988), ve iltihap önleyici(Moroney *et al* 1988; Vlaskouska *et al* 1990) etkiye sahip oldukları farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca flavonoidlerden kuersetin ve kaempferolun antimutajenik ve antikarsinojenik etkileri gösterdiği *in vitro* ve *in vivo* şartlarda tebit edilmiştir (Kato *et al* 1983; Huang *et al* 1983; Verma *et al* 1988; Deschner *et al* 1991).

1.1.3.1. Flavonoidlerin antioksidan etkileri

Antioksidan maddeler, düşük derişimlerde bile organik bileşiklerin enzimatik olmayan serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu engelleyen bileşiklerdir. Son yıllarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkilerden elde edilen doğal antioksidan maddelere karşı ilgisi artmaktadır. Bu ilginin nedeni, sentetik antioksidan maddelerin (butilhidroksianizol: BHA ve butilhidroksitoluen: BHT gibi) kanserojen etkilerinin olduğunun düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için

genellikle zararsız olup yan etki göstermezler. Doğal antioksidanlar gıda sanayinde besinlerin bozunmasını önlemek, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını, besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir. Flavonoidlerin antioksidatif özelliklerinden dolayı onlara karşı ilgi gittikçe artmaktadır (Javanovic *et al* 1994; Fraga *et al* 1987; Negre-Salvayre *et al* 1991).

Son zamanlarda yürütülen bu amaca yönelik araştırmalar, bazı flavonoidlerin süper oksit ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını; lipid peroksid radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Bors and Saran 1987; Tsujimoto *et al* 1993; Yuting *et al* 1990; Zhov and Zheng 1991; Cottele *et al* 1992; Hanasaki *et al* 1994)

Model sistem olarak unilamellar lipozomlar içeren fosfolipid bilayerlerde serbest radikal oluşturucu olarak, suda çözünen azo bileşik kullanarak, katekinlerin antioksidatif aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla çay katekinleri (-)-epikatekin, (-)-epikatekingallat ve bitki kaynaklı besinlerde yaygın olan flavonoid olarak quercetin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu bileşiklerin sulu ortamda oksijen radikallerinin etkisiyle başlatılan membran lipidlerinin peroksidasyonunu a-tokoferole göre daha aktif olarak önleyen lipofilik antioksidanlar olduğunu göstermiştir(Terao *et al* 1994).

Polugonum hidropiper bitkisinden elde edilen sulfatlanmış flavonoidlerin, (quercetin 3-sulfat, rhamnetin 3,7-disulfat ve tamarixetin 3- O-p-glukozit-7-sulfatın), lipidlerin peroksidlenmesine ve süper oksit anyonlarının oluşumuna etkilerini araştıran araştırmacılar bu bileşiklerin her birinin, doğal antioksidan a-tokoferole göre, daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini açıklamışlardır(Yagi *et al* 1994).

Flavonoid radikallerinin indirgenme potansiyelleri alkil peroksil ve süperoksit radikallerinin indirgeme potansiyellerine göre daha düşüktür. Bu yüzden flavonoidler

bu oksit türlerini deaktive eder ve reaksiyonlarının verebileceği zararlı sonuçları önlerler(Wardman 1989; Javanovic *et al* 1992).

Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil gruplarının pozisyonları ile antioksidatif aktivite arasındaki ilişki araştırılmıştır. Quercetinin de morin, kaempferol ve luteolin gibi etkili antioksidan olduğu gösterilmiştir(Pratt and Hudson 1990).

1.1.3.2. Flavonoidlerin antikarsinojenik etkileri

Kanser oluşumunda beslenmenin çok önemli bir faktör olduğu anlaşılmaya başlandı; besinlerle alınan sebze ve meyvelerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği ile ilgili çalışmalar artış göstermiştir. Bu koruyucu etkinin, besinlerde bulunan antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen polifenolik bileşiklerin antioksidan etki veya farklı bir mekanizma ile antikanserojen etki gösterdikleri ileri sürülmektedir. Özellikle, içilen şarap ve çayın in vitro ve in vivo koşullarda antioksidatif etki gösterdiği açıklanmıştır (Hertog *et al* 1993; Ruch *et al* 1989; Namiki *et al* 1990; Renaud and De Lorgeril 1992; Frankel *et al* 1993; Durak *et al* 2004).

Flavonoidlerden quercetinin, karakteristik bir karsinojen bileşik olan, polinükleer aromatik hidrokarbon benz[a]pirenin (BP) mutajenik aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Ogawa *et al* 1985; Nune *et al* 1984).

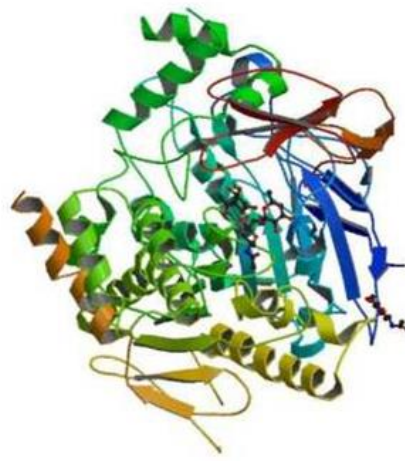
1.2. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (EC 3.1.1.7) (AChE, Asetilhidrolaz), nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen hidrolaz grubundan bir enzimdir. AChE başlıca nöromuskular kavşakta ve sinaptik iletimi sonlandırdığı kolinerjik beyin sinapslarında bulunur. Enzimlerin

karboksilesteraz ailesine aittir. Bu enzim sinir gazları ve pestisitler gibi organofosfor bileşikler tarafından inhibisyon için birincil hedeftir.

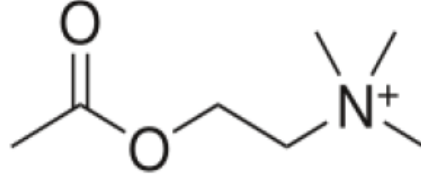
1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

AChE oldukça yüksek bir aktiviteye sahiptir, her bir molekül enzim saniyede yaklaşık olarak 25000 asetilkolin (ACh) parçalar. Enzimin aktif bölgesi anyonik alt birim ve katyonik alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşur. AChE'nin yapısı ve reaksiyon mekanizması enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (Susman *et al* 1991).



Şekil 1. 5. Asetilkolinesterazın üç boyutlu yapısı.

Enzimin mekanizmasının daha iyi anlaşılması için önemli bir nörotransmitter madde ve enzimin substratı olan asetilkolinin kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde verilmiştir.



Şekil 1. 6. Asetilkolinin yapısı.

Aşağıda enzimin kataliz reaksiyonu gösterilmektedir. Ürün olarak asetat ve kolin oluşur.



Şekil 1. 7. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

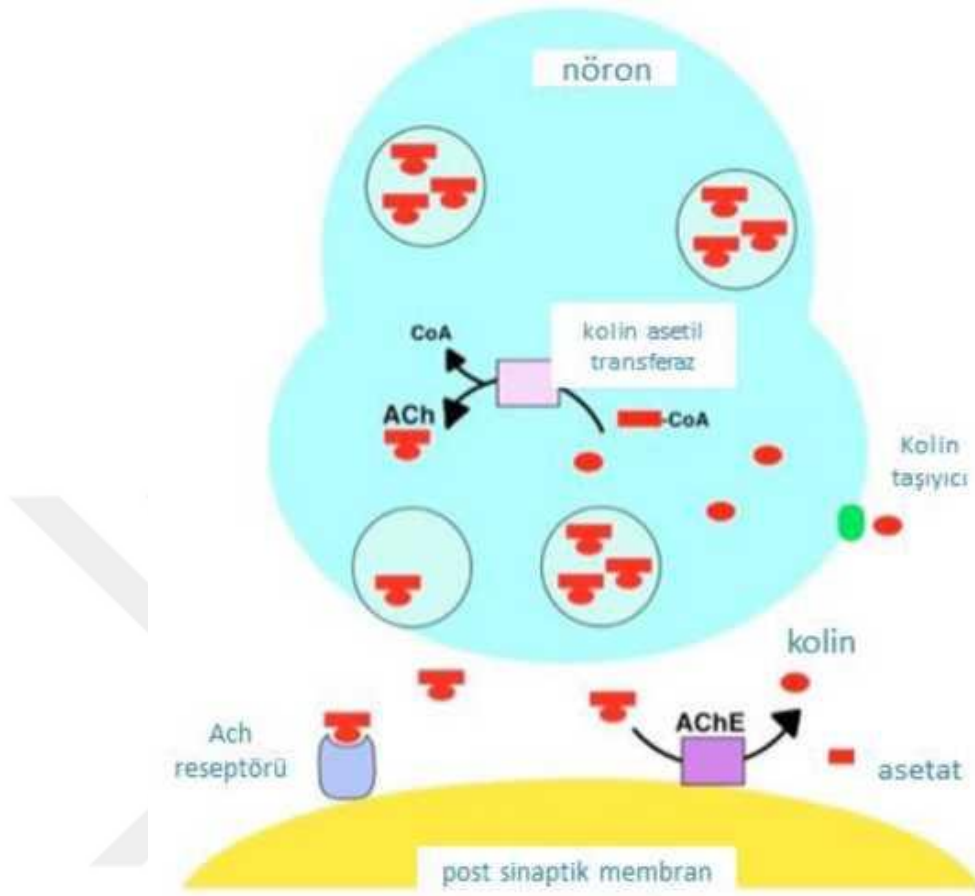
Enzimdeki anyonik alt birim asetilkolinin pozitif kuaterner amini ile bağlanır. Ayrıca bu bölgeye diğer katyonik substratlar ve inhibitörler de bağlanır. Katyonik substratlar, aktif bölgeye giden aralıkta sıralanan 14 aromatik amino asit ile etkileşimden başka anyonik bölgede negatif yüklü amino asitlerle bağlanmazlar (Ariel *et al* 1995). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça yüksek bir korumaya sahiptir (Ordentlich *et al* 1993). Aromatik asitler arasında triptofan 84 kritik öneme sahiptir ve bu amino asitin alaninle yer değiştirmesi enzimin reaktivliğini 300 kat azaltır (Tougu 2001). Aktif bölgeye giden bu aralık yaklaşık olarak 20 angstrom uzunluğa sahiptir. Aktif bölge enzimin alt kısmından 4 angstrom yukarıda bir konuma sahiptir (Harel *et al* 1993).

Asetilkolinin asetat ve koline hidrolizlendiği esteratik alt birim katalitik üçlü; serin 200, histidin 440, glutamat 327 amino asitlerinden oluşmuştur. Bu üçlü amino asit grubu, 3. amino asitin olması gereken aspartat yerine glutamat gelmesi dışında serin

proteazlarla benzer dizilime sahiptir (Tripathi 2008). Karboksil esterin hidroliz reaksiyonu açıl-enzim ve serbest kolinin oluşumuna neden olur. Daha sonra açıl-enzim su (H_2O) molekülü tarafından nükleofilik atağa uğrar ve histidin 440 amino asitinin yardımıyla asetik asiti serbest bırakılır ve tekrar serbest enzim oluşur (Pohanka 2011).

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

Nörotransmisyon sırasında ACh sinir hücresinden sinaptik boşluğa salınır ve post-sinaptik membrandaki ACh reseptörlerine bağlanır. Böylece bir sinyal oluşur. Aynı şekilde post-sinaptik membranda konumlu AChE enzimi asetilkolini hidrolize ederek sinyal iletimini durdurur. Serbest kalan kolin önceki sinaptik sinir hücresi tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferaz enzimi tarafından asetil-CoA ile reaksiyonundan tekrar asetilkolin sentezlenir (Whittaker 1990). Aşağıdaki şekilde mekanizma gösterilmiştir:



Şekil 1. 8. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

Bir asetilkolinesteraz inhibitörü AChE enzimini inhibe ederek asetilkolinin yıkımını engeller. Böylece nörotransmitter asetilkolinin konsantrasyonunu ve işlev süresini artırır. AChE inhibitörleri geri dönüşümlü, yarı geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak etki ederler (Pohanka 2012).

Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü AChE inhibitörleri çoğunlukla tedavi amaçlı kullanılır. Bu inhibitörlere karbamatlar, fizostigmin, neostigmin, pyridostigmine, ambenonium, demekaryum, rivastigmin, fenantren türevleri, galantamin, kafein

(yarışmasız), piperidinler, donepezil, takrin (tetrahidroaminokridin, THA), edrofonyum, Huperzin A, ladostigil, ungeremine, lactucopirin örnek olarak verilebilir.

