



**BAZI LİKEN METABOLİTLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Kader ÇETİN ÇAKMAK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

BAZI LİKEN METABOLİTLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Kader ÇETİN ÇAKMAK

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

BAZI LİKEN METABOLİTLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Kader ÇETİN ÇAKMAK tarafından hazırlanan bu çalışma **18/08/2017** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. Burhan ATEŞ

İmza

Üye : Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **21/09/2017** tarih ve **37/83** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI LİKEN METABOLİTLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Kader ÇETİN ÇAKMAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu tezde bazı likenlerin sekonder metaboliti olan usnik asit, vulpinik asit ve psoromik asitin insan eritrositi hCA-I ve hCA-II ile asetilkolin esterase ve bütirilkolin esterase enzimleri üzerine inhibisyon etkileri *in vitro* olarak araştırıldı. İnsan eritrositinden Sepharose-4B-L-tirozin afinite kolon kromatografisi ile elde edilen hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Bileşiklerin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri esterase aktivite yöntemiyle araştırıldı ve her bir madde için IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı. Usnik asitin IC₅₀ ve K_i değerleri hCA-I, hCA-II, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz için sırasıyla 2,675, 2,133; 6,728, 5,900; 1,273, 0,239; 3,397, 1,425 nM; vulpinik asitin IC₅₀ ve K_i değerleri hCA-I, hCA-II, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri için sırasıyla 2,566, 1,246; 7,000, 4,560; 0,958, 0,227; 3,766, 1,302 nM; psoromik asitin IC₅₀ ve K_i değerleri hCA-I, hCA-II, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz için sırasıyla 4,985, 2,833; 11,550, 14,230; 0,742, 0,122; 3,315, 2,079 nM olarak hesaplandı. Çalışmada usnik asit, vulpinik asit ve psoromik asitin antioksidan aktiviteleri ve radikal giderme kapasiteleri değerlendirildi. Bu amaçla FRAP metodu, Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi, DPPH· giderme, ABTS⁺ giderme, DMPD⁺ giderme ve süperoksit anyon radikalini (O₂^{·-}) giderme aktiviteleri bipiridil reaktifi ile ferröz iyonları (Fe²⁺) şelatlama aktivitesi çalışıldı. Çalışmada ayrıca standart antioksidanlar BHA, BHT, troloks ve α-tokoferol referans madde olarak kullanıldı.

2017, 132 sayfa

Anahtar Kelimeler: Usnik Asit, Vulpinik Asit, Psoromik Asit, Karbonik anhidraz, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, Antioksidan aktivite, Radikal giderme

ABSTRACT

Ph. D Thesis

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME LICHEN METABOLITES

Kader ÇETİN ÇAKMAK

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In this thesis, *in vitro* inhibitory effects of usnic acid, vulpinic acid and psoromic acid which are secondary metabolite of the some lichens were investigated on the human erythrocyte hCA-I and hCA-II, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. SDS-PAGE was performed to determine the purity of hCA-I and hCA-II isoenzymes obtained by Sepharose-4B-L-tyrosine affinity column chromatography from human erythrocytes and single band was observed. The inhibitory effects of the compounds on hCA-I and hCA-II isoenzymes, the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes were investigated by the esterase activity method and IC₅₀ and Ki values were calculated for each substance. The IC₅₀ and Ki values of Usnic acid were calculated for hCA-I, hCA-II, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase respectively as 2.675, 2.133; 6.728, 5.900; 1.273, 0.239; 3.397, 1.425 nM; The IC₅₀ and Ki values of Vulpinic acid were calculated for hCA-I, hCA-II, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase respectively as 2.566, 1.246; 7.000, 4.560; 0.958, 0.227; 3.766, 1.302 nM; The IC₅₀ and Ki values of Psoromic acid were calculated for hCA-I, hCA-II, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase respectively as 4.985, 2.833; 11.550, 14.230; 0.742, 0.122; 3.315, 2.079 nM. In the study antioxidant and radical elimination capacities of usnic acid, vulpinic acid and psoromic acid were evaluated. For this purpose, the FRAP method, Fe³⁺-Fe²⁺ reduction capacity, cupric ions (Cu²⁺) reduction capacity by cuprac method, DPPH· removal, ABTS^{•+} removal, DMPD^{•+} removal and superoxide anion radical (O₂^{•-}) removal activities and ferrous ions (Fe²⁺) chelating activity by bipyridyl reactifie were measured by was studied. In the study standard antioxidants BHA, BHT, trolox and α-tocopherol were also used as reference substances.

2017, 132 pages

Keywords: Usnic acid, Vulpinic acid, Psoromic Acid, Carbonic anhydrase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Antioxidant activity, Radical scavenging

TEŞEKKÜR

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

Öncelikle çalışmalarında her zaman geniş hoşgörü anlayışıyla, bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Türkiye Bilimler Akademisi Üyesi olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

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

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Doç. Dr. Hülya GÖÇER AKINCIOĞLU, Dilek TEKE, Parham TASLİMİ, Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL, Yrd. Doç. Dr. Fevzi TOPAL ve Yeliz DEMİR olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma,

Ayrıca ömrüm boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Anneme, bana her zaman destek olan eşime, neşe kaynağım oğluma ve değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Tuba AYDIN' a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu doktora tezi, rahmetli babama ithaf olunur.

Kader ÇETİN ÇAKMAK

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Karbonik Anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1).....	3
1.3. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE, E.C. 3.1.1.7).....	8
1.4. Bütilkolinesteraz Enzimi (BChE, E.C. 3.1.1.8)	12
1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri	13
1.6. Oksidatif Stres	15
1.7. Antioksidanlar	17
1.8. Doğal Antioksidanlar	19
1.9. Sentetik Antioksidanlar	30
1.10. Antioksidanların Etkisi.....	31
1.11. Likenler	34
1.12. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler	36
1.13. Usnik Asit.....	36
1.14. Vulpinik Asit	39
1.15. Psoromik Asit	39
1.16. Araştırmanın Amacı ve Önemi.....	40
2. KAYNAK ÖZETLERİ	41
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	46
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	46
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	47

3.2. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enziminin Saflaştırılması İçin	
Kullanılacak Kanın Temini	53
3.3. İnsan Karbonik Anhidraz (hCA I ve II) Enzim Saflaştırma Çalışmaları	53
3.3.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması	53
3.3.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar	54
3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini	56
3.4.1. Hidrataz aktivitesi.....	56
3.4.2. Esteraz aktivitesi.....	57
3.5. Protein Tayini	58
3.5.1. Kalitatif protein tayini	58
3.5.2. Kantitatif protein tayini	59
3.6. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar.....	59
3.6.1. CA için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	59
3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzim Saflığının Kontrolü	60
3.8. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik	
Asitin Etkilerinin Belirlenmesi.....	60
3.9. Antioksidan Çalışmaları	60
3.9.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme (FRAP metodu)	60
3.9.2. Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme	61
3.9.3. FRAP indirgeme.....	61
3.9.4. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali	
giderme.....	61
3.9.5. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikal giderme	62
3.9.6. N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme	62
3.9.7. Süperoksit anyon radikali (O_2^-) giderme	63
3.9.8. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe^{2+}) şelatlama.....	63
3.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik	
Asitin Etkilerinin Belirlenmesi	63
3.11. Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik	
Asitin Etkilerinin Belirlenmesi	65
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	66
4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	66

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	66
4.1.2. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları	66
4.1.3. hCA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları	67
4.1.4. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları	68
4.1.5. hCA I izoenziminin esterase aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid bileşikleriyle ilgili sonuçları	69
4.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları	78
4.3. Bütirikolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları	83
4.4. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	87
4.4.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvveti bulguları	87
4.4.2. Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular	89
4.4.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları	90
4.4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları	91
4.4.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları	93
4.4.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları	95
4.4.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları	97
4.4.8. Metal şelatlama bulguları	98
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	99
KAYNAKLAR	120
ÖZGEÇMİŞ	133

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz enzimi
BCh	Bütirilkolin
BChE	Bütirilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ^{•+}	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit)
E.C.	Enzim komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EÜ	Enzim Ünitesi
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Enzimin maksimum hızını yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrant konsntrasyonu
NBT	Nitroblue tetrazolium
PER	Amonyum persülfat
ROS	Serbest oksijen radikali
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin

Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	Enzimatik reaksiyon hızı
$V_{\max}$	Maksimum hız