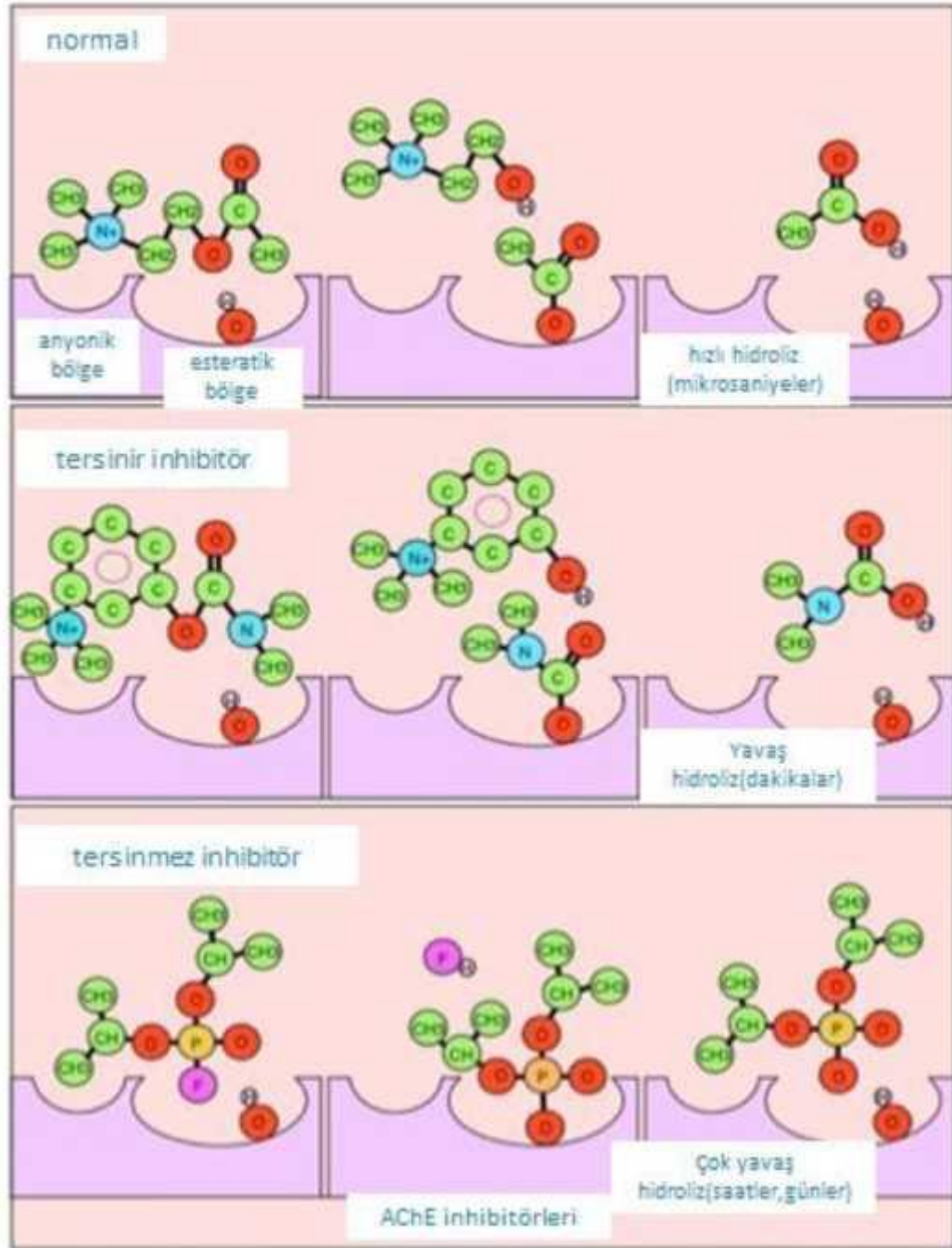
Yarı-geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılır. Bu inhibitörlere organofosfatlar, ekotiofat, sarin, diazinon, ethiofencarb, propamocarb, diizopropilfluorofosfat, malathion, soman, galantamin, cadusafos, klorprifos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, parathion, aldicarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb, pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbetamit, karbofuran, karbosulfan, chlorbufam, chlorpropham, formetanate, methiocarb, methomyl, propham, onchidal ve kumarinler örnek olarak verilebilir.

1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları

AChE enzimi inhibitörleri birçok alanda kullanılır. Bu alanlar aşağıda sıralanmıştır.

- Doğal olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı zehirler AChE enzimini inhibe edebilirler.
- Sinir gazları kimyasal silah olarak kullanılabilir.
- İnsektisitlerde bulunurlar (Colovic *et al* 2013).
- Tıbbi amaçlı olarak, myasthenia gravis tedavisinde, glaucoma tedavisinde, antikolinergik zehirlenmeye karşı antidot olarak, non-depolarlayıcı kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmek için, Alzheimer gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarının tedavisinde özellikle tepkisizliğe karşı, Lewy Body Dementia ve Parkinson Hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Taylor *et al* 2012).

Asetilkolinesterazın inhibisyon mekanizmasını gösteren şekil aşağıda verilmiştir:



Şekil 1. 9. Asetilkolinesteraz inhibisyon mekanizması.

1.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin meydana gelmesini engelleyerek veya ortamda bulunan radikalleri nötralize ederek hücrenin zarar görmesini önleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyonel grup taşıyan moleküllerdir (Kahkönen *et al.* 1999; Nagai *et al.* 2005).

Antioksidanlar serbest radikalleri giderme yetenekleri nedeniyle son yıllarda insan beslenmesinde incelenen önemli araştırma konularından birisi olmuştur. Ayrıca besin teknolojisinde, besinlerin uzun süre bozunmadan saklanabilmesi için sentetik ve doğal antioksidanlarla muamele edilmesi standart bir işlem olarak uygulanmaktadır. Besinlere ilave edilen antioksidan özellikli bileşikler sentetik (bütil hidroksitoluen ve bütil hidroksianisol gibi) olabileceği gibi genellikle bitkilerden elde edilen doğal antioksidan bileşikler (rutin ve katekol gibi) de olabilir. Bu bileşiklerin hem besin koruma özellikleri hem de metabolizmaya girdikten sonra antioksidan olarak davranıp hücreyi oksitleyici maddelere karşı koruma özellikleri bilinmektedir (Yavaşer 2011).

Antioksidan maddeler vücudumuz tarafından üretildikleri (glutasyon v.b.) gibi, gıdalar yoluyla da dışarıdan alınabilmektedir. Gıdalarda bulunan ve vücudumuzu zararlı serbest radikallerle karşı koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler (A, C ve E vitaminleri), karotenoidler, flavonoidler ve polifenollerdir. Araştırmaların çoğunda sebze ve meyve tüketimi ile kalp hastalıklarının ve belirli kanser türlerinin oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. En önemli antioksidan gruplardan biri polifenoller ve bunların türevleridir. Oksidatif sistemde antioksidan bileşikler farklı şekillerde davranmaktadırlar. Örneğin; singlet oksijeni sönmüleyerek oksijen değişimini azaltmakta, birincil radikallerden olan hidroksil radikallerini tutarak zincir reaksiyonlarının başlamasını engellemekte ve metal iyon katalizörlerini bağlamaktadırlar (Güçlü *et al.* 2009).

Günümüzde kullanılan antioksidan maddelerin büyük bir çoğunluğu sentetik olarak elde edilmektedir. Gıdalarda yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar bütildihidroksianisol (BHA), bütildihidroksitoluen (BHT), tersiyerbütildihidrokinon (TBHQ) ve etoksiguindir. Bu antioksidanlar, yüksek kararlılığa sahip olup etkili ve ucuzdurlar. Fakat zehirliliği ve yan etki yaratmaları konusunda bazı şüpheler vardır (Chen *et al.* 1992).

1.3.1. Antioksidanların sağlık açısından önemi

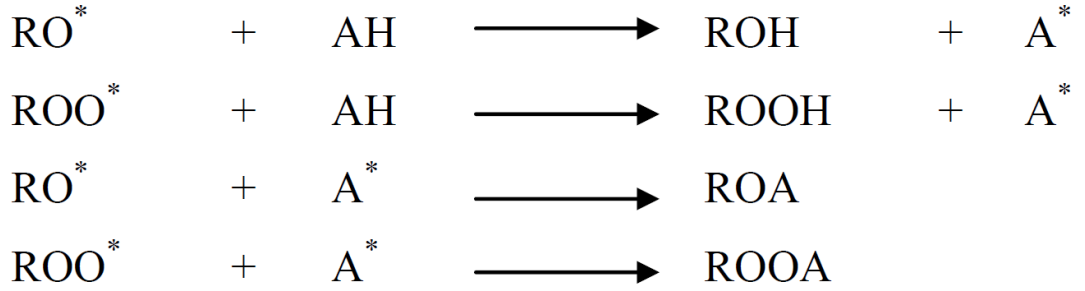
Genel sağlığa olumlu etkileri nedeniyle antioksidanlara verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre antioksidan maddeler, kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltan, genel yaşam süresini uzatan, yaşlanma etkilerini geciktiren etkileriyle bilinmektedirler. Antioksidan maddelerin ilerleyen yaşlarda vücudun savunma sistemini güçlendirdiği, yaşlanmayla ilgili sağlık problemlerinden korunmayayardımcı olduğu, ayrıca cildi ve saçları da beslediği yapılan incelemelerde ortaya konulmuştur (Eröztürk 2000; Eken 2007).

Antioksidan maddelerin en belirgin özellikleri serbest radikalleri yakalama yetenekleridir. Çeşitli biyolojik sistemlerde yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaller ve oksijen çeşitleri vardır. Bu radikaller lipitleri, proteinleri ve nükleik asitleri oksitleyebilmekte ve dejeneratif hastalıkları başlatmaktadırlar. Fenolik asitler, polifenoller ve flavonoidler gibi antioksidanlar serbest radikalleri (peroksit, hidroperoksit veya lipit peroksil gibi) oksidatif mekanizmayı engellemek sureti ile hastalık oluşumunu engeller (Miller *et al.* 2000).

Antioksidan maddelerin insan sağlığı üzerindeki kıymetini ortaya çıkaran en önemli faktörler çözünürlükleri, yapı-aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan alınabilmeleridir (Kaur and Kapoor 2001).

1.3.2. Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidan maddeler, kimyasal özellikleri ve etki mekanizmaları açısından farklı bir sınıfta yer almaktadırlar. Antioksidanların en önemli etki mekanizması lipid serbest radikalleri ile tepkimeye girerek, radikal özelliği sonlandırmalıdır. Bu bileşiklerin etki mekanizması kısaca Şekil 1.11’de gösterilmiştir. Burada antioksidan maddelerin işlevi, oksidatif zincirden substrata hidrojen iyonlarını aktararak aktif radikallerin giderilmesi, reaktif olmayan yapıya çevrilmesi ve bu bileşiklerin daha sonraki adımda moleküler rezonans yoluyla kararlı bir yapıya dönüştürülmesidir. Bu basamaklar esnasında antioksidan madde de aktifliğini yitirmekte ve sonuç olarak gücü git gide azalarak sönmölenmektedir (Pokorny and Korczak 2001; Bayrak 2006; Venkatesh and Sood 2011).



Şekil 1.10. Antioksidan maddelerin etki mekanizması.

Antioksidan maddeler oksidatif stresin hasarverdiği dokuların onarımı ve yenilenmesi gibi farklı etki mekanizmalarından bir veya birkaçını sergilemektedir. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürölmesinde önemlidir. Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla göstermektedirler (Krinsky 1992; Pinchuk and Lichtenberg 2002; Klouche et al. 2004). Bunlar:

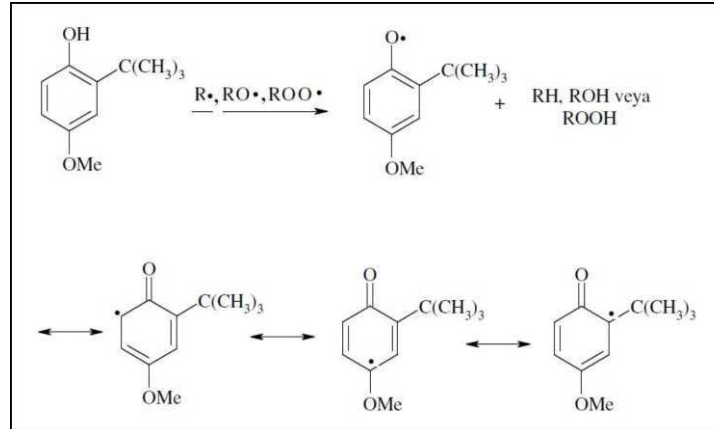
1. Süpürücü etki: Radikal oluşumunu engelleme ve oluşmuş olan radikali molekülü daha zararsız bir formadönüştürme işlemidir. Antioksidan enzimler bu yolla etki gösterirler.

2. Bastırıcı etki: Oksidan maddelerle etkileşip, onlara bir hidrojen transfer ederek aktivitelerini düşüren yada onları inaktif haleçeviren etkiye denir.

3. Zincir kırıcı etki: Serbest radikal maddeleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp işlevlerini önleyici etkiye zincir kırıcı etki denir.

4. Onarıcı etki: Bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz yer almaktadır.

Antioksidan maddelerin temelini fenolik yapılar oluşturur. Rezonans hibritleri ile düşük enerjili serbest radikalleri oluşturur. Şekil 1.12’de verilen mekanizma, fenolik yapıdaki sentetik bir antioksidan olan BHA’nın antioksidatif etkisini ve rezonans kararlılığını göstermektedir (Venkatesh and Sood 2011).

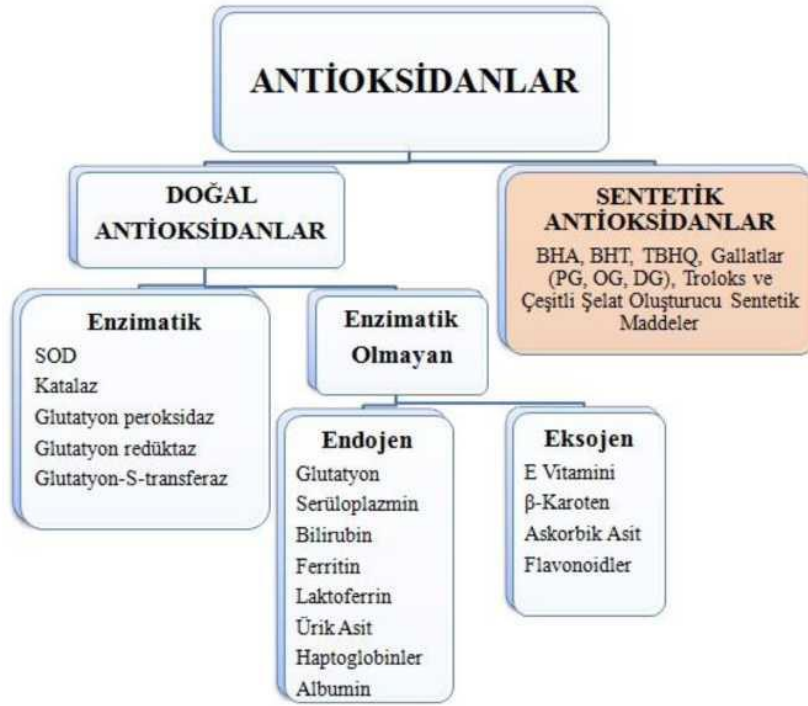


Şekil 1.11. BHA’nın etki mekanizması.

En az iki antioksidanın tek tek gösterdiği etkinin toplamından fazlasını bir arada kullanılarak daha kuvvetli bir etki göstermesine sinerjistik etki denir. Söz konusu etki iki antioksidan arasında oluşabileceği gibi, bir antioksidan ile antioksidan niteliği olmayan diğer bir madde arasında da gerçekleşebilmektedir (Altuğ 2001; Öner *et al.* 2004; Venkatesh and Sood 2011).

1.3.3. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanları birçok kategoride sınıflandırmak mümkündür. Antioksidanlar yapılarına göre; enzimatik ve enzimatik olmayan, çözünürlüklerine göre; suda çözünenler ve yağda çözünenler, yerleşimlerine göre; hücre içi ve hücre dışı, kaynaklarına göre endojen ve eksojen olarak sınıflandırılabilirler. Ayrıca, antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki temel grupta da sınıflandırılmaktadırlar. Doğal antioksidanlar da kendi aralarında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ayrılmaktadırlar. Şekil 1.3’de antioksidanların sınıflandırılması şematik olarak verilmiştir (Nawar 1985; Altuğ 2001).



Şekil 1.12. Antioksidanların sınıflandırılması

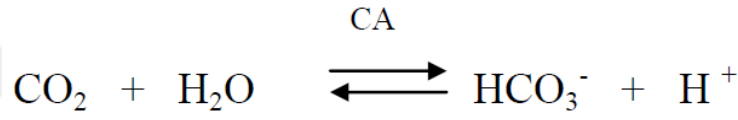
1.3.3.1. Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapıdaki maddelerden oluşmaktadırlar. Başlıcaları tokoferoller, karnosik asit, flavonoidler, sesamol, rosmarinik asit, sesamolin, karotenoidler ve askorbik asittir. Doğal antioksidan maddeler izole etmek amacı ile pek çok bitki türünde (nar kabuğu, adaçayı, kekik, yeşil çay, biberiye vb.) yapılan incelemeler neticesinde yeni antioksidanlar tesbit edilmiştir. İncelemeler sonucunda bu maddelerin lipid oksidasyonu üzerine etkili olduğu tebit edilmiştir (Saito and Nakamura 1990; Vareltzis *et al.* 1997; Serdaroğlu and Felekoğlu 2005; Dimitrios 2006; Pokorny 2007; Yasin and Abou-Taleb 2007; Selmi and Sadok 2008; Sikora *et al.* 2008; Silva and Santana 2008; Al-Bandak *et al.* 2009).

1.4. Karbonik Anhidraz

1.4.1. Fizyolojik fonksiyonları

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz; E.C.4.2.1.1) enzimi bütün canlılarda bulunur. Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ihtiva eden bir metaloenzim çeşididir. Prokaryot ve ökaryotlarda bulunup, dağılımı geniş ve birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanmış olan bir metaloenzimlerdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda karbon dioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizleyen son derece önemli bir enzimdir (Supuran 2008).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, sığır kemik iliği çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Son olarak Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demirdag *et al.* 2013).

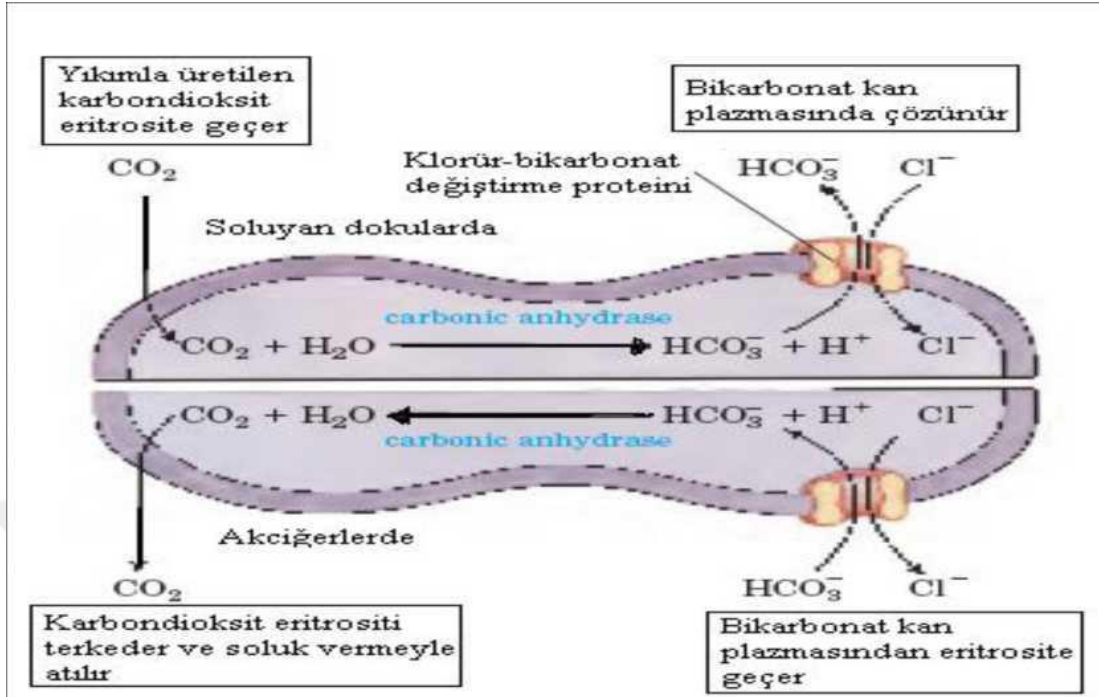
Bu reaksiyon ve ürünleri ile metabolizmada, asit-baz dengesinin sağlanması, CO_2 'nin taşınması, elektrolit sekresyonu, üregenez, lipogenez ve glukoneogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve daha bir çok fizyolojik ve patolojik proseslerde görev almaktadır (Sly 1995). Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun dışında karboksilik, sülfonik, karbonik ve

fosforik esterlerin, aldehitlerin ve piruvatın hidrolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi bugüne kadar gösterilememiştir (Lindskog 1997).

Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden karbondioksit kullanılır. Gaz halindeki karbondioksit, bitkinin yapraklarında bikarbonat iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, bikarbonat iyonlarının tekrar karbondiokside dönüşmesini sağlar (Arslan 1994).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir (Arslan 1994).

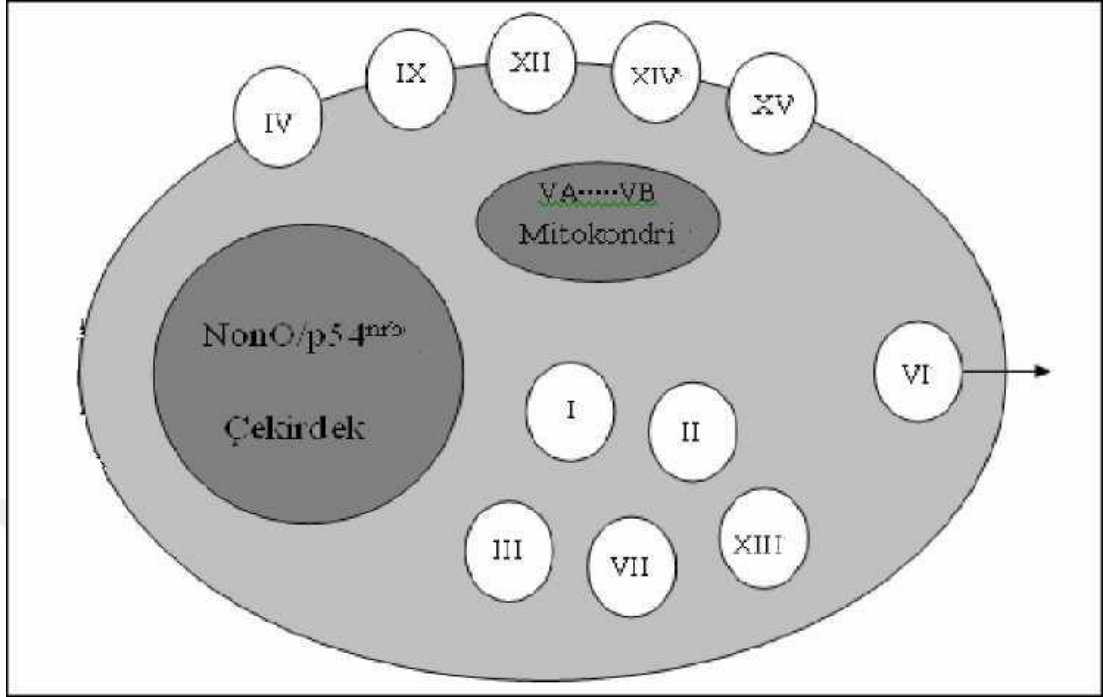
CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO₂ / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO₂ homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000).



Şekil 1.13. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- ’m giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger 2005).

1.4.2. Karbonik anhidraz izoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).



Şekil 1.14. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri.

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkataliktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2004; Supuran 2008). CA- XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori, 2004; Hilvo *et al.* 2005).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett and Emmett 2000; Sugrue 2000).

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. CA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde CA-I izoenzimi yanında CA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO₂'i, HCO₃⁻'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO₃⁻'ın CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Şekil 1.2). CA-I izoenziminin turnover sayısı 2,5 x 10⁵ s⁻¹ 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu CA-II kadar açık değildir. CA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 250C'de 10⁶ s⁻¹ olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan CA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer CA-I'e kıyasla daha azdır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan CA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. (Renzi *et al.* 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan CA-II izoenzimi ile Na⁺ ve H₂O'nun geri emilimi sağlanmaktadır. CA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da CA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.* 1997).

Çizelge 1.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (Lindskog 1997)

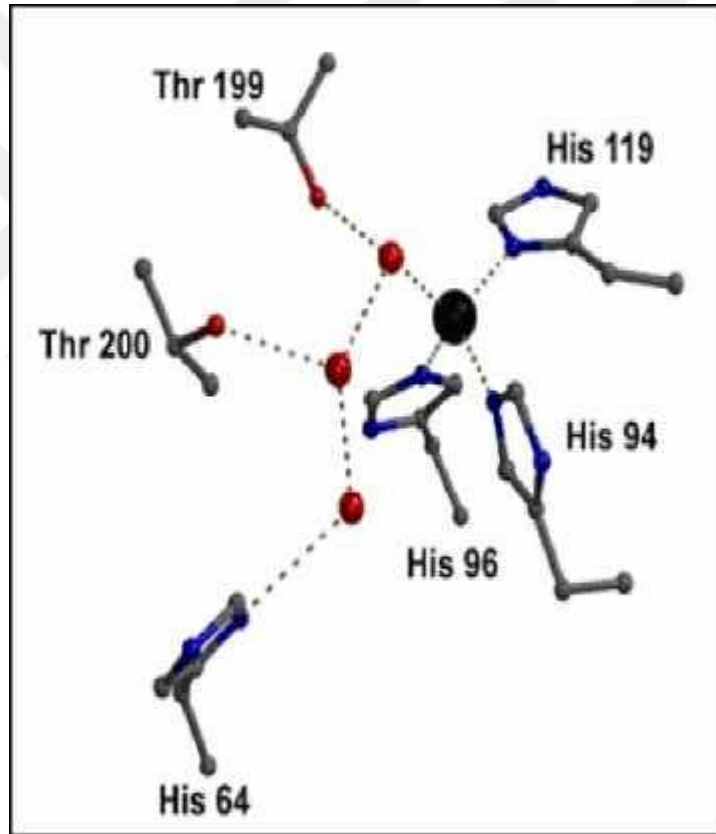
İZOENZİM	KATALİTİK AKTİVİTE	BULUNDUĞU BÖLGE
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta-yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtamelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

1.4.3. Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.20’de gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü koordine olmuştur. Zn^{+2} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden

yoksundurlar (Lindskog 1997; Mohanty and Kannan 1998; Lindskog and Coleman 1973; Lowe *et al.* 1991).

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO_2^- hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5 kadardır (Wistrand 1980; Ryon *et al.* 1982).



Şekil 1.15. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) (Büyük küre Zn^{+2} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.) (Lindskog 1997).

α -CA, β -CA ve γ -CA olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç farklı familyada varlığı tespit edilen CA'lar, şaşırtıcı yeni buluşlardan biridir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdalardır (Hewett and Emmett 2000).

1.4.3.1. α -Karbonik anhidrazlar

İnsan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sıçan CA-V'i ve E. coli'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bu izoenzim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise 5x4x4 nm 'tür. Molekölün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde (yaklaşık 24 aminoasit), bu α -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir (Lesburg and Christianson 1995).

Molekölün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında, α -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer β şeritleri antiparalel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Boriack-Sjodin *et al.* 1995).

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın H₂O veya OH⁻ olduğu tetrahedral geometrideki His-94, His-96 ve His-119'dan üç azot atomuna bağlıdır. Ligandlar proteindeki diğer gruplara hidrojen bağlarıyla tutunmuş ve bir "dolaylı ligand" kabuğu oluşturmuştur (Lesburg and Christianson 1995).

Metal iyonlu ligandlar ve dolaylı ligandların α -CA amino asit dizilişleri sabittir. Doğrudan ve dolaylı çinko ligandlarına ek olarak, sıralı bütün α -CA'larda 17 aminoasit rezidüsü kesin şekilde korunur. Bu rezidülerden bazıları katalitik aktivite açısından önem taşıırken, diğerleri protein yapısının kararlılığında rol oynar. Esasen bilinen, bütün α -CA ailesi ve α -CA ile ilişkili proteinler içinde, sadece 10 aminoasit rezidüsü tamamen sabittir. Bu rezidülerden bazılarının insan CA II'nin kararlılığı açısından önemi, bölgeye özel mutajenez ile test edilmiştir.

1.4.3.2. β -Karbonik anhidrazlar

Henüz hiçbir P-CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle savunur. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ısıpanaktaki Zn (II) iyonu, α -CA'dakinin aksine bir Cys-His-Cys-H₂O grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermektedir.

1.4.3.3. γ -Karbonik anhidrazlar

Son araştırmalarda M. thermophila'dan elde edilen bir yapı olarak γ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül α -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. Her bir ünite, her dönüş başına üç kısa iplikçik bulunan sol el P-heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı P-şeridi meydana gelir. Heliksin karşılıklı bölmeleri de üçgen yapısındadır.

Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. M. thermophila CA'sındaki ve insan CA-II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli

benzerlikler gösterir ve bu durumda katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağlı bölgelerin benzer olmasından ileri gelmektedir (Kisker *et al.* 1996).

1.4.4. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sulfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser 1969; Jabusch 1989).