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	4
Şekil 1.2. Üç histidin ligandı (His 94, His 96 ve His 119, yeşil renkli) tarafından koordine edilen Zn(II) iyonu + proton mekik kalıntısı His 64 + katalitik çevrim ve substratların/inhibitörlerin bağlanması için önemli diğer kalıntılar (His 67, His 200, His 243 ve Asp 4 gibi).....	5
Şekil 1.3. Karbonikanhidrazın inhibisyon ve katalitik mekanizması	6
Şekil 1.4. İnsan α -CAs süperfamilyasının katalitik olarak aktif subselüler lokalizasyonu ve domein kompozisyonun şematik gösterimi	7
Şekil 1.5. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) tarafından asetilkolinin (ACh), kolin (Ch) ve asetata hidroliz mekanizması.	9
Şekil 1.6. Asetilkolinesteraz enziminin sinir hücrelerindeki fonksiyonu	10
Şekil 1.7. Yaygın olarak kullanılan takrin, rivastigmin, galantamine ve donepezil gibi AChE inhibitörleri.....	12
Şekil 1.8. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması	20
Şekil 1.9. Dehidroaskorbat oksidazı ile dehidroaskorbatın askorbik aside enzimatik dönüşümü	20
Şekil 1.10. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması.....	22
Şekil 1.11. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması.....	25
Şekil 1.12. β -karoten, likopen, lutein, β -sirotoksantin, zeaksantin ve astaksantin gibi bazı karotenoid pigmentlerin sırasıyla kimyasal yapısı	29
Şekil 1.13. Kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlar.....	30
Şekil 1.14. Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) yağ asidi otooksidasyonu engelleme mekanizması.....	32
Şekil 1.15. (+)-Usnik asitin açık yapısı.....	37
Şekil 1.16. Vulpinik asitin açık yapısı	39
Şekil 1.17. Psoromik asitin açık yapısı	40
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	55
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	57

Şekil 3.3. Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayini	64
Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik	66
Şekil 4.2. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin sırasıyla 1M NaCl / 25 mM Na ₂ HPO ₄ pH: 6,3 ve 0,1 M NaCH ₃ COO / 0,5 M NaClO ₄ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği	67
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı	68
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği	69
Şekil 4.5. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	70
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği	70
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	71
Şekil 4.8. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği	71
Şekil 4.9. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	72
Şekil 4.10. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği	72
Şekil 4.11. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	73
Şekil 4.12. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği	74
Şekil 4.13. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	74

Şekil 4.14. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği ...	75
Şekil 4.15. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği	76
Şekil 4.17. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..	76
Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Asetazolamid Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği.....	77
Şekil 4.19. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..	77
Şekil 4.20. Asetilkolin esteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği	79
Şekil 4.21. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 4.22. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği	80
Şekil 4.23. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.24. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği.....	81
Şekil 4.25. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	81

Şekil 4.26. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği	82
Şekil 4.27. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	82
Şekil 4.28. Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman yöntemiyle ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği	83
Şekil 4.29. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	84
Şekil 4.30. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği	84
Şekil 4.31. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	85
Şekil 4.32. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği.....	85
Şekil 4.33. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	86
Şekil 4.34. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği	86
Şekil 4.35. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	87
Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	88
Şekil 4.37. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	89

Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	91
Şekil 4.39. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği	92
Şekil 4.40. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	92
Şekil 4.41. ABTS ^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS ^{•+} için hazırlanan standart grafik.....	94
Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlardaki Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin (10-30 $\mu\text{g/mL}$) ABTS ^{•+} giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması	94
Şekil 4.43. DMPD ^{•+} giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....	95
Şekil 4.44. Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki DMPD ^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırması	96
Şekil 4.45. Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit'in çözeltilerinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol, troloks, Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit ile karşılaştırması.....	97
Şekil 4.46. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 $\mu\text{g/mL}$) Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit'in bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan EDTA, BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....	98
Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna Usnik asitin muhtemel bağlanma modeli	102
Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna psoromik asitin muhtemel bağlanma modeli.....	102
Şekil 5.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna vulpinik asitin muhtemel bağlanma modeli.....	103
Şekil 5.4. Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesi.....	108

Şekil 5.5. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu.....	110
Şekil 5.6. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi	113
Şekil 5.7. ABTS radikalının ($ABTS^{\cdot+}$) oluşumu	114
Şekil 5.8. $DMPD^+$ radikalının oluşum ve giderilmesi.....	115
Şekil 5.9. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT^{2+} 'yi formazana indirgem reaksiyonu (.....	116



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve serbest olmayan radikal türleri.....	14
Çizelge 1.2. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması	21
Çizelge 1.3. Flavonoidlerin molekül yapıları (Gülçin 2012).....	23
Çizelge 1.4. Fenolik asitlerin benzoik asit ve sinamik asit türevleri olarak sınırlandırılması	27
Çizelge 1.5. Sentetik ve doğal antioksidanların avantajları ve dezavantajları.....	31
Çizelge 3.1. Esteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği	58
Çizelge 3.2. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği	64
Çizelge 3.3. Bütirilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği	65
Çizelge 4.1. Afinite kolonu yardımıyla insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	68
Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit ve Asetazolamid'in K_i değeri ve inhibisyon türleri	73
Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit ve Asetazolamid'in K_i değerleri ve inhibisyon türleri	78
Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri	83
Çizelge 4.5. Bütirilkolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri	87
Çizelge 4.6. 20 µg/mL konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını	

indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları	90
Çizelge 4.7. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH $\cdot$, ABTS $^{+\cdot}$, DMPD $^{+\cdot}$ radikali giderme IC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ...	96
Çizelge 5.1. hCA I ve II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid'in IC ₅₀ ve Ki değerleri.....	103
Çizelge 5.2. Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in IC ₅₀ ve K _i değerleri.....	105
Çizelge 5.3. 20 μ g/mL konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe ³⁺) ve kuprik (Cu ²⁺) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları	108
Çizelge 5.4. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH $\cdot$, ABTS $^{+\cdot}$, DMPD $^{+\cdot}$ radikali giderme IC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması .	111

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler metabolizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına meydan vermeden %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenir ve canlı organizmalardaki kimyasal olayları hızlandırırlar (Keha and Küfrevioğlu 2012; Göçer *et al.* 2015a).

Enzimler hücre içerisinde sentezlenirler ve büyük çoğunluğu hücre içi amaçlar için kullanılır. Ancak pepsin, tripsin ve kimotripsin gibi bazı sindirim enzimleri, sindirime yardımcı olmak için sentezlendikleri hücre dışına salınarak etki gösterirler. Hücrede sentezlendikten sonra dışarı salınan sindirim enzimleri, sentezlendikleri hücreye zarar vermemeleri için “proenzim” veya “zimojen” denilen şekilde bulunurlar. Daha sonra zimojen aktifleşmesi mekanizması ile aktifleşerek kataliz olayını gerçekleştirirler (Keha and Küfrevioğlu 2012).

Enzimlerin hızına substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, iyonik şiddet, inhibitör, aktivatör konsantrasyonu ve varsa kofaktör konsantrasyonu gibi faktörler etki eder (Keha and Küfrevioğlu 2012).

Kimyasal yapıları farklı fakat katalizledikleri reaksiyonları aynı olan enzimlere “izoenzim” (izozim) denir. Aminoasit dizilimlerindeki farklılıklardan dolayı farklı fiziksel özelliklere sahip olabilirler (Champe *et al.* 2007). İzoenzimler Km gibi farklı kinetik parametrelere sahiptirler. Substratlara karşı ilgileri farklı, kofaktörler ve inhibitörleri farklıdır. (Göçer *et al.* 2015a).

Enzimler büyük, substratlar ise küçük moleküllerdir. Substrat enzime bağlandığında değişikliğe uğrayarak başka bir bileşiğe dönüşümünü sağlayan bir bölge vardır. Bu bölgeye “aktif bölge” denilmektedir. Aktif bölgede en az bir aminoasit özel bir rol

oynamaktadır (Keha and Küfrevioğlu 2012; Berg *et al.* 2014). Enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılır (Keha and Küfrevioğlu 2012);

- 1. Oksidoredüktazlar;** İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.
- 6. Ligazlar:** ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimlerle ilgili yapılan en önemli araştırmalardan biride enzimlerin inhibisyonudur. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin (hızlarının), bazı bileşikler tarafından azaltılması ve tamamen engellenmesi olayına inhibisyon denir. Buna sebep olan bileşiklere inhibitör adı verilir. İnhibisyon iki gruba ayrılır.

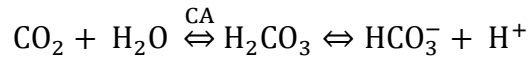
Geri dönüşümsüz inhibisyon: İnhibitör, enzimlere kovalent veya kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzime çok sıkı bağlandığı için enzimden çok zor ayrılır.

Geri dönüşümlü inhibisyon: İnhibitör, enzimlere kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Enzim inhibitör kompleksinin seyreltilmesi geri dönüşümlü bağlanan inhibitörün çözülmesiyle ve enzim aktivitesini yeniden kazanmasıyla sonuçlanır. Dönüşümlü inhibisyon çeşitleri; kompetitif (yarışmalı), nonkompetitif (yarışmasız), unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyonudur.

1. Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon: İnhibitörler, enzimin substratı ile yarış halindedirler ve enzimin aktif bölgesine bağlanırlar. Enzim substrata bağlanarak ES kompleksi veya enzim inhibitöre bağlanarak enzim inhibitör kompleksi (EI) oluşturur, fakat EİS (enzim- substrat-inhibitör) kompleksi oluşturmaz. Yarışmalı inhibitör, enzimin aktif bölgesine bağlandığı için substrat enzime bağlanamaz.
2. Nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyon: İnhibitör ve substrat, enzimin aktif bölgesine aynı anda bağlanmaz. Yarışmasız inhibitörün bağlanma bölgesi sadece enzim substrat kompleksi oluşuktan sonra açığa çıkar. Substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla da enzimin inhibisyonu engellenemez.
3. Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon: İnhibitor, serbest enzime veya enzim substrat kompleksine bağlanabilir (Berg *et al.* 2014).

1.2. Karbonik Anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1)

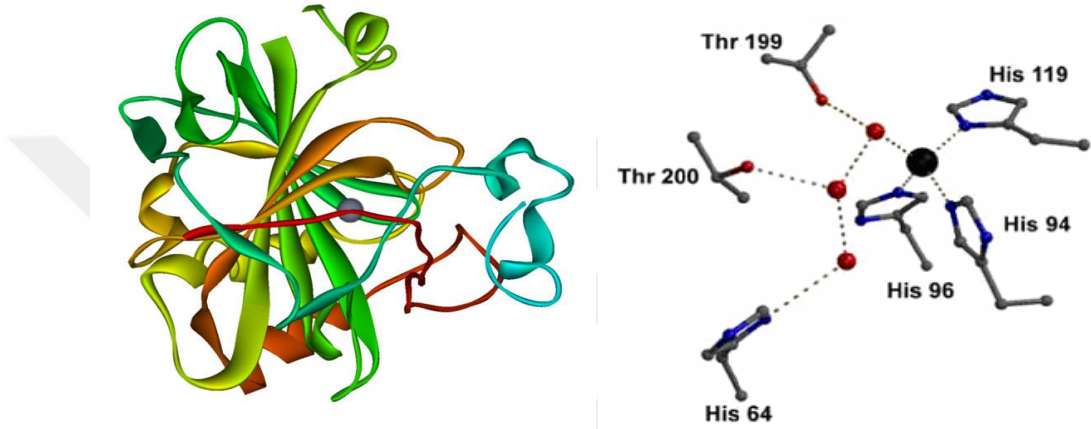
Karbonik anhidraz enzimi (CA; karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) CO₂'in hidrasyonunu, HCO₃⁻ ve H⁺'ın dehidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizler (Akıncioğlu *et al.* 2015).



Karbonik anhidraz enzimi karbondioksit ve bikarbonat iyonu ara çevriminde katalizör görevi yapar. Solunum ve sindirim dokuları ile akciğerlere CO₂ ve HCO₃⁻ taşınması, pH ve CO₂ vücut dengesini, çeşitli dokularda veya organlarda elektrolit salgısı, glukogenez, üre devri ve lipogenez gibi önemli biyokimyasal reaksiyonlar, kemik erimesi, kireçleme, tümörleşme ve diğer bir çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynar (Supuran and Scozzafava 2007).

Bu enziminin en önemli fonksiyonu, doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO₂'i, HCO₃⁻'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO₃⁻'in CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Göçer and Gülçin 2011).

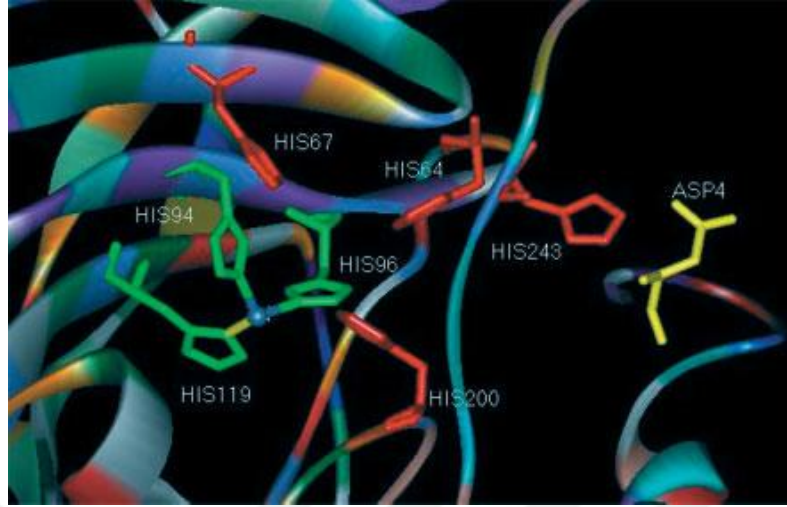
CA, 1932 yılında keşfedilmesinin ardından Zn^{2+} iyonu içerdiği ve katalitik aktive için çinko iyonunun gerekli olduğu bulunmuştur. Zn^{2+} iyonu; pozitif yükleri, kinetik olarak stabil ancak sağlam bağlar oluşturma yeteneği, bazı durumlarda birden fazla yükseltgenme halinde kararlı kalabilme kapasitesi sayesinde kimyasal aktiviteyi artırır (Berg *et al.* 2014).



Şekil 1.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96 ve His 119)

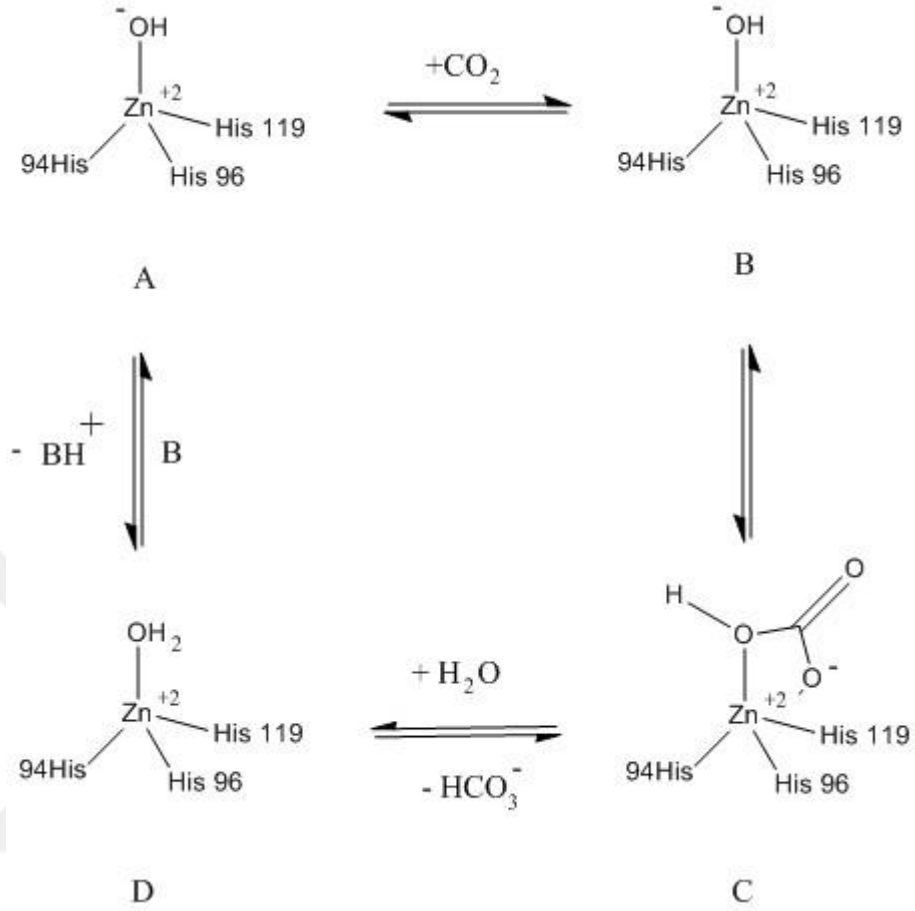
*Büyük küre Zn^{2+} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir (Göçer 2014)

Karbonikanhidraz enzimlerinin Zn^{2+} iyonu kataliz için elzemdir. X-ışını kristalografî verileri, 15 Å° derinliğindeki aktif yer yarığının dibinde bulunan metal iyonunun (Şekil 1.1.), üç histidin kalıntısı (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edilmekte olduğunu göstermiştir (Supuran *et al.* 2003).