Çizelge 1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyon Türleri (Özensoy 2002)

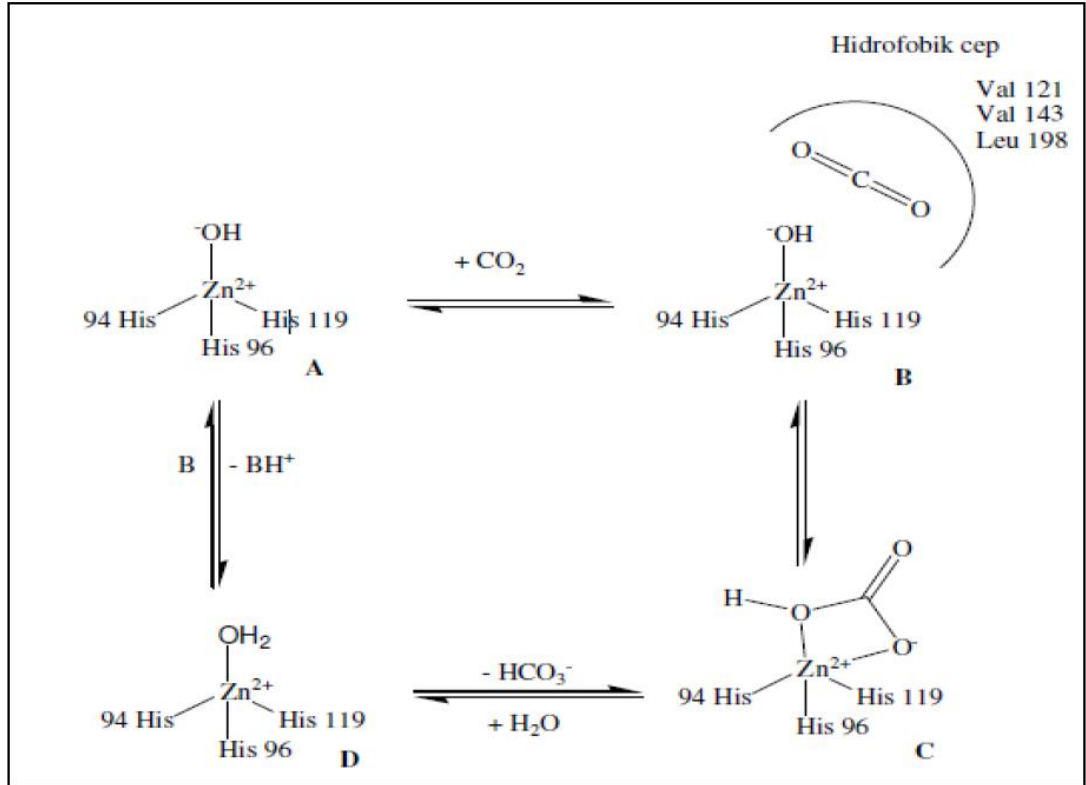
(1)	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
(2)	$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
(3)	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
(4)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

1.4.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

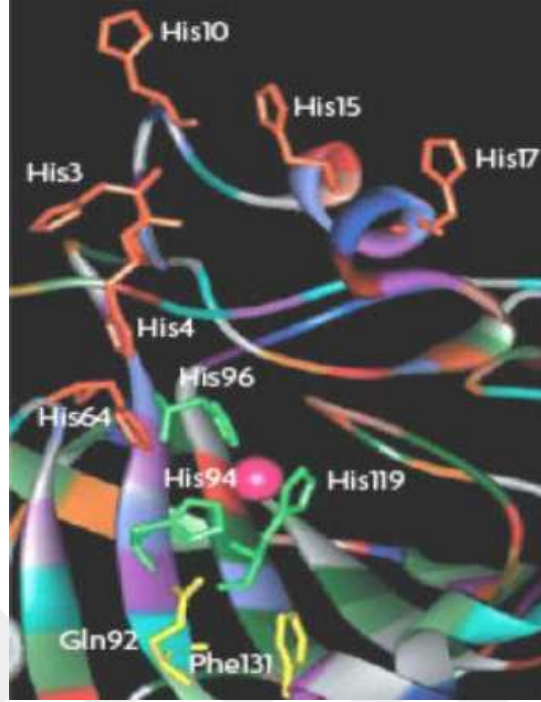
Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır (Lindskog ve Silverman, 2000). Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. CA enzimi aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu içermektedir. Aktif bölge yakınındaki aminoasitler, H^+ verici ve H^+ gradienti oluşturacak biçimde düzenlenmiştir (Lindskog and Silverman 2000).

CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn^{+2} iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å derinliğindeki bir yarıgın tabanında yer aldığını göstermektedir. Çinko bağlı H_2O , Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil

grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilik karakterini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki CO_2 'ye doğru hareket etmektedir (Arslan 1994). Zn^{2+} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.19-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 1.19-B). Bu da, Zn^{2+} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.19-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{2+} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.19-D'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Lindskog 1997).



Şekil 1.16. CA Enziminin CO_2 hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi (Lindskog 1997).



Şekil 1.17. CAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligantı (His94, His 96, His119) görülmektedir. Anyon değiş-tokuşunun karboksiterminal kısmında gerçekleşmektedir (Supuran and Scozzafava 2001).

Katalizdeki hız sınırlaması ikinci reaksiyondur. Enzimin hidroksit kısımlarını rejenere eden proton transferidir (Zimmerman *et al.* 2007). CAII, CAIV, CAV, CAVII ve CAIX gibi kataliz özellikli çok aktif izoenzimlerde süreç, bir histidin rezidüsü (His64)tarafından, en etkili CA izoenzimi CAII ‘ye yönelik oldukça etkili proton transferi sürecini takiben aktif kısmın girişinde konuşlanır.

Bu durum, ayrıca CA II’ nin, bilinen en aktif enzim olduğunu açıklar ($k_{cat}/K_m = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ değeri ile) ve aynı zamanda klinik uygulamaları olan inhibitörlerin dizaynı için önemli sonuçlar veren bir durum olmaktadır (Supuran 2008).

1.4.6. Karbonik anhidrazın önemli inhibitörleri

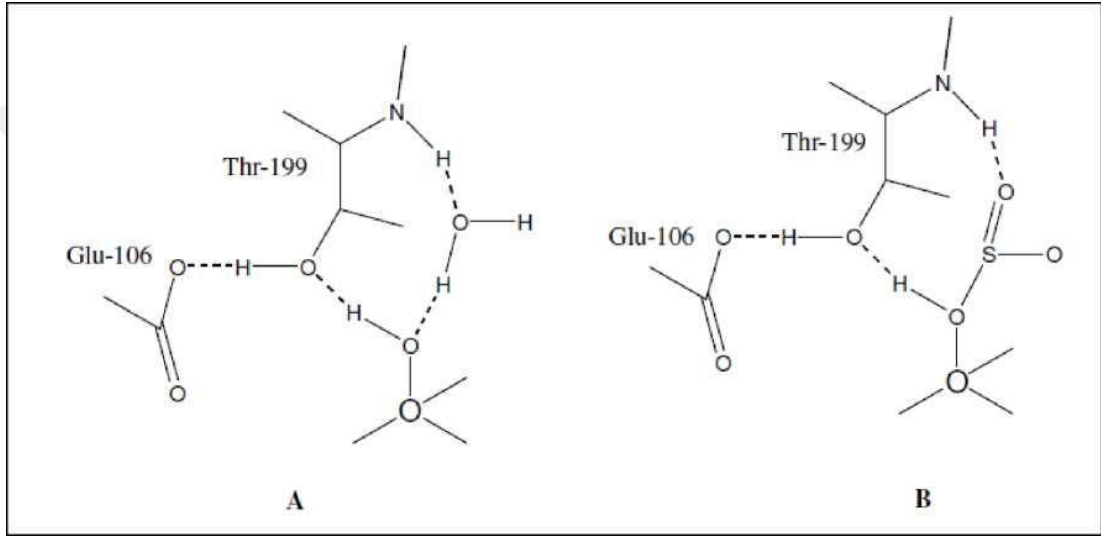
Çogu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları: (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN^- iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F^- iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir (Lindskog 1982).

Inhibisyonun pH bağımlılığına ve 2 Co^{2+} 'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO_2 hidrasyonunda önemli bir rolü olan OH^- iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. 2 Co^{2+} ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir (Lindskog 1982).

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın labarotuarında yapılan insan CA-II çalışmaları başta olmak üzere, son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı H_2O veya OH^- iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir.

Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağlı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidroksil grubunun, metal bağlı çözücüyle bağlanmasında bir H atomu alıcısı olduğu kabul edilmelidir. Ayrıca, çinkoya bağlı H_2O veya OH^- , hidrofobik bir cepte bulunan bir başka su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. Hidrojen, Thr-199'un peptit NH' ına bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir (Liljas *et al.* 1994).

Protonlanmış bir ligand atomuna sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın metale bağlı çözücü molekülün yerini alırlar ve Thr-199'un OH grubu ile hidrojen bağı korurlar. HSO_3^- ve HS^- iyonları buna örnek olarak verilebilir. HSO_3^- iyonu derinde olan su molekülü ile yer değiştirirken bir oksijen atomu Thr-199'un NH gurubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir (Mangani and Hakansson 1992).



Şekil 1.18. CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri (A° inhibe olmayan enzim B bisülfür)

SO_4^- gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler (Simonsson and Lindskog1982). Esasen, pH=6,0'da 2,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir kanıt yoktur. Negatif yüklü iyon Glu-106'nın bağlanmasını önlemektedir (Mangani and Hakansson 1992).

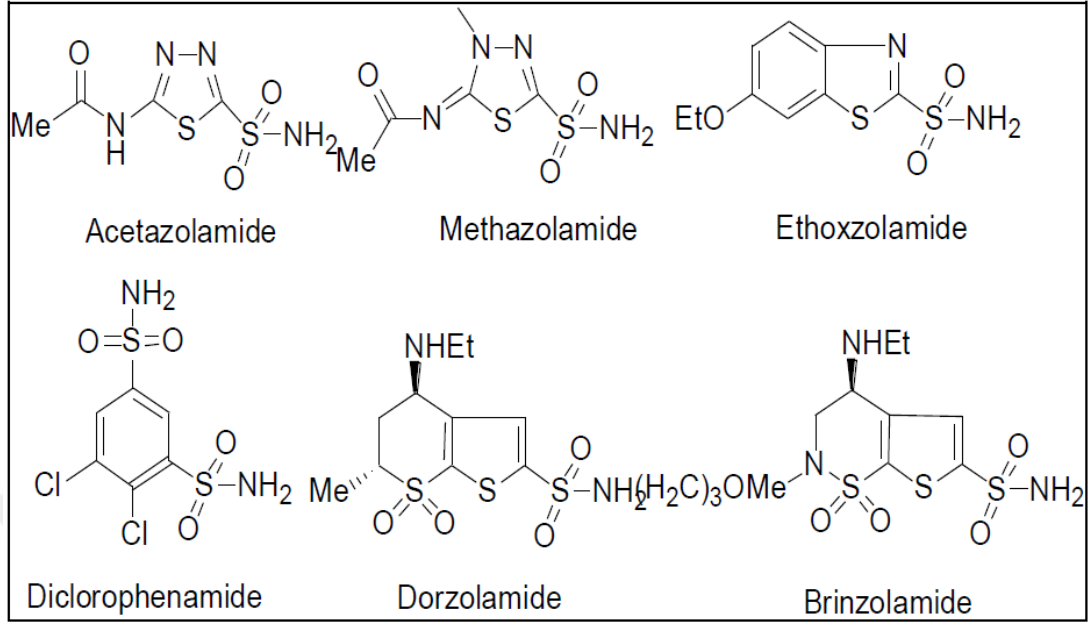
Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin

kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır (Roughton and Booth 1946; Tozlu 1997).

CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler -SO₂NH₂ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Sülfon amidlerin genelde CA-II için K_i değerleri 10⁻⁵ ile 10⁻¹⁰ M arasında değişir. Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan CA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Bülbül *et al.* 2002; Supuran 2008; Isık *et al.* 2015).



Şekil 1.19. Bazı Sülfanamidlerin Açık Formülleri

Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın bir çok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda verilmiştir. Sülfonamidler antiglokom ilacı kullanımının yanı sıra CA-IX ile kanser dokularının direk ilişkisi olması sebebiyle kanser teşhisinde kullanılabilmektedir. Ayrıca CA enzimi inhibitörü olan bu moleküllerin yapılan birçok çalışma sonucunda antiobezite, antifungal, antibakteriyel, diüretik ilaç olarakta kullanılabileceği belirtilmiştir (Supuran 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Doğal antioksidan madde kaynakları; bitki bileşenleri, yağlar ve enzimler olarak tanımlanabilir (Gökalp 2006).

Önemli antioksidanaktiviteye sahip olan ve endüstride gıda katkı maddesi olarak kullanılan soya fasulyesi bitkisel protein açısından da zengindir. Çeşitli kronik hastalıkları tedavisinde ve önlenmesinde yaygın olarak incelenmiştir (Shahidi, 1996). Soya fasulyesinden elde edilen yağdaki başlıca antioksidan maddeler fosfolipitler, α -Tokoferol, δ -tokoferoller, fitik asit, izoflavonlar, aminoasitler ve peptitlerdir.

Karbonik anhidraz enzimi ise, 1933 yılında O'Brien ve Stadie ile Meldrum ve Roughton tarafından ve eş zamanlı birşekildebirbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin (1944), karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin Zn^{2+} içeriği ile orantılı olduğunu belirlemiş ve Zn^{2+} ninkatalizlemede özel bir rolünün olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra CA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Yu *et al.* 2006; Ekinci *et al.* 2013).

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmıştır. Bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Demirdag *et al.* 2013). Hall ve Schraer (1983) gökkuşağı alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır.