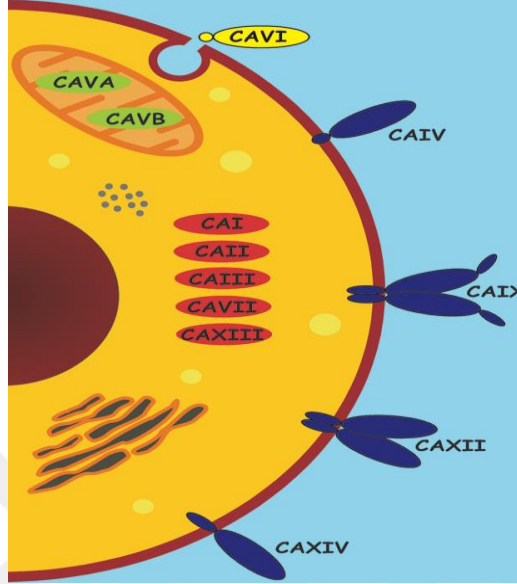
Şekil 1.2. Üç histidin ligandı (His 94, His 96 ve His 119, yeşil renkli) tarafından koordine edilen Zn(II) iyonu + proton mekik kalıntısı His 64 + katalitik çevrim ve substratların/inhibitörlerin bağlanması için önemli diğer kalıntılar (His 67, His 200, His 243 ve Asp 4 gibi)

Çinkoya-bağlı su Thr 199'un hidroksil parçasıyla hidrojen bağı etkileşimlerine de girer (buna karşılık olarak Thr 199 da Glu 106'nın karboksilat parçasına köprü yapar); bu etkileşimler çinkoya-bağlı su molekülünün nükleofilisitesini artırır ve substratı (CO_2) nükleofilik saldırı için elverişli bir konuma yönlendirir. Hidroksit iyonunun Zn^{2+} 'ye bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur. Bu güçlü nükleofil yakın çevresindeki bir hidrofobik cepte bağlı CO_2 molekülüne saldırır (yakalanması zor substat-bağlayıcı yer, insan izozimi CA II durumunda Val 121, Val 143 ve Leu 198 artıklarını içerir) ve bu durum Zn^{2+} 'ye koordine bikarbonat oluşumuna yol açar. Ardından bikarbonat iyonunun yeri bir su molekülü tarafından değiştirilir, çözeltiye serbest bırakılır ve bu durum su katalitik olarak inaktif olan Zn^{2+} 'ye koordine olacak şekilde enzimin asit formuna yol açar. Temel form A'yı yeniden üretmek için aktif yerden çevreye bir proton transfer reaksiyonu gerçekleşir ve buna ya aktif yer kalıntıları ya da ortamda bulunan tamponlar yardımcı olabilir (Supuran *et al.* 2003).



Şekil 1.3. Karbonikanhidrazın inhibisyon ve katalitik mekanizması (Supuran *et al.* 2003).

Bugüne kadar, CA'ları kodlayan alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), zeta (ζ), eta (η) ve teta (θ) olmak üzere yedi genetik ailenin bulunduğu ileri sürülmüştür (Koçyiğit *et al.* 2017). Bütün insan karbonik anhidraz enzimleri α -CA ailesine aittir ve farklı kinetik parametreleri, inhibe edici özellikleri, fonksiyonları ve lokalizasyonları olan on altı aktif üyeyi içerir. α -CA ailesi sitosolik (CA I, II, III, VII ve XIII), membrana-bağlı (CA IV, IX, XII, XIV ve XV), mitokondriyal (CA VA ve VB) ve salgısal (CA VI) formlarını içeren on altı izoforma bölünür. Üç sitosolik form, CA ile ilişkili proteinlerde (CARP) (CA VIII, X ve XI) tanımlanmıştır ve katalitik olmadıkları görülmüştür (Akıncioğlu *et al.* 2015).



Şekil 1.4. İnsan α -CAs süperfamilyasının katalitik olarak aktif subselüler lokalizasyonu ve domein kompozisyonun şematik gösterimi (Alterio *et al.* 2012)

CA I ve CA II izoenzimleri insan eritrositi, balık eritrositi, fare eritrositi, fare tükürüğü, sığır kemiği ve lökositleri, tükürük bezleri, kas, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, endometriel dokular, bakteri ve çeşitli bitki kaynaklarından saflaştırılabilirler. Memelilerde CA ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 30 KDa civarındadır. Bitkilerde CA kloroplastlarda, tilokoid membranında ve sitozolde bulunur (Göçer *et al.* 2015a).

CA inhibitörleri (CA I), genelde kanser, kemik erimesi ve glokokom hastalıklarının tedavisinde kullanılır ve aynı zamanda onlar obezite, idrar söktürücü, bulaşıcı hastalıklara karşı ilaçları olarak da kullanılır (Özbey *et al.* 2016) CA inhibitörleri (CA I), karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlanır ve onların aktivitesini azaltır. Sülfonamidler, izoesterler, dithiokarbamatlar, kumarinler, fenolikler ve poliaminler gibi birçok inhibitör sınıfı vardır. Sülfonamid türevleri özel ve potent karbonik anhidraz inhibitörleridir ve farmakolojik özellikleri, hazırlama

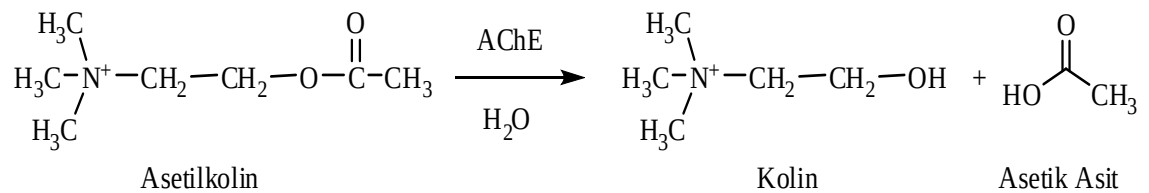
kolaylığı, stabilite ve uygulama kolaylığı nedeniyle halen çok fazla ilgi çekmektedirler (Akıncioğlu *et al.* 2015; Göçer *et al.* 2015b).

1.3. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE, E.C. 3.1.1.7)

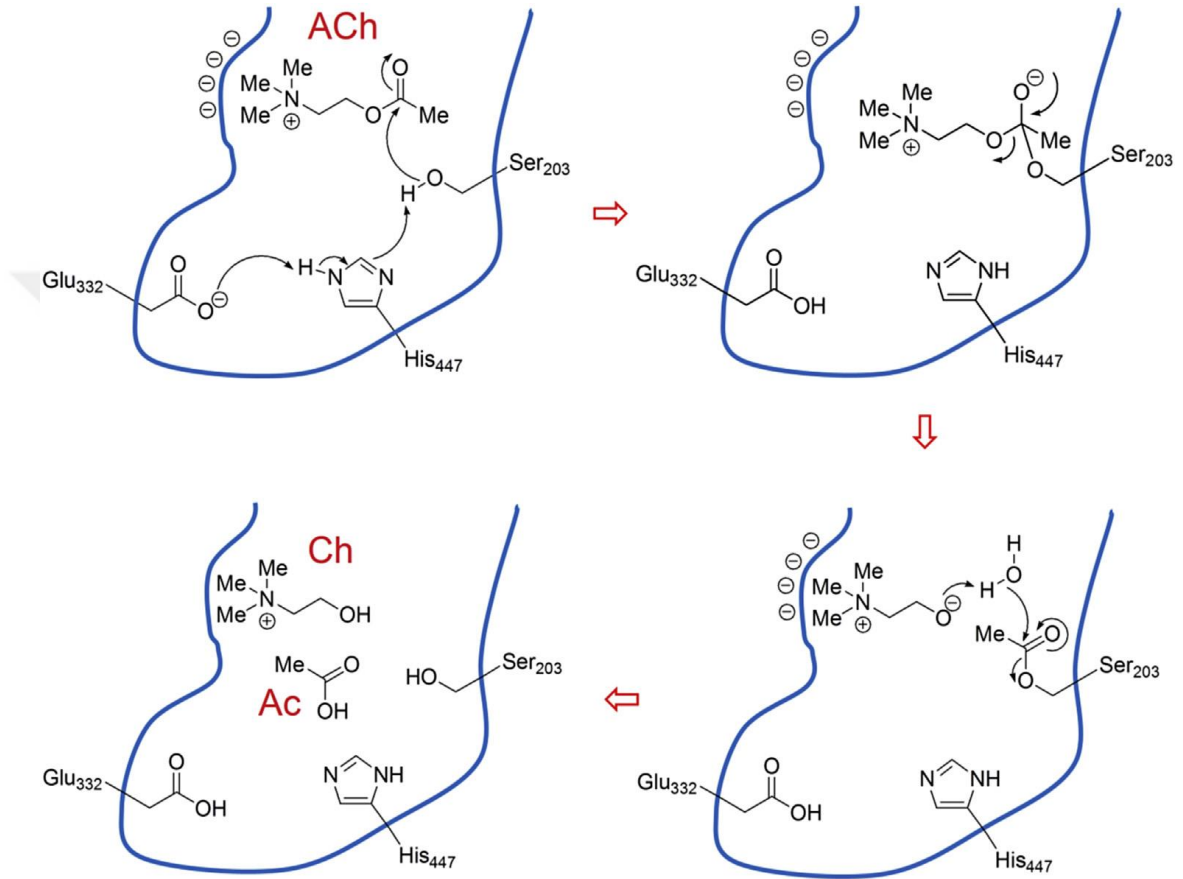
Kolinesterazlar, kolin esterlerini parçalayan karboksilik ester hidrolazlardır. Asetikkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki ayrılırlar. (AChE) gerçek bir esteraz olarak bilinirken Bütirilkolinesteraz (BChE) spesifik olmayan esteraz ya da pseudokolinesteraz olarak bilinir.

Kolinesterazlar, kolin esterlerini diğer substratlardan daha hızlı hidrolize etmeleri ve doğal karbamat alkaloid, pisositigmin (eserin) tarafından inhibe edilmeleri olgusuyla tanımlanır. Kolinesterazlar serin esterazlarıdır ve aktif serinle tepkime yapan disopropilfluorofostat gibi organofosfatlar tarafından dönüşümsüz olarak inhibe edilirler. Kolinesterazlar; temel olarak asetilkolinin, kolinerjik sinapslarda serbest bırakılmasından sonra bir milisaniye içinde hızla elimine edilerek kas kasılmasının geçici kontrolüne izin verilmesinden sorumludur (Massoulie *et al.* 1993).

Asetilkolinesteraz enzimi asetilkolini periferik ve merkezi sinir sisteminde hidrolize eden ve asetilkolin konsantrasyonunu düzenleyen enzimdir. AChE asetilkolini (ACh), asetat ve koline hidrolizleyerek katalizlenmesini sağlar (Göçer *et al.* 2015b; Polat Köse *et al.* 2015). AChE beyinde, sinirlerde ve eritrositlerin yüzeylerinde yüksek seviyelerde bulunur (Zi-Chen Xu *et al.* 2014; Mutahir *et al.* 2016).

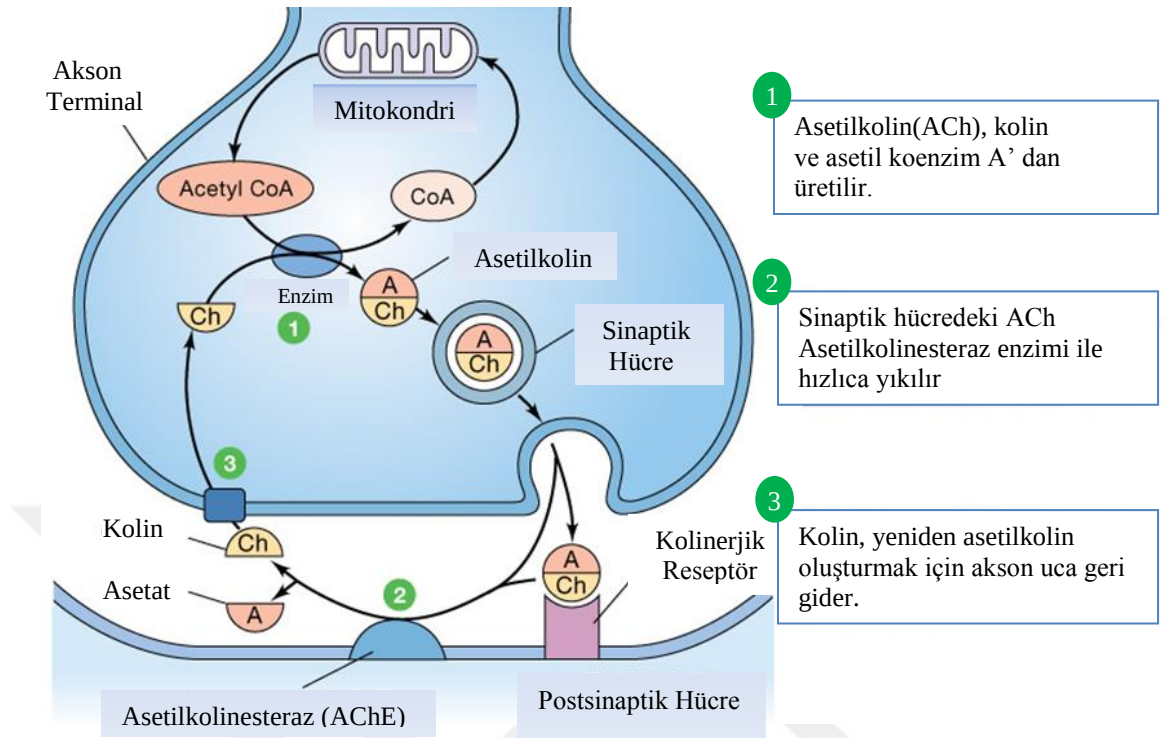


AChE insan beyinde kolinesterazın en yaygın biçimidir. 1991'den beri, ilk üç-boyutsal yapı X-ışını kristalografisiyle belirlendikten sonra bu enzim yaygın şekilde çalışılmıştır (Souza *et al.* 2016).



Şekil 1.5. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) tarafından asetilkolinin (ACh), kolin (Ch) ve asetata hidroliz mekanizması.

Asetilkolinesteraz enzimi başta sinir ve kas dokusunda olmak üzere merkezi ve periferik birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir enzim olup, ana görevi asetilkolini hidroliz ederek sinir iletimini bitirmektir. Asetilkolinesteraz 70-80 kDa molekül ağırlığında katalitik alt birimi olan monomer ya da oligomer glikoproteindir (Massoulie *et al.* 1993).



Şekil 1.6. Asetilkolinesteraz enziminin sinir hücrelerindeki fonksiyonu

Alzheimer hastalığı (AD), nörotransmitter olan asetilkolinin seviyesindeki azalma ve kolinerjik nöronların azalmasıyla ilişkili olan ilerleyici nörodejenaratif bir hastalıktır ve yaşlılarda demansın en sık ve baskın nedenidir. AD hastalığı ilk olarak Alman psikiyatrist tarafından tanımlanmıştır. AD’de düşük asetilkolin seviyesi ve amiloid-beta ($A\beta$) çökmesi önemli rol oynayan faktördür (Zi-Chen Xu *et al.* 2014). AD hastalarının beyinlerinde, merkezi sinir sisteminin dikkati arttırmaya ve öğrenmeyi kolaylaştırmaya hizmet eden ana nörotransmitterlerinden biri olan asetilkolin (ACh) eksikliği nedeniyle bu hastalık hafıza, öğrenme ve muhakeme kabiliyeti kaybıyla karakterize edilir. Bu nedenle birçok tedavi kolinerjik transmisyonu arttırmayı hedefler (Hollander and Mos 1986). Diğer taraftan, amiloid-beta ($A\beta$) birikiminden kaçınma AD’nin tedavisine yaklaşımda potansiyel etkili adım olarak değerlendirilir (Maqpool *et al.* 2016).

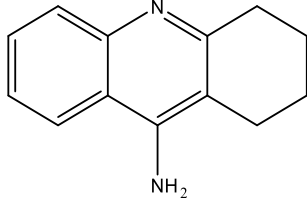
Kolinerjik hipotez, AChE’nin asetilkolin metabolizmasına dahil olmak suretiyle AD ile ilgili olduğunu ve kolinerjik sistemin işlevinde önemli bir rol oynadığını ifade

etmektedir. Mevcut nöropatik yaklaşım ise, merkezi kolinerjik fonksiyonu yükseltmek için AChE ve BChE'nin inhibisyonunu ima eder ve bunun karşılığında beyinde asetilkolin seviyesi artar (Mutahir *et al.* 2016).