Yapılan diğ er bir araştırmada ise hava soluyan balıklardan olan *Amia calva*'larda solungaç ve hava kesesi CA izoenzimlerinin karakterizasyonu ve hücre içindeki dağılımlarını incelemişlerdir. Solungalardan elde edilen CA enziminin, diferansiyel santrifüj ile belirlenen hücre içi fraksiyonları dağılımının büyük bir çoğunluğunu sitoplazmik orjinli olduğu bildirilmiştir. Çeşitli denemeler sonucunda, solungaçlarda bir tek CA izoenziminin olduğu ve CA-II'ye benzediği belirlenmiştir. Solungaçlarda gözlenen durumun aksine hava kesesinde bulunan CA'nın membrana bağlı mikrozomal orjinli olduğu bulunmuştur (Bülbül *et al.* 2002).

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibit rleridirler (Bülbül *et al.* 2002). Örneğin insanlarda glukom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak, ayrıca  dem ve epilepsi tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte birçok kimyasal maddeler ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Krungkrai *et al.*(2001), yapmış olduğu çalışmada, kemikli balıklardan olan yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, hem solungaç hem de barsak CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisini araştırmış, solungaç ve barsak homojenatlarında CA aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Selüloz, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve bezoilklorür Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotetanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, G-250, coomassie brillant blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

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

Saf su cihazı	: Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	: Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

3.1.3.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

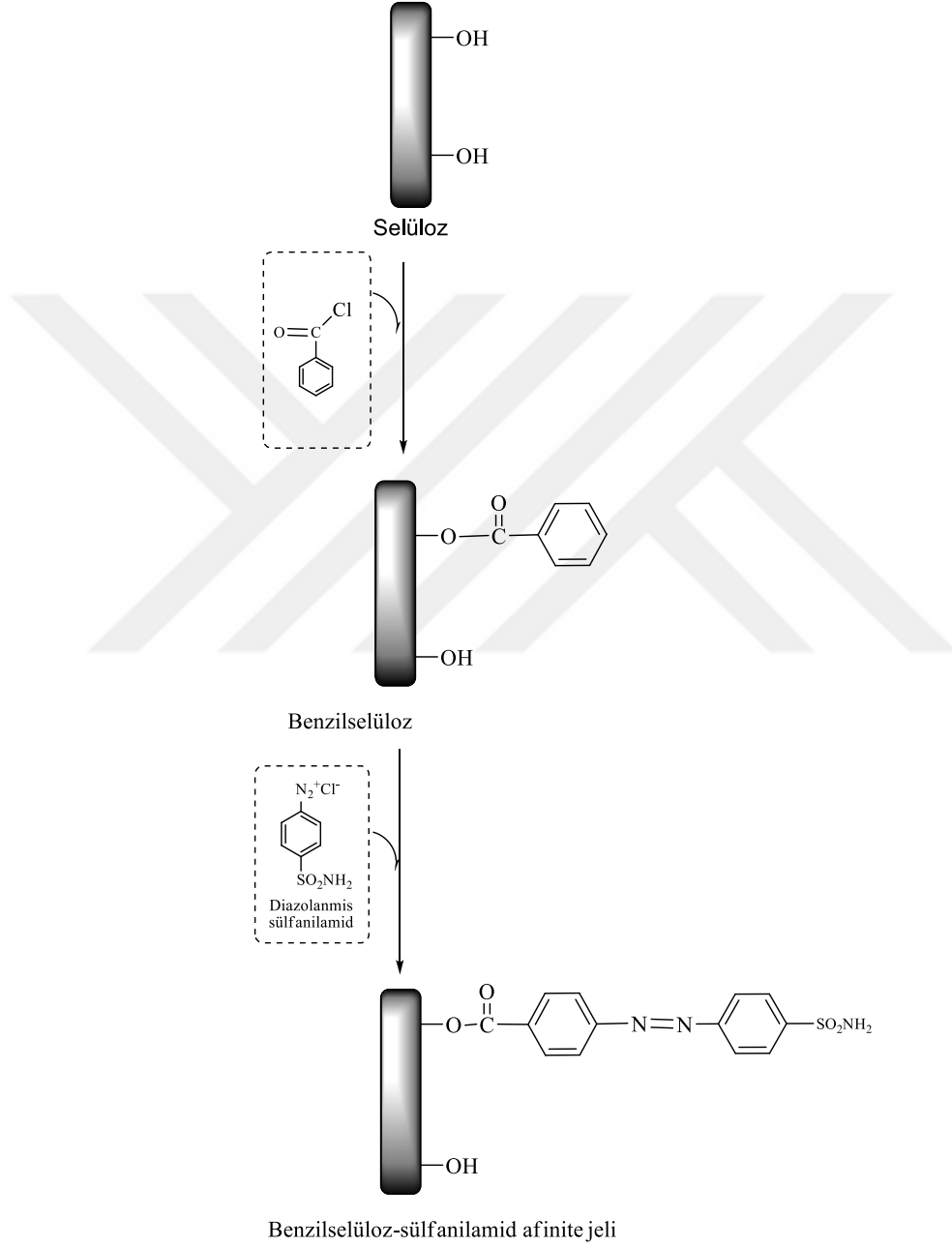
1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 1,38 g NaH₂PO₄, 80 ml destile suda çözüldü, pH metre kullanarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 43 mM'lık hidrojen peroksit çözeltisinin hazırlanması: %30'luk H₂O₂'den 440 µl alındı ve 100 ml 0,1 M'lık fosfat tamponunda çözüldü.

3.2. Antioksidan Çalışmaları

3.2.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi

Fenolik asitlerin H₂O₂ giderme aktiviteleri Ruch *et al.*(1989)'a göre yapıldı. Bunun için pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu kullanılarak 43 mM'lık H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. H₂O₂ konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, 240 nm'de absorbanst göstermesiyle belirlendi. Değişik konsantrasyonlarda alınan fenolik bileşikler 4 ml hacme tampon çözelti kullanılarak tamamlandı. Daha sonra 0,6 mL'lık H₂O₂ çözeltisi

ilave edildi. 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildikten sonra H_2O_2 'nin azalan miktarı 240 nm'de absorbans değeri olarak kaydedildi. Kör numune olarak kontrol küvetine tampon çözelti konularak ölçüm yapıldı.



Şekil 3.1. Benzilselüloz-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları

3.2.2. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Dengeleme tamponu içerisine alınmış jel, 1x10 cm'lik filtrelili cam kolona paketlenildi. Jel tamamen pakettendikten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı.

3.2.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

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

3.3. CA Enzim aktivitesi tayini

3.3.1. Hidrataz aktivitesi

Bu amaçla öncelikle hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (1964). CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1ml 0.025 M veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 ml % 0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO₂ çözeltisi ilave edildi.

Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi(pH:6,3)için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edilediv e yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi(pH:6,3)için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

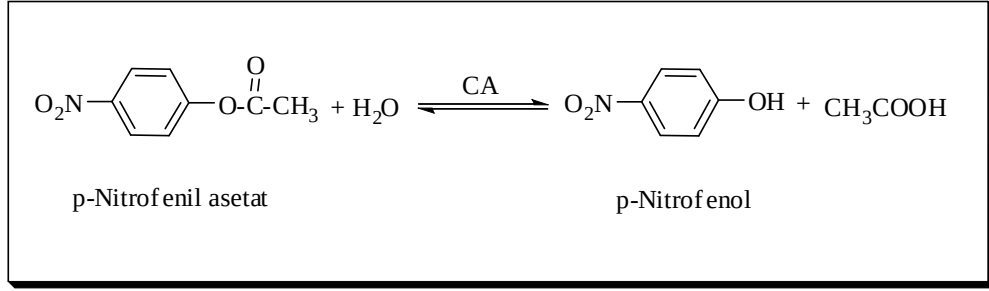
Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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

3.3.2. Esteraz aktivitesi

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



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

348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

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

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü
0,05 M Tris-SO ₄ , pH: 7,5	425	425
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	375	375
Saf su	200	190
Enzim çözeltisi	-	10
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 30 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm’de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

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

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif protein tayini

Proteinlerin yapısında bulunan tirozinin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün elüatlarda kalitatif protein tayini yapıldı.

3.4.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G-250 ile kompleks oluşturması ve oluşturduğu yapının 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bradford yönteminin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

3.5. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik alışmalar

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

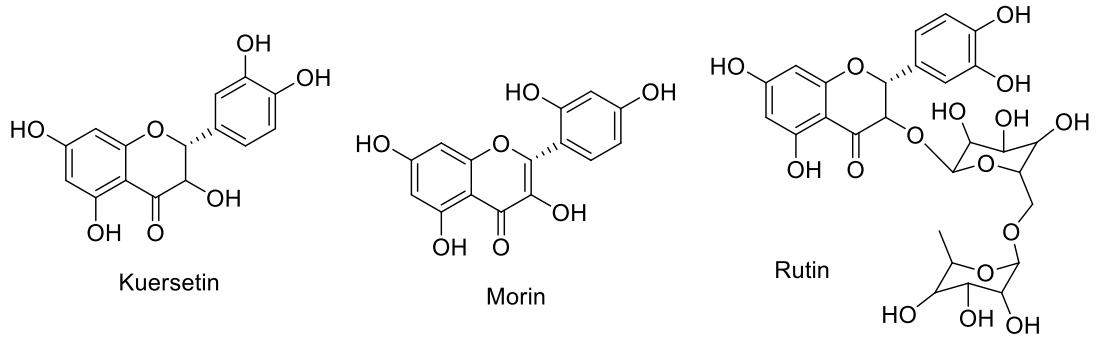
İnsan kanından saflaştırılan CA enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (1970). Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptolanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin % 20 ayırma jelinde elektroforezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi.

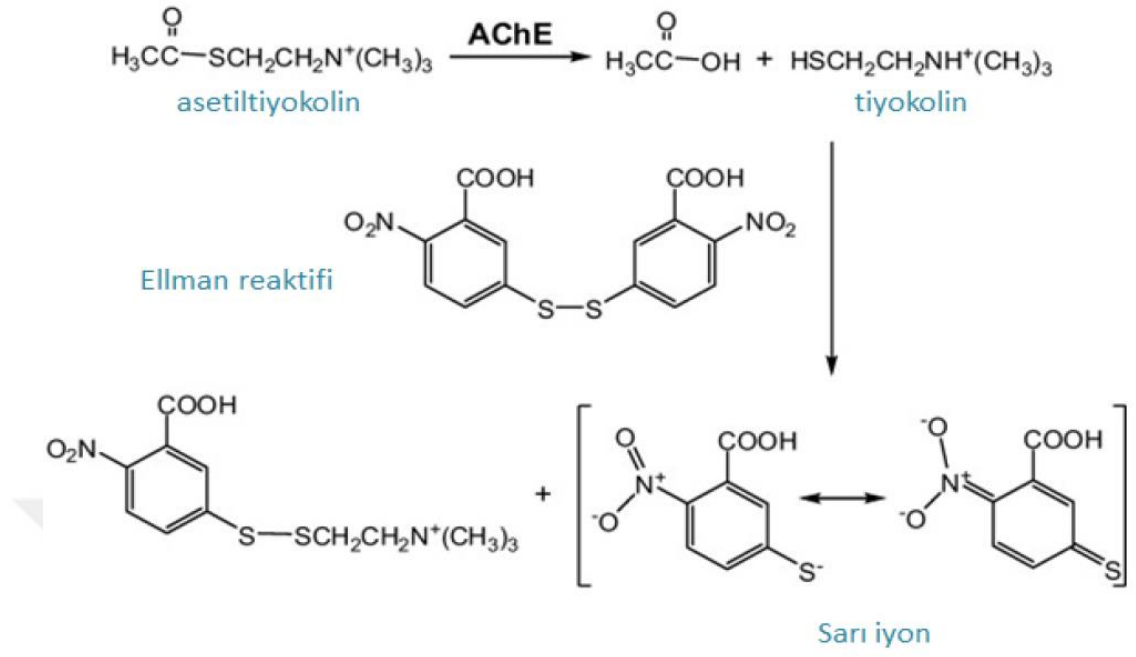
3.7. bCA II Enzim Aktivitesi Üzerine Fenolik Asitlerin Etkilerinin Belirlenmesi

Morin ve rutin flavonoidlerinin yeni afinite jeli ile saflaştırılan bCA II izoenzimi ve eeAChE (electrical eel) enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra IC_{50} değerleri belirlendi.



3.8. Ellman yöntemine göre AChE inhibitör etkisi ölçülmesi

AChE spektrofotometrik olarak Ellman yöntemine göre tayin edilecektir. Ellman yönteminde, substrat olarak oksi ester olan asetilkolin yerine tiyol ester olan asetiltiyokolin kullanılır. Ellman metodunun prensibine göre asetiltiyokolin, asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilir ve hidroliz sonucu açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olan DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucunda sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Reaksiyon sonunda oluşan bu sarı renkli bileşiğin oluşum hızı (rengin şiddeti), 412 nm de absorbans ölçümü yapılarak belirlenir. Bu sarı rengin şiddeti, AChE aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Şekil 3. 3. Ellman reaktifi ile asetiltiyokolinden AChE enzimi varlığında tiyokolin oluşum reaksiyonu.

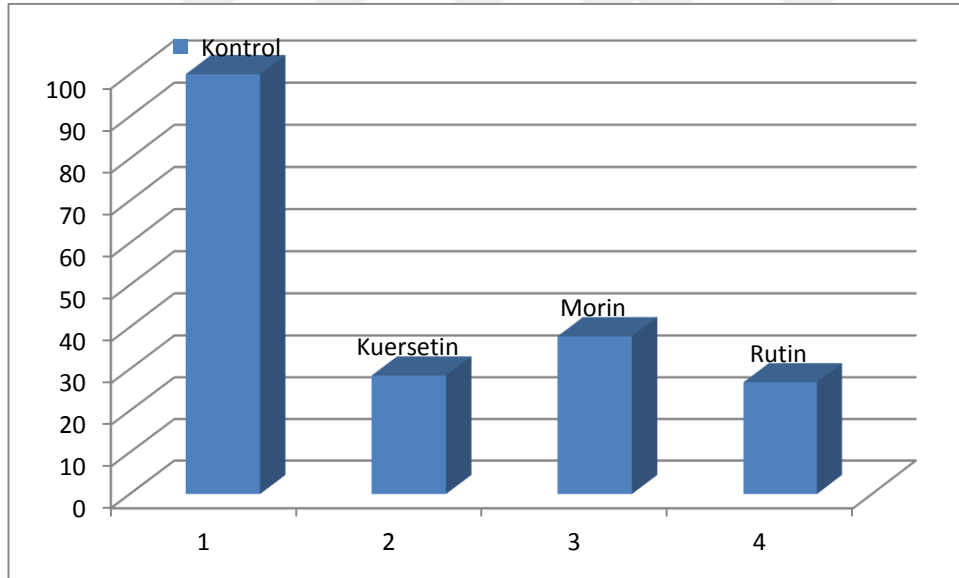
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

4.1.1. Hidrojen peroksit giderme aktivitesi bulguları

10 µg/ml konsantrasyonunda ki fenolik asit çözeltilerinin H₂O₂ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması Şekil 4.1’de verildi.