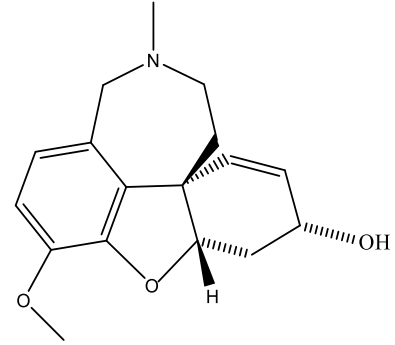
Kolinesteraz inhibitörleri sinaptik yarıktaki ACh'nin parçalanmasını azaltır ve bu durum kolinerjik nöronların dejenerasyonun neden olduğu kolinerjik nörotransmisyonundaki azalmayı ve nikotinik asetilkolin reseptörünün (nAChR) kaybını telafi eder ve AChE-sebepli amiloid-beta ($A\beta$) birikmesini inhibe ederek nörodejeneratif ilerlemeyi yavaşlatır (Zhu *et al.* 2013).

Son zamanlardaki çalışmalar kolinesteraz inhibitörlerinin (ChEI) inflamatuvar hastalıklar için etkin tedavi edici müdahaleler olabileceğini belirtmektedir. Örneğin, Alzheimer hastalığının farmakolojik tedavisi merkezi sinir sisteminde ACh'in yüksek bir seviyesini sürdüren ve hastalığın kognitif, fonksiyonel ve davranışsal belirtileri üzerinde faydalı etkileri olan ChEI'lerin kullanımına dayanmaktadır. Donepezil, Rivastigmine ve Galantamine en kapsamlı çalışılan AChE inhibitörleridir (AChEI). Bu AChEI'ların AD'de bilişsel fonksiyonu önemli derecede iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu ilaçlara ilave olarak; alternatif ve tamamlayıcı ilaçların da geliştirilmesi gereklidir (Heinrich and Teoh 2004).

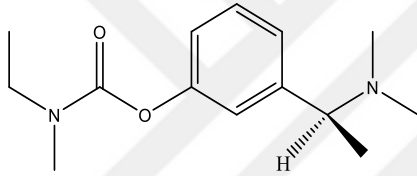
Aminoakridinler, piperidinler, karbamatlar, organofosfatlar ve üçüncül alkaloidler dahil AChEI'lerin birkaç kimyasal sınıfı vardır. Farlow ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan klinik denemede, takrinin bilişsel performanstaki önemli iyileştirmeler üreten ilk bileşen olduğu, ancak daha sonra 30 haftalık bir randomize kontrollü denemede bu bileşiğin hepatoksisite gösterdiği ortaya konulmuştur (Knapp *et al.* 1994).



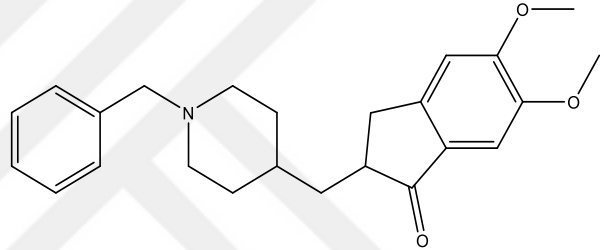
Tacrine



Galantamine



Rivastigmine

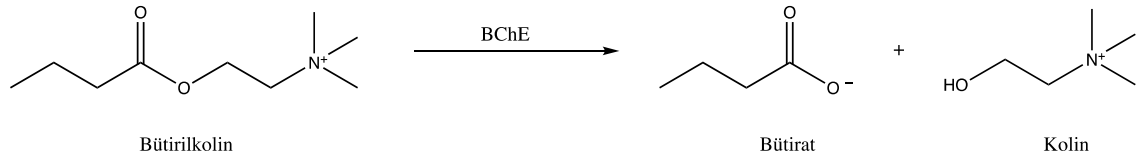


Donepezil

Şekil 1.7. Yaygın olarak kullanılan takrin, rivastigmin, galantamin ve donepezil gibi AChE inhibitörleri

1.4. Bütirilkolinesteraz Enzimi (BChE, E.C. 3.1.1.8)

Bütirilkolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) diğer bir kolinesteraz türüdür. BChE karaciğerde sentezlenir ve kana salınır (Chatonnet and Lockridge 1989). ACh hidrolizi kan serumunda, pankreasta, karaciğerde ve merkezi sinir sisteminde bulunan ve daha az spesifik enzim olan bütirilkolinesteraz (BChE) tarafından katalize edilir (Das 2007). BChE'nin rolü henüz tam olarak belirlenememekle birlikte, görevinin dokularda AChE tarafından temizlenemeyen ACh'i uzaklaştırmak olduğu düşünülmektedir. BChE insan beyinde de bulunur ama konsantrasyonu AChE'den azdır (Souza *et al.* 2016). BChE metabolizmada bütirilkolini (BCh), bütirat ve koline hidrolizleyerek katalizler.



AChE ve BChE, insan kromozomlarında farklı genlerden üretilmelerine rağmen aktif bölgeleri ve molekül yapıları benzer ve amino asit dizilimleri %65 homolog enzimlerdir (Gülçin *et al.* 2016). Her ikisinin de enzim aktivitesi için elzem olan amino asit serin, glutamat ve histidinden oluşan katalitik bir triyad vardır. Aktif yerlerinin iç hacminde bir farklılık vardır. AChE'nin substratın benzeşmesi ve bu enzimin farklı inhibitörlerinin seçiciliğiyle ilişkili daha küçük bir iç hacmi vardır. Diğer tarafta, BChE daha büyük moleküller tarafından inhibe edilen daha büyük bir biyoaktif alan içerir (Souza *et al.* 2016).

Fazla miktarda ACh, AChE'nin inhibisyonuna neden olmakta ve BChE'nin aktivitesini arttırmaktadır. Bu nedenle dokuda ACh miktarı fazla olduğunda BChE aktivitesi artar ve ACh'nin yıkılmasında etkili olur (Chuiko *et al.* 2003).

1.5. Serbest Radikaller ve Etkileri

Atomik ya da moleküler yapılarda eşleşmemiş elektron içeren yapılara serbest radikal denir. Başka moleküller ile kolay bir şekilde elektron alışverişine girebilen bu molekulere 'oksidan moleküller' veya 'reaktif oksijen partikülleri' de denmektedir (Öztürk Sarıkaya 2009). Serbest radikaller oldukça aktiftirler ve yakın hücrelerdeki moleküllere atakta bulunup hızlıca reaksiyona girerler (Gülçin 2012).

Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (ROS) olmakla beraber; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak

kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Selen İşbilir 2008).

Serbest oksijen radikalleri (ROS), immün fonksiyonu ve solunum gibi vücudun normal oksijen tüketimiyle sürekli olarak üretilirler. Oksijen merkezli serbest radikaller (ROS) Superoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($HO^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) ve nitrikoksit ($NO^{\cdot}$) tir. Singlet oksijen ($^1O_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) radikal olmayan oksijen türleridir. Reaktif oksijen türleri, nitrojen türleri ve radikal olmayan oksijen türleri Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Gülçin 2012).

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri ve serbest olmayan radikal türleri

Reaktif Oksijen Türleri		Serbest Olmayan Radikal Türleri	
Superoksit Radikal	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil Radikal	$HO^{\cdot}$	Singlet Oksijen	$^1O_2$
Hidroperoksil Radikal	$HOO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid Radikal	$L^{\cdot}$	Lipid Hidroperoksit	$LOOH$
Lipid Peroksil Radikal	$LOO^{\cdot}$	Hipoklorit Asit	$HOCl$
Peroksil Radikal	$ROO^{\cdot}$	Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
Lipid Alkoksil Radikal	$LO^{\cdot}$	Dinitrojen Trioksit	N_2O_3
Azot Dioksit	NO_2	Nitros Asit	HNO_2
Nitrik Oksit	$NO^{\cdot}$	Nitril Klorit	NO_2Cl
Nitrosil katyonu	NO^+	Nitrosil Anyonu	$NO^{\cdot-}$
Tiyil Radikal	$RS^{\cdot}$	Peroksinitrit Asit	$ONOOH$
Protein Radikal	$P^{\cdot}$	Nitroz Oksit	N_2O

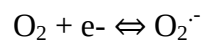
ROS ve diğer serbest radikaller moleküler oksijenin bulunduğu her yerde aerobik hayattaki normal hücresel metabolizmanın yan ürünleridir. Canlı organizmalarda RNS ve ROS'lar eksojen veya endojen kaynaklı olarak insan vücudunda üretilirler. Endojen kaynaklı ROS'lar lökosit, makrofaj ve peroksizomlarda üretilirler. Eksojen kaynaklı ROS'lar sigara dumanı, bazı kirleticiler, organik çözeltiler ve böcek öldürücüler gibi unsurlar neden olur (Çakır *et al.* 2006; Gülçin 2012).

ROS'lar nükleik asit, lipidler, proteinler, doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar gibi kritik biyomoleküllere zarar verebilirler ve DNA'ya zarar veren mutasyonlara neden olabilirler. Ancak fizyolojik konsantrasyonlarda ROS'lar normal hücre fonksiyonları için gereklidir. Makrofaj, monosit, nötrofil gibi fagositik hücreler büyük miktarda nitrik oksit ve süperoksit sentezleyerek yabancı organizmalara karşı korunurlar (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2012).

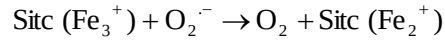
1.6. Oksidatif Stres

Vücudumuzda bulunan ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve bunun sonucunda moleküller fonksiyonlarını kaybetmektedir. Bu duruma oksidatif stres denir. Oksidatif stres, reaktif türler ile antioksidan savunma sistemi arasında bulunan, oksidasyon lehine olan dengesizliği ifade eden bir kavramdır. Reaktif oksijen ve reaktif azot türleri oksidatif strese en çok sebep olan temel faktörlerdendir. Başlıca reaktif türleri şunlardır (Gülçin 2012).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile kararsız bir yapı olan $O_2^{\cdot-}$ radikali oluşur. Mitokondrilerdeki ETS, karaciğerde sitokrom P₄₅₀, adrenal medullada hormon sentezi, damar endotelinde nitrik oksitlerin yok edilmesinde, hücre büyümesi ve farklılaşması sırasında meydana gelmektedir (Becker *et al.* 1999; Gülçin 2012).

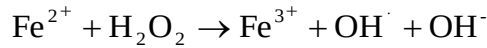


Süperoksit radikali hem yükseltgeyici hem de indirgeyici özelliktedir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur (Altınışık 2000; Gülçin 2012).



Hidroksil radikali (OH[·]), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları: Moleküler oksijene üç elektron transferi ile meydana gelmektedir. H₂O₂ ve O₂^{· -} bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan ve serbest radikal karakterli geçiş metalleri ile reaksiyona girerek ya da başka etkilerle hidroksil radikalini oluştururlar. Bunların bazıları aşağıda verilmiştir (Lloyd *et al.* 1997; Gülçin 2012).

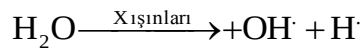
- **Fenton reaksiyonu:** H₂O₂, Fe⁺² ve diğer geçiş metalleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH[·] radikali oluşturur.



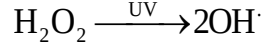
- **Haber-Weiss reaksiyonu:** H₂O₂, O₂^{· -} ile reaksiyona girerek (Fe⁺² ve Cu⁺² katalizi ile) hidroksil radikalini oluşturur.



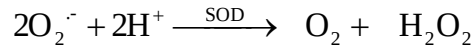
- Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalmasıyla da OH[·] oluşur.



- H₂O₂'nin UV ışığına maruz kalması ile de OH[·] oluşabilir.



Hidrojen peroksit (H₂O₂): Serbest radikal değildir ancak oksitleyici bir ajandır. O₂⁻’ye bir elektron transferi (süperoksit dismutasyonu) ya da O₂’ye iki elektronun transfer olması (indirgenme) ile veya glikolat oksidaz ve D-amino asit oksidaz ile direkt olarak meydana gelir (Gülçin 2012).



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

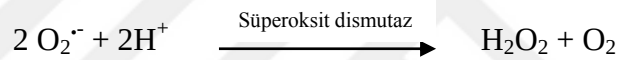
NO[•] radikali düşük kan basıncında kan damarlarının duvarında düz kasları rahatlatır ve argininden enzimatik olarak oluşan bir sinyal bileşiğidir. Aşırı nitrik oksit sitotoksiktir ve biyomoleküllerle direk reaksiyona girebilir ya da O₂⁻ ile birleşerek peroksinitrite (ONOO⁻) dönüşebilir. Peroksinitrit, lipoproteinlerle lipid peroksidasyonuna neden olurlar (Gülçin 2012).

1.7. Antioksidanlar

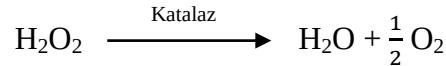
Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999; Gülçin 2012). Antioksidan bileşikler, serbest radikalleri temizleyebilir ve yiyeceklerin bozulmasına sebep olan en büyük nedenlerden biri olan lipid peroksidasyonu geciktirerek raf ömrünü uzatabilir (Gülçin 2010). Bütün aerobik organizmalar, zarar

gören molekülleri onarmak ve kaldırmak için antioksidan bileşikler ve enzimler içeren savunma sistemine sahiptirler (Gülçin 2012). Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Canlılarda antioksidan savunma sistemi iki ana gruba ayrılır. Bunlar; metabolizmada üretilen (endojen) ve dışarıdan diyet ile alınan (ekzojen) antioksidan sistemleridir (Bursal 2009). Endojen antioksidan sistemi, antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştırıcı proteazlar ve fosfolipaz gibi enzimler, yeni bileşikler sentezleyen sistemler, glutatyon, ürik asit ve çeşitli metal bağlayıcılarından oluşmaktadır (Bursal 2009; Gülçin 2012).

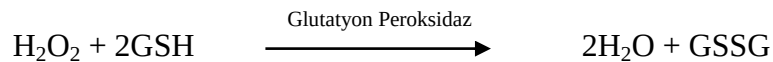
Süperoksit dismutaz enzimi, aerobik hücrelerde süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürmektedir.



Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Böylece H_2O_2 'ten Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalının oluşumu engellenir (Halliwell and Gutteridge 1999; Bursal 2009).



Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini gerçekleştirir. Glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksiti H_2O 'ya indirgeyerek hidroksil radikalının oluşma riskini azaltır. GSH ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir.



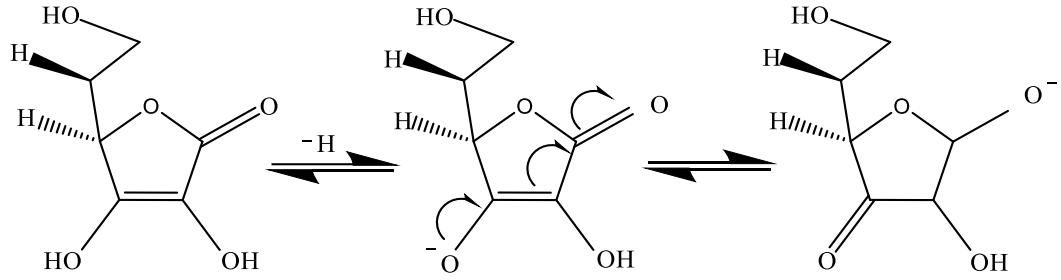
Ekzojen antioksidanlar sentetik ve doğal olmak üzere iki alt gruba ayrılır.

1.8. Doğal Antioksidanlar

Doğal kaynaklı antioksidan biyoaktif bileşikler, fenolikler ve flavonoidlerdir. Diyetle alınan en önemli doğal antioksidanlar vitamin C, tokoferol, karotenoidler ve flavonoidlerdir (Gülçin 2012). Doğal antioksidanlar, hemen hemen tüm bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvan dokularında bulunur (Pokorny 1988; Gülçin 2012).

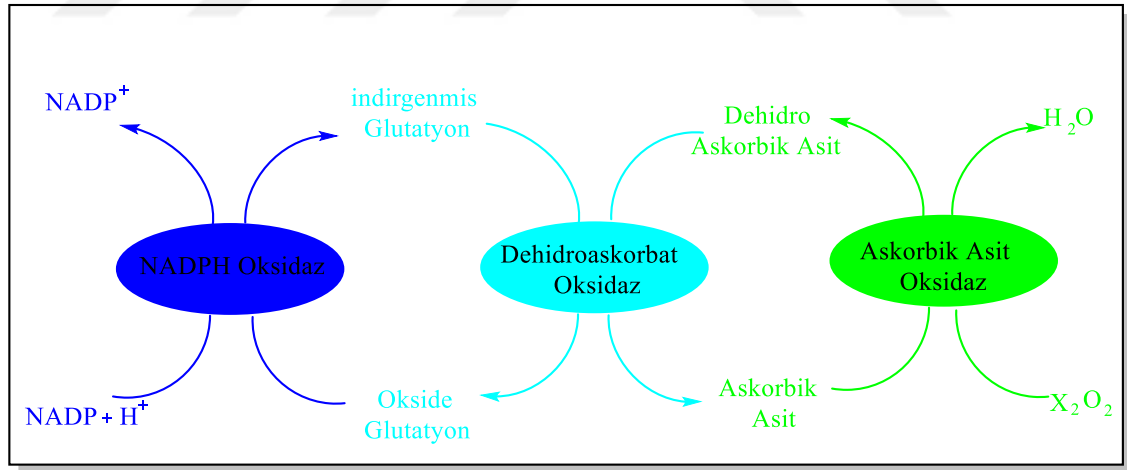
İnsan diyeti antioksidan aktivitelere sahip olan veya yapısal özellikleri temelinde ROS'ları temizlediği öne sürülen bir dizi farklı bileşik içerir. Diyetle bulunan antioksidanların en önemlileri C vitamini, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidlerdir. C vitamini dışında bu antioksidanların her grubu yapısal olarak farklı bir dizi bileşik içerir, örneğin bugüne kadar 600'ü aşkın farklı karotenoid tanımlanmış olup bunların yaklaşık ellisi insan diyetinde bulunabilir (Rice-Evans and Miller 1996; Rock *et al.* 1996; Gülçin 2012).