Kullanılan konsantrasyonda (10 µg/ml) hidrojen peroksiti giderme aktiviteleri ise tablo şeklinde verildi (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Flavonoidlerin 10 µg/ml konsantrasyonunda H₂O₂ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan kuersetin ile karşılaştırması.

Çizelge 4.1. Flavonoidlerin hidrojen peroksit giderme aktivitelerinin IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan kuersetin ile karşılaştırması

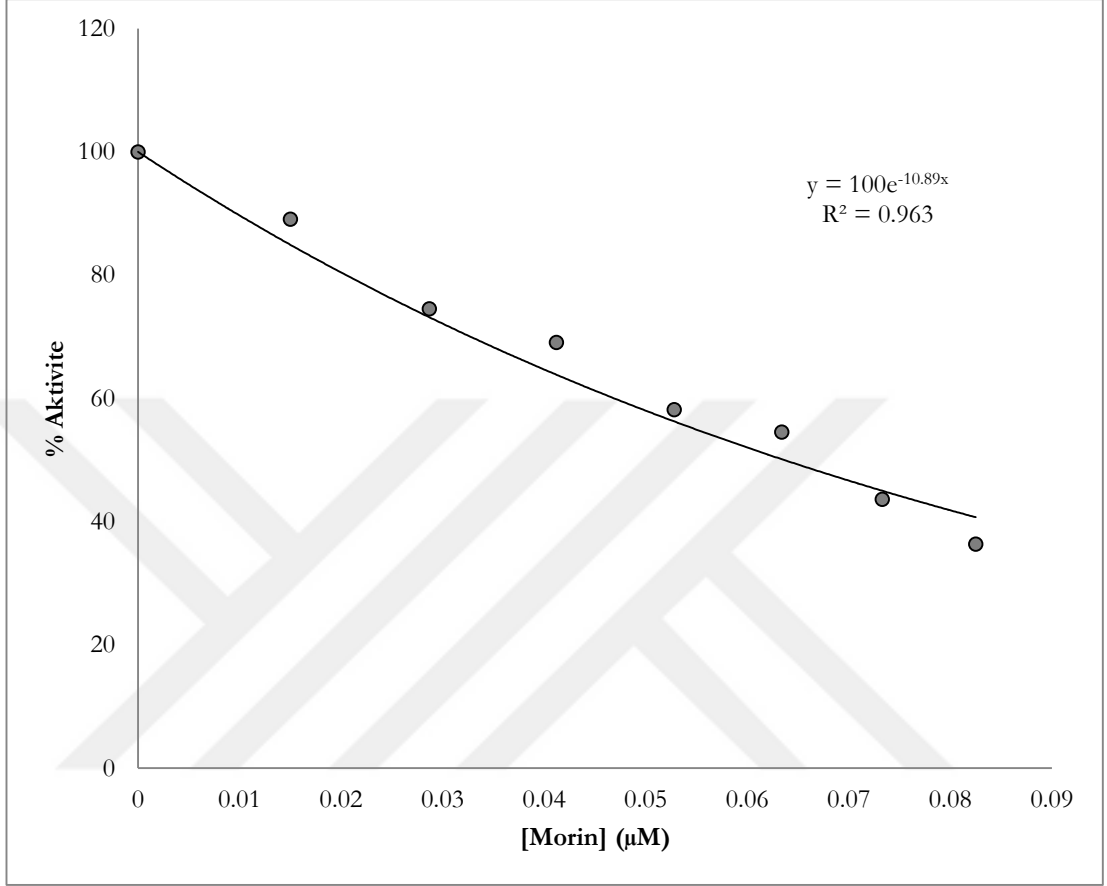
Standart ve flavonoidler	H ₂ O ₂ Giderme (µg/ml)
Kuersetin	28,45
Morin	37,80
Rutin	26,83

Flavonoidler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde hidrojen peroksit giderme aktivitesi sergilediler: rutin > kuersetin > morin.

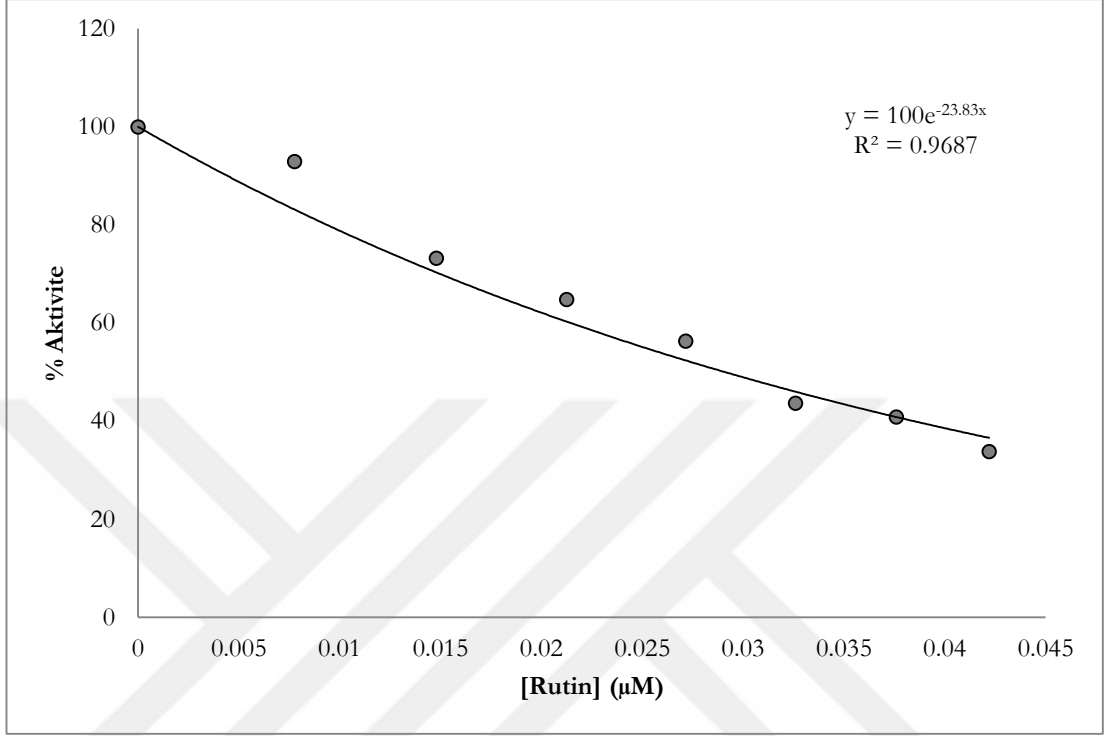
Çizelge 4. 2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri

İnhibitör	bCA II için IC ₅₀ (µM)
Morin	0,0636
Rutin	0,0290
Asetazolamid	0,012 (hCA II)

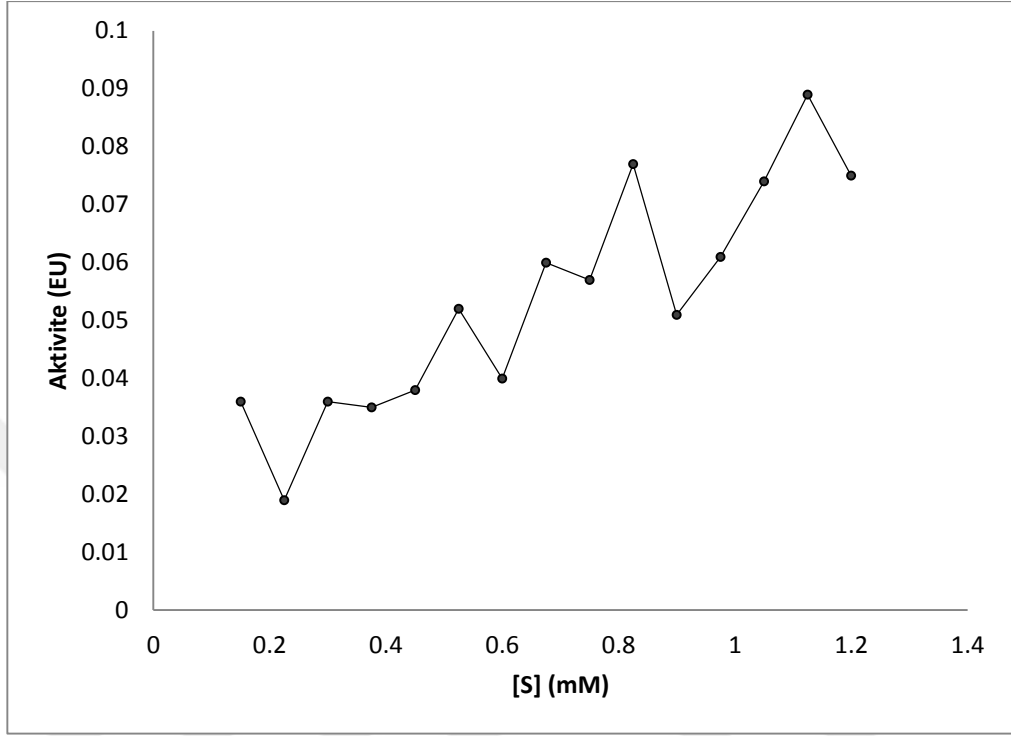
Şekil 4. 2. Morin için % aktivite-[I] grafiği



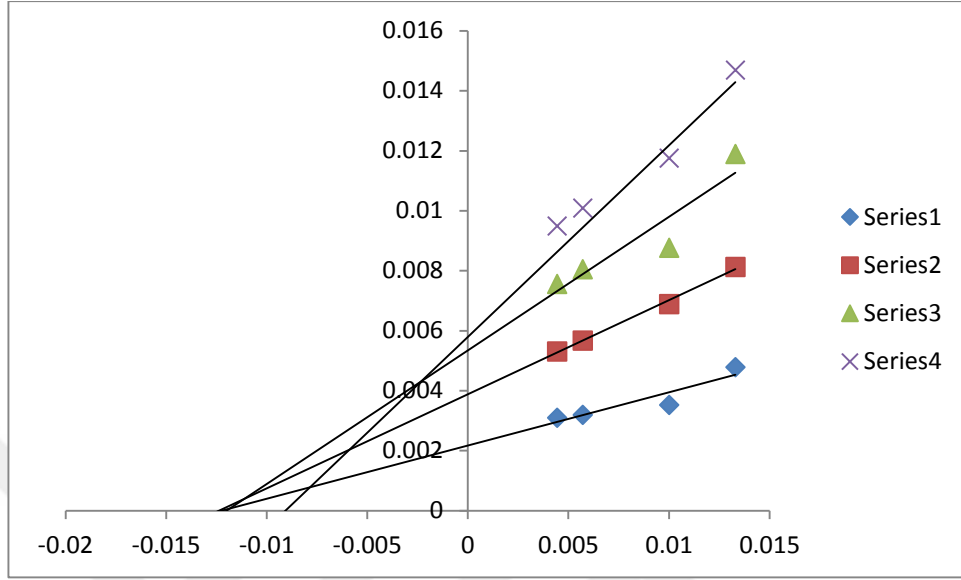
Şekil 4. 3. Rutin için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4. 4.bCA II enzimi için Aktivite-[S] grafiği.



Şekil 4. 5.eeAChE enzimi için morinin K_i grafiği.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut çalışmada morin ve rutin antioksidan özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, aktif oksijen türü olan hidrojen peroksit giderme aktivitesi gibi birbiyoanalitik metot kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ayrı ayrı belirlendi. Kullanılan antioksidan yöntemde bulunan aktiviteler kuersetin gibi doğal bir standart antioksidan ile kıyaslamaları yapıldı. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların biyofonksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Kronik hastalıkların, DNA hasarlarının, mutasyonların, karsinogenezin azaltılması, patojenik bakteriyel gelişiminin inhibisyonu gibi istenilmeyen prosesler biyolojik sistemlerde serbest radikal gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir (Zhu *et al.* 2002).

Biyolojik sistemler hidrojen peroksidi üretebilirler. Ayrıca, polifenol içerik bakımından zengin olan gıda ve içeceklerden daha rahat üretilir. Aktive edilmiş fagositler tarafından hidrojen peroksit üretimi bazı bakteri ve fungal türlerini öldürmede önemli rol aldığı bilinmektedir. *In vivo* olarak da süperoksit dismutaz, gibi enzimler tarafından da üretildiği bildirilmiştir. Hidrojen peroksidin güçlü bir oksitleyici ajan olduğu da düşünülmektedir. Hücre membranından kolaylıkla difüze olabilmekte ve birçok bileşiği yavaş yavaş oksitleyebilmektedir. Hidrojen peroksit hücre membranında bir uçtan diğer uca difüze olarak birçok bileşiği oksitleyebilir. Çok reaktif değildir, fakat hücre içerisinde serbest radikallerin miktarının artmasına yol açtığından zamanla hücre için toksik olabilir. Hücre kültüründe H₂O₂ ilavesiyle geçiş metal iyonlarının ortamda olması oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasını sağlar. Birçok hücrede 20-50 mg'ın üzerinde olduğunda toksik etki gösterebilir. Bütün bu durumlardan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerinde oksidatif hasarı engellemek için bu sistemlerden H₂O₂'i uzaklaştırmak oldukça önemlidir.

Bu anlamda çalışmada kullandığımız flavonoidlerin hidrojen peroksit giderme kapasiteleri araştırıldı. Hidrojen peroksit giderme kapasiteleri için hesaplanan IC₅₀ değerler 26,83-37,8 µg/ml arasında değişmektedir (Çizelge 4.1). En kuvvetli hidrojen peroksit giderme aktivitesi rutin’de gözlemlendi.

Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri, biyolojik sistemlerde, gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından oldukça önemlidir. Bu sistemlerde serbest radikaller meydana gelmekte ve dolayısıyla farmasötik ve gıda sanayinde lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir (Supuran 2008).

Karbonik anhidraz (CA) (Karbonat hidrolizaz E.C 4.2.1.1) enzimi ise eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici bir enzimdir. Karbon dioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizler. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur. Karbonik anhidraz bu reaksiyonun hızı ileri derecede arttırarak saniyede 10⁴-10⁶ reaksiyon hızına ulaştırır (Supuran 2008).

Bu çalışmada sığır karaciğerinden karbonik anhidraz II izoenzimi (bCA II) afinite kromatografisi ile saflaştırılarak doğal flavonoid bileşiklerin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkileri, ayrıca antioksidan etkisi ve AChE enzimi üzerindeki inhibisyon etkileride incelendi.

Karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, sığır karaciğerinden saflaştırıldı. Çalışmada Selüloz matriksi üzerinde hazırlanan afinite jeli kullanıldı. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. Önce matriks olarak seçilen Selüloz, CH₂Cl₂ içerisine alınarak benzoilklorür uzantı kolu olarak takılır. Sonra, sülfanilamid diazolanarak benzil grubuna kenetlendirilir. Sülfanilamid enzimin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligant olarak kullanılır.

Benzil grubu ise enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamak için uzantı kolu olarak seçilir. 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. İşte benzil grubu bu amaçla kullanılır.

Jele adsorbe olan bCA II izoenziminin elüsyonları için, 0,1 M CH₃COONa/ 0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimin saflıklarının kontrolü için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı.

Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm de absorpsanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorpsan vermesi esasına dayanır (Segel 1968).

Kantitatif protein tayinleri Coomassie-Blue yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanabilirliği, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Enzim aktivitesi tayini için iki yöntem kullanıldı. Birincisi; Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂ hidrataz aktivitesidir (1960). Bu yöntemle CO₂'nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃'ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu

aktivite, CA izoenzimlerinin fizyolojik fonksiyonu olduğundan, fenolik asitlerin CA izoenzimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla da kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Amstrong ve arkadaşları tarafından değiştirilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (1966). Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm’de absorpsiyon vermektedir. Bunun seçiliş sebebi Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassas olmasıdır. Ancak hidrataz aktivitesinin ölçümü fizyolojik olarak daha fazla değer taşır. p-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce az miktarda asetonda çözöldü, daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltileri hazırlandı. Çözöcü olarak asetonu seçilmesinin sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözöcü olarak kullanılmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967).

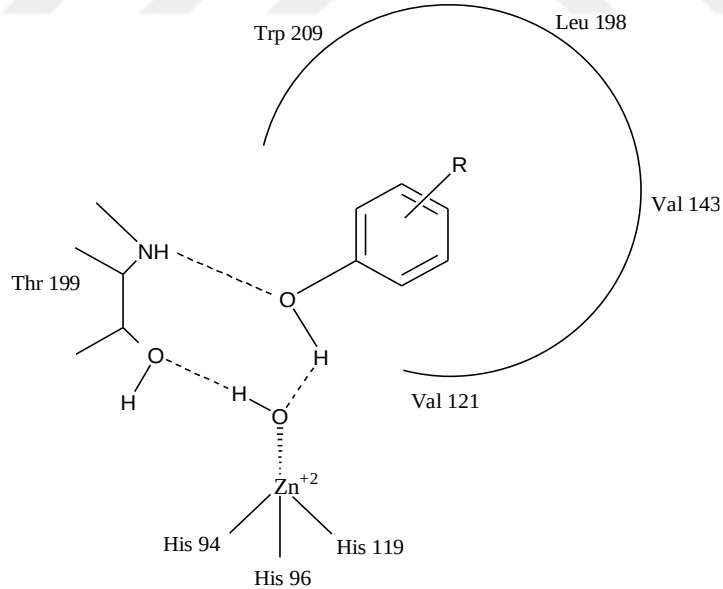
Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede IC_{50} değeri kullanılmaktadır. Sığır CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerini belirlemek için fenolik asitlerin konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlandı ve enzim üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için sığır kanından saflaştırılan CA izoenzimleri için yedi farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan fenolik asitlerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi ve IC_{50} değeri bunlara bağılı olarak hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan IC_{50} değeri Çizelge 4.2’de gösterildi.

Bilindiğı gibi glukoma hastalığından dolayı CA II üzerine yoğun bir şekilde inhibisyon çalışmaları devam etmektedir. Fenolik maddelerin de CA izoenzimlerinin doğal inhibitörü olduğu bilinmektedir. Doğal kaynaklı fenolik maddelerin özellikle glukoma hastalığı için yeni ilaçların sentez ve dizaynında önemli rol oynayacağı şüphesizdir.

Fenollerin ve fenolik maddelerin, CA inhibitörleri olarak araştırmanın temel nedeni, basit fenollerin (PhOH) CA'nın asıl izoformu yani hCA-II si başta olmak üzere substrat olarak CO₂ ye karşı tek yarışmalı inhibitör olduğunun ispatlanmasından dolayıdır.

Son zamanlarda yapılan, Christianson ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada HCA-II ile fenollerin etkileşimini gösteren X-ray kristal yapısı aydınlatıldı (1994).

Bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ ile fenollerin fonksiyonel –OH gurubunun bağlandığını göstermişlerdir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla –OH'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin CA ya bağlandığını ispatladılar (Şentürk *et al.* 2009).



Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli (Bayram *et al.* 2008)

Son zamanlarda grubumuz tarafından fenol ve fenolün yerini alan türevlerden bazılarının tüm memeli izozimlerle etkileşimlerini araştırdılar. Aslında, çeşitli izozimlerin bu ajan sınıfıyla olan inhibisyon profili, birçok basit fenol için milimolardan submikromolar arasında değişen inhibisyon sabitlerine sahip, oldukça değişken bir profildir. Bu nedenle, bu araştırmada gıda katkı maddeleri olarak klinik ve antioksidan uygulamaları olan ve antioksidan etkiye sahip oldukları mekanizmaları ile tez kapsamında değerlendirilen fenolik asitlerin CA ile ilgili araştırmaya dâhil edilmesi çalışmayı orijinal hale getirdi.



KAYNAKLAR

- Abe N., Sato H. and Sakamura S. *Agric. Biol. Chem.* 1987; 51-349.
- Achenbach H., Stöcker, M. and Constenla, MA. *Phytochemistry*. 1988; 27-1835.
- Al-Bandak G, Tsironi T, Taoukis P and Oreopoulou V (2009) Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Majorana syriaca* in Yellowfin Tuna. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 44: 373-379.
- Altuğ T (2001) *Gıda Katkı Maddeleri*. Meta Basım, İzmir, 286 s.
- Ariel, N., Ordentlich A., Barak D., Bino T., Velan B., Shafferman A. (1995). The Aromatic Patch of Three Proximal Residues in the Human Acetylcholinesterase Active Centre Allows for Versatile Interaction Modes with Inhibitors. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.
- Armstrong J. M., Myers D. V., Verpoorte J. A., Edsall J. T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem*, 214, 5137-5149.
- Arslan, O., “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlarının Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- Aydoğan, S., “Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant CAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin inhibitörlere Karşı ilgisinin Araştırılması”, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (2006).
- Bahaguna, R., P. and Jangwan, J.S. *Fitoterapia*. 1987; 48-140.
- Barthe GA., Jourdan PS., McIntosh CA. and Mansell RL. *J. Plant Physiol.* 1987; 127-55.
- Batirov E. Kh., Yusupova SS., Sattikulov, A., Vdovin AD., Malikov VM. and Yagudaev MR. *Chem. Not. Compds.* 1987; 22-107.
- Bayrak A (2006) *Gıda Aromaları*. 32. yayın, Gıda Teknolojisi Derneği, Baran Ofset Matbaacılık, 497 s.

- Bayram E, Senturk M, Kufrevioglu OI, Supuran CT. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008; 16: 9101-9105.
- Bilaloglu GV, Harmandar M., *Flavonoidler İstanbul; Aktif Yayıncılık*. 6-10
- Bohm BA., Fong G., Hiebert M., Jamal A. and Crins WS. *Phytochemistry*. 1992; 31-1261.
- Boriack-Sjodin P. A., Heck R. W., Laipis P. J., Silverman D. N., Christianson D.W., 1995. Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution, implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10949-10953.
- Borkowski B., Krug H. and Wrocinski *Biol. Inst. Rosl.* 1960; 6-18.
- Bors W. And Saran M., Free Radical. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Res. Commun.* 1987; 289-294.
- 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.
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72-248 (1976).
- Broussalis AM., Ferraro GE., Gurni A. and Coussio JD. *Biochem. Syst. Ecol.* 1998 ; 16-401.
- Broussalis, AM, Ferraro GE., Gurni A. and Coussio, JD. *Biochem. Syst. Ecol.* 1988; 16- 401.
- 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., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi M., Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4- thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10: 2561 (2002).

- Chandra S. and Sastry MS. Indian. J. Pharm.Sci. 1988; 50-321.
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., “In the Carbonic Anhydrase New Horizons”, Birkhauser Verlag, Basel, 343 (2000).
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., The Carbonic Anhydrases-New Horizons., Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly,W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed, , McGraw-Hill, Inc., NewYork, 2165–2204 (2000).
- Chen C, Pearson A M and Gray J I (1992) Effects of Synthetic Antioxidants (BHA, BHT and PG) on The Mutagenicity of IQ-Like Compounds. Food Chem., 43:177– 183.
- Chol S P (2005) Stability and Quality of Fish Oil During Typical Domestic Application. Final Project, The United Nations University, Fisheries Training Programme, 23 p.
- Choong Y M and Lin H J (2001) Gas Chromatographic Determination of Synthetic Antioxidants in Edible Fats and Oils-A Simple Methylation Method. J. Food Drug Anal., 9: 20-26.
- Colovic, MB., Krstic D.Z., Lazarevic P., Tamara D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). AcetylcholinesteraseInhibitors: Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology, 11 (3), 315–335.
- Cottele N., Bernier JL., Henichart JP. Catteav, J.P., Gaydou, E. And Wallet, J.C. 1992; 13-211.
- Çakmakçı S ve Çelik I (2000) Gıda Katkı Maddeleri. Ders Notu, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum, 249 s.
- Çöllü Z (2007) Urtica Pilulifera L. Bitkisinin Antioksidant Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 61 s.
- Davidovic PM. and Klosterman GF. Arch. Dermatol. Und Syshillis. 1954; 199-10.
- Demirdag R, Comakli V, Senturk M, Ekinci D, Kufrevioglu OI, Supuran CT. Characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfonamides on enzyme activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2013; 21: (6) 1522-1525.
- Deschner E. E. Ruperto, J.,Wong, G.,Newmark HL., Carcinogenesis. 1991; 7-1193

- Devlin, T.M., 2002. Biochemistry with clinical correlations. 5th Ed., Wiley-Liss Inc. , New York.
- Dimitrios B (2006) Sources of Natural Phenolic Antioxidants. Trends Food Sci. Tech., 17: 505-512.
- Durak I, Biri H, Devrim E, Sözen S, Avcı A. Aqueous Extract of Urtica Dioica Makes Significant Inhibition on Adenosine Deaminase Activity in Prostate Tissue from Patients. Cancer Biology & Therapy 2004; 3: 9,855-857
- Edin K, Fida-Lassang N and Schmaltz L (2010) Determination of Butylated Hydroxytoluene in Chewing Gum Using GC-MS. Concordia College Journal of Analytical Chemistry, 1: 14-18.
- Efsa (2011) Scientific Opinion on The Re-Evaluation of Butylated Hydroxyanisole-BHA (E 320) as A Food Additive. Efsa. J., 9: 2392.
- Efsa (2012) Scientific Opinion on The Re-Evaluation of Butylated Hydroxytoluene BHT (E 321) as A Food Additive. Efsa. J., 10: 2588.
- Egger K. and Tissut M. CR. Acad. Sci. 1968; 267-1329.
- Eken S (2007) Bazı Materyallerde Antioksidan Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul. 84 s.
- Ekinci D, Karagoz L, Ekinci D, Senturk M, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoid. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2013; 28: (2) 283-288.
- Eröztürk N (2000) Bir Yudum Sağlık. Anahtar Yayınları, İstanbul, 415 s.
- Feldstein, J.B., Silvarman D.N., Purufication and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J. Biol. Chem, 259(9): 5447-53 (1984).
- Fraga C.G., Martino VS., Ferrero GE. Coussio JD. and Boveris A. Bioghem. Pharmacol. 1987; 36-717.
- Frankel EN., Kanner J., German JB., Parks E. and Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet, 1993; 341-454.

- Hall, G. E. and Schraer, R., Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Phys, 75B:81-92(1983).
- Hanasaki Y., Oqawa S. and Fukui S. ,Free Radical Biol. Med. 1994; 16-845.
- Harborne, J. B., and Mabry, T. J. (Eds.) The Flavonoids: Advances in Research, Chapman and Hall; London: 1982.
- Harel, M., Schalk I., Ehret, L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen PH., Silman I.(1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (19),9031–5.
- Hertog MGL., Fesrens EJM., Hollman PCH., Katan MB. And Kromhout D. Lancet. 1993; 342-1007.
- Hewett-Emmett, D., In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29: 78 (2000).
- Hikino H. and Kiso Y., Economic and Medicinal Plant Research, Ed. By Wagner, H., Hikino, H., and Farnsworth N.R., Academic Press, London, 1988; Vol.2, Chapter 39, 698.
- Hilvo M., Tolvanen M., Clark A., Shen B. R., Shah G. N., Waheed A., Halmi P., Hannen M., Hamalainen J. M., Vihinen M., Sly W. S., Parkkila S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase, Biochemical Journal, 392, 83-92.
- Holmes, R., S., “Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues”, Eur. J. Biochem., 78: 511 (1997).
- Huang M.T., Wood AW, Newmark H.L., Sayer J.M., Yagi H., Jerinha D.M., Conney A.H. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. Carcinogenesis. 1983; 4-1631.
- Isık S, Vullo D, Durdagi S, Ekinici D, Senturk M, Cetin A, Senturk E, Supuran CT. Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015; 25: (23) 5636-5641.

- Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetate", *Arch. Biochem. Biophys.*, 238: 170 (1989).
- Javanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjonovic B. and Simic M.G., *J. Am. Chem. Soc.* 1994;116-4846
- Javanovic SV., Jankovic I. and Josimovic LJ. *Am. Chem. Soc.* 1992; 114-9018
- Jeney E. and Uri; J. *Die Pharmazie* 1954; 9- 553.
- Kahkönen M P, Hopia A I, Vuorela H J, Rauha J P, Pihlaja K, Kujala T S and Heinonen M (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. of Agr. Food Chem.*, 47: 3954-3962.
- Kaiser, E. T., and Lo, K. W., "The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic salt", *J. Am. Chem. Soc.*, 91: 4912 (1969).
- Kaitaranta J K (1992) Control of Lipid Oxidation in Fish Oil with Various Antioxidative Compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 810-813.
- Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T. Inhibition of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*. 1983; 4(10):1301-5
- Kaur C and Kapoor H C (2001) Antioxidants in Fruits and Vegetables—The Millennium's Health. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 36: 703–725.
- Keilin, D., Martin, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C., A left handed β -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. *EMBO*, 15: 2323-2330 (1996).
- Klouché K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud J J and Cristol J P (2004) Mechanism of In Vitro Heme-Induced LDL Oxidation: Effects of Antioxidants. *Eur. J. Clin. Invest.*, 34: 619-25.
- Krinsky N I (1992) Mechanism of Action of Biological Antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 200: 248-254.

- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., and Krungkrai, J., Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31: 661-668 (2001).
- Laemmli, D.K., Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 (1970).
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., 2005. *Principles of Biochemistry*, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Lesburg, C. A., and Christianson, D. W., X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117:6368- 6844 (1995).
- Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H., and Xue, Y., Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219: 1-10 (1994).
- Lindskog S., Coleman J.E., 1973. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Proc. Nat.Acad. Sci. USA*, 70(9), 2505-2508.
- Lindskog S., Silverman D. W., 2000. In the *Carbonic Anhydrase-New Horizons*, Basel, 175-196.
- Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *vPharmacol. Ther*, 74 (1997).
- Lindskog, S., Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem*, 4. bs, 115-170 (1982).
- Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., "Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8", *Genomics*, 10 (4): 882 (1991).
- Mangani, S., and Hakansson, K ., Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur. J. Biochem.* 210: 867-871 (1992) .
- Marco JA., Sanz JF., Bea JF. and Barbera O. *Pharmazie*. 1990; (45) 382.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280 (1): 98-104 (1997).

- Maren T. H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130, 26-29.
- Marmesat S, Morales A, Velasco J and Dobarganes M C (2010) Action and Fate of Natural and Synthetic Antioxidants During Frying. *Grasas Aceites*, 61: 333-340.
- Meldrum, N.N., Roughton, F.J.F., 1933. Carbonic Anhydrase, Its preparation and properties. *Nature*, 80, 113-142.
- Merikli, A.H., Damdyan, B. and Cubukcu, B. *Sci. Pharm.* 1986; 54- 363.
- Miller H E, Rigelhof L M, Prakash A and Kanter M A (2000) Antioxidant Content of Whole Grain Breakfast Cereals, Fruits and Vegetables. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:312- 319.
- Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajan S.K., "Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function", *J. Biosci*, 23 (3): 235 (1998).
- Moroney NA., Alcanaz MJ., Forder RA., Carey F., Hoult JRS. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988; 40-787.
- Nagai T, Myoda T and Nagashima T (2005) Antioxidative Activities of Water Extract and Ethanol Extract from Field Horsetail (*Tsukushi*) *Equisetum Arvense*. *Food Chem.*, 91: 389-394.
- Namiki M., Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 1990; 20-273.
- Nawar W W (1985) Lipids. In *Food Chemistry*, (7th ed.) Fennema O R (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp.139-244.
- Negre-Salvayre A., Alomar Y., Troly M. and Salvayre R. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1096-291.
- Nishimori, I., Catalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 24-43 (2004).
- Nune A. Andreasyan, Hripsime L. Hairapetyan, Yelizaveta G. Sargisova, Sona S. Mardanyan. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. H. Buniatian Institute of Biochemistry 2004.

- Ogawa S., Hirayama T., Nohara M., Tokuda M., Hirai K. and Fukui S. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo[alpha]pyrene in Salmonella typhimurium strains. *Mutat. Res.* 1985; 142(3):103-7
- Ordentlich, A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of the Biological Chemistry*, 268 (23), 17083–95.
- Öner Y, Tuz U and Güleç S (2004) Besinlerdeki Antioksidan Maddeler ve Genel Tayin Yöntemleri. Bitirme Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul, 52 s.
- Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz _zozenzimlerinin Saflastırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması” Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2002).
- Pascual Teresa J., Gonzales MS., Muriel MR., Arocha AD. And Bellido IS. *J. Nat. Prod.* 1986; 49-177.
- Payan A (2007) Üzüm Meyvesi ve Çekirdeğinden Antioksidan Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, 66 s.
- Pinchuk I and Lichtenberg D (2002) The Mechanism of Action of Antioxidants Against Lipoprotein Peroxidation, Evaluation Based on Kinetic Experiments. *Prog. Lipid Res.*, 41: 279-314.
- Pohanka (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc*, 155 (3), 219–229.
- Pohanka, M.(2012). Acetylcholinesterase inhibitors; a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22 (8), 871–886.
- Pokorny J (2007) Are Natural Antioxidants Better and Safer than Synthetic Antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 109: 629-642.
- Pokorny J and Korczak J (2001) Antioxidants in Food: Practical Application. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, pp. 311-341.

- Pratt DE. and Hudson B.J.F. In Food Antioxidants; Hudson B.J.F., Ed.; Elsevier. 1990; London, 171.
- Pratt DE. and Hudson B.J.F. In Food Antioxidants, Hudson, B.J.F., Ed.; Elsevier. 1990; London, 171.
- Ren, X.L., Lindskog, S., Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120 (1): 81-86 (1992).
- Renaud S., and De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339-1523.
- Robbins RC. *J.clin.pharm.* 1973; 13-401.
- Roughton, F. J. W., and Booth, V. H., The Effect of substrate concentration, Ph and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* (40) : 319 (1946).
- Ruch R.J., Cheng S.J. and Klaunig J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 1989; 10-1003.
- Ruş A.F. and Kulikov A.A. *Trudi Alt. S.* 1971; 23-32.
- Ruzsnyak S. and Szent-Gyorgy A. *Nature*. 1936; 138-27.
- Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., "localization of Carbonic Anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture", *J. Appl. Physiol.*, 53: 914 (1982).
- Saito H and Nakamura K (1990) Antioxidative Effect of Sesamol on Fish Oil Oxidation. *Nippon Suisan Gakk.*, 56:1893.
- Sapko O.A., Kuaeva R.M. and Ryakhovskaya T.V., *Khim. Prir. Soedin.* 1988 ; (6), 873.
- Segel, I.H. , *Biochemical Calculations*, Inc, New York, 403 (1968).
- Selmi S and Sadok S (2008) The Effect of Natural Antioxidant (*Thymus Vulgaris* Linnaeus) on Flesh Quality of Tuna (*Thunnus Thynnus* (Linnaeus)) During Chilled Storage. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 36-45.
- Senturk M, Gulcin I, Dastan A, Kufrevioglu O.I, Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibitor of human erythrocyte I and II isoenzymes with

- antioxidant phenolic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009; 17: 3207-3211.
- Serdaroğlu M and Felekoğlu E (2005) Effects of Using Rosemary Extract and Onion Juice on Oxidative Stability of Sardine (*Sardina Pilchardus*) Mince. *J. Food Quality*, 28: 109-120.
- Shahidi F (1996) *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*. AOCS Press, Champaign-Illinois, pp. 209.
- Sikora E, Cieslik E and Topolska K (2008) The Sources of Natural Antioxidants. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 7: 5-17.
- Silva A M and Santana L S (2008) Effects of Pretreatment with Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) in The Prevention of Lipid Oxidation in Salted Tilapia Fillets. *J. Food Quality*, 31: 586-595.
- Sly, W.S., Hu, P.Y., Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 375-401 ,(1995).
- Sly, W.S., Hu, P.Y., Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 375-401 ,(1995).
- Sugrue, M.F., Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1): 87-112, (2000).
- Suh H J, Chung M S, Cho Y H, Kim J W, Kim D H and Han K W (2005) Estimated Daily Intakes of Butylated Hydroxyanisole (BHA), Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Tert-Butyl Hydroquinone (TBHQ) Antioxidants in Korea. *Food Addit. Contam.*, 22: 1176-1188.
- Supuran, C.T., “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications cfor inhibitors and activators” *Rev.7*, February , 1: 14, (2008).
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1.bs., 61-97 ,(2001).
- Supuran, C.T., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert OpinInvestig Drugs*, 12.bs., 283,287 ,(2003).
- Supuran, C.T., Innocenti, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A., Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem* , 4. bs., 189-200, (2004).

- Sussman, J.L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from Torpedo Californica: A Prototypic Asetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Şenturk, H., D. Özdes, A. Gundogdu, C. Duran, M. Soylak. Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto organomodified Tirebolu bentonite: equilibrium, kinetic and thermodynamic study, *J. Hazard. Mater.*, 172 (2009), pp. 353-362
- Tanrisever N., Franczek FR., Fischer NH. and Williamson GB. *Phytochemistry*. 1987; 26-175.
- Taylor, D., Paton C., Shitij K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Terao J., Piskuli M. and Yao Q. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 308- 278.
- Tougu, V. (2001). *Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155–170.
- Tozer K N (2001) *Quality Improvement and Shelf-Life Extension of Fish Filets from Three Aquaculture Species. Master Thesis, The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph, Canada*, 113 pp.
- Tozlu, İ., Eritrositlerinden Afinit Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van, (1997).
- Tripathi J. and Joshi, T. *Planta Med.* 1988; 54-371.
- Tripathi. A. (2008). *Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. Annals of Neuroscience* 15 (4).
- Tsujimoto Y., Hashizuma H. and Yamazaki M., *Int. J. Biochem.* 1993; 25-491.
- Turhan S and Üstün N Ş (2006) *Doğal Antioksidanlar ve Gıdalarda Kullanımları. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu*, s. 273-276.
- Turhan S, Sağır I and Temiz H (2009) *Oxidative Stability of Brined Anchovies (Engraulis Encrasicholus) with Plant Extracts. Int. J. Food Sci. Tech.*, 44: 386-393.

- Türk Gıda Kodeksi (2011) Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete.
- Vareltzis K, Koufidis D, Gavriilidou E, Papavergou E and Vasiliadou S (1997) Effectiveness of a Natural Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) Extract on The Stability of Filleted and Minced Fish During Frozen Storage. *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 205: 93-96.
- Venkatesh R and Sood D (2011) A Review of The Physiological Implications of Antioxidants in Food. Interactive Qualifying Project Report, Worcester Polytechnic Institute, 72 p.
- Verma A.K., Johnson J.A., Gould M.N., Tanner MA. Cancer Res. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. 1988; 48- 5754.
- Verma KS., Jain AK., Nagar A. and Gupto SR. Macrocarposide, a New Isoflavanone C-Glucoside from *Pterocarpus macrocarpus* Heart Wood. *Planta Med.* 1986; 52-315.
- Vlaskouska M., Drenska D., Ovcharov, R. *Probl. Vutr, Med.* 1990; 18-3.
- Wagner H., Elbi G., Lotter, H. and Guinea, N. *Pharm. Pharnacol.* 1991; 1-15.
- Wanasundara P K P D and Shahidi F (2005) Antioxidants: Science, Technology and Applications. Shahidi F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects.* Wiley-Interscience, 6. ed.
- Wang CL., Zhang RY., Han YS., Dong XG. and Liu WB. Chemical studies of coumarins from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Yao xue Xue bao.* 1991; 26-147.
- Wardman P., *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1989; 18- 1637.
- Whittaker, V.(1990).The Contribution of Drugs and Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8–13.
- Wilbur, K.M., and Anderson, N.G.,. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 176: 147-154, (1948).
- Wistrand, P. J., “The Importance of Carbonic Anhydrase B and C for the Unloading of CO₂ by the Human Erythrocyte”, *Acta Physiol. Scand.*, 343 ,(1981).

- Wistrand, P.J., "Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase", J. Med. Sci., 75-85 ,(1980).
- Xadjay YAI.), Farmakol. , toksikol. 1972; 7-46.
- YagiA., Vemura T., OkamuraN., Haraguchi T., ImotoT. And Hashimota K. Phitochemistry. 1994; 35-885.
- Yasin N M N and Abou-Taleb M (2007) Antioxidant and Antimicrobial Effects of Marjoram and Thyme in Coated Refrigerated Semi Fried Mullet Fish Fillets. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2: 01-09.
- Yavaşer R (2011) Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 104 s.
- Yerlikaya P (2008) Bazı Bitki Ekstraktlarının Dondurulmuş Palamut Balığı (Sarda Sarda) Filetolarının Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Niteliklerine Etkisinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya.
- Yuting C., Rongliana Z., Zhongjian J. and Yong, J. Free Radical. Biol. Med. 1990; 9-19.
- Zhov Y.C. and Zheng R.L., Biochem.Pharmacol. 1991; 42-1177.
- Zhu W, et al. (2002) Evidence that the pre-mRNA splicing factor Clf1p plays a role in DNA replication in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 160(4):1319-33
- Zimmerman, S. A., Ferry, J.G., Supuran, C.T., "Inhibition of the Archaeal Beta-Class (Cab) and Gamma-Class (Cam) Carbonic Anhydrases." Curr Top Med. Chem.,. 7 (9): 901, (2007).

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Samsun Kavak'ta Doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kavak'ta, liseyi Ladik'te tamamladı. 2000-2001 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi'nde 1 yıl fizik bölümü okudu. 2009 yılında Cumhuriyet Üniversitesi kimya bölümünden mezun oldu 2010-2011 eğitim öğretim yılında Atatürk Üniversitesi kimya bölümünde formasyon eğitimini tamamladı. 2014-2015 eğitim öğretim yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Evli ve iki çocuk annesidir.