Askorbik asit (C vitamini) en güçlü, en az toksik doğal antioksidanlardan biri olarak kabul edilir (Bendich *et al.* 1986; Weber *et al.* 1996). Suda çözünen bir vitamindir ve diyetle birçok gıdada veya bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Askorbik asit elektron transferiyle zincir radikal tepkimeleri sonlandırabilir. Tek bir elektron transfer edebilmesi nedeniyle özeldir. Askorbik asit etkin bir redüktandır. İki majör rezonans yapısı askorbik asitin deproton olmuş konjuge bazını dengelediği için askorbik asitteki hidroksil grubu tipik hidroksil gruplarından çok daha asidiktir. Diğer bir deyişle, askorbik asit deproton olmuş biçiminin kararlı hale gelmiş bir enolat olarak değerlendirilebilir (Şekil 1.8.).



Şekil 1.8. Askorbik asitten enolat oluşum mekanizması (Gülçin 2012)

Ayrıca, insan plazması 60 μmol civarında askrobat içerir. ROS'lar ile etkileşimde, ara askorobil içermeyen serbest radikal vasıtasıyla dehidroaskorbata okside olur. Şekil 1.9'da görülebileceği üzere, dehidroaskorbat, enzim dehidroaskorbat redüktazı ile askorbik aside geri dönüştürülür. Böylece, dehidroaskorbat askorbata kıyasla çok düşük seviyelerde bulunur.

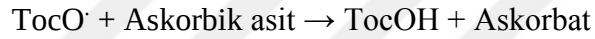
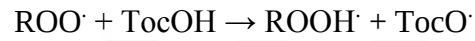


Şekil 1.9. Dehidroaskorbat oksidazı ile dehidroaskorbatın askorbik aside enzimatik dönüşümü (Gülçin 2012)

ROS'ların bir temizleyicisi olarak Askorbik asitin, süperoksit radikal anyonu, H_2O_2 , hidroksil radikali ve singlet oksijene karşı etkin olduğu ve sulu çözeltilerde, reaktif azot oksit türlerini de etkin şekilde temizlediği görülmüştür. Diyetle askorbik asitin başlıca

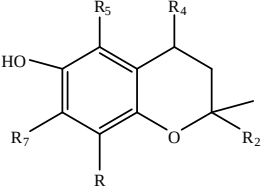
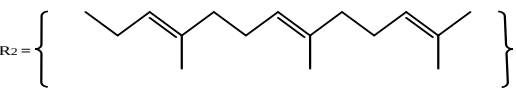
kaynakları meyveler özellikle de turuncgiller, kivi, kiraz, kavun ve ayrıca domates, yeşil yapraklılar, brokoli, karnabahar, Brüksel lahanası ve lahana gibi sebzelerdir.

In vitro çalışmalardan, C vitamini tokoferoksil radikalini rejenere ederek tokoferole dönüştürme yeteneğine sahiptir. Tokoferoksil radikali tokoferol tarafından lipid peroksidasyonu inhibisyonu yapılırken bir oluşan radikaldır (Niki *et al.* 1982, 1985; Gülçin 2012).



Tokoferoller E vitamini aktivitesi olan kimyasal bileşiklerdir (ArasHisar *et al.* 2004; Gülçin *et al.* 2005a). En iyi bilinen ve en yaygın kullanılan antioksidanlardır (Gülçin 2012). Tokoferoller ve tokotrienoller olarak sınıflandırılabilirler ve bu iki sınıfın her birinde dört izomer (α -, β -, γ - ve δ -) bulunur ve toplam sekiz tokoferol izomeri olur (Çizelge 1.2.).

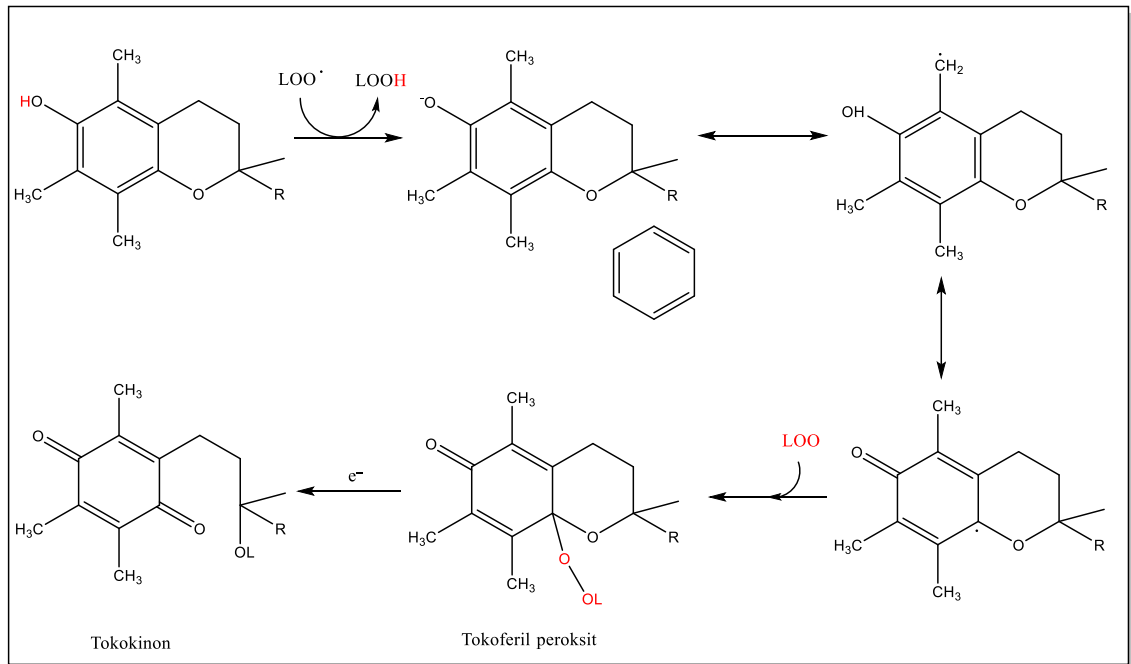
Çizelge 1.2. Tokoferoller ve tokotrienollerin sınıflandırılması

Tokoferoller					Tokotrienoller				
									
R ₄	R ₅	R ₇	R ₈		R ₄	R ₅	R ₇	R ₈	
α -Tokoferol:	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	
β -Tokoferol:	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	
γ -Tokoferol:	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	
δ -Tokoferol:	H	H	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	

Tümünde serbest radikalleri indirgemek için bir hidrojen atomu verebilen bir hidroksil grubu ve biyolojik membranlara penetre olmasına izin veren bir hidrofobik yan zincirle bir kromanol halkası bulunur (Burton and Ingold 1981).

Hemen hemen tüm gıda maddelerinde eser miktarda da olsa bulunurlar. Genel olarak, E vitamininin en yüksek konsantrasyonlarına sahip gıda kaynakları sebze yağları olup bunu kuruyemişler ve tam tahıllar ve tohumlar takip eder.

α -Tokoferol hücrelerin dış membranında ve hücre organellerinde bulunan yağda çözülebilen bir vitamindir (Godbout *et al.* 2004). α -Tokoferoller hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidan olarak davranır. Bir tokoferolden bir radikal oluşumu aromatik halka yapısı boyunca yalnız elektronun delokalizasyonu vasıtasıyla stabilize olur (Şekil 1.10.). En önemli antioksidan işlevi lipid hidroperoksitler ve bir tokoferoksil radikali ortaya çıkarmak üzere lipid peroksil radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu önler (Diplock *et al.* 1998).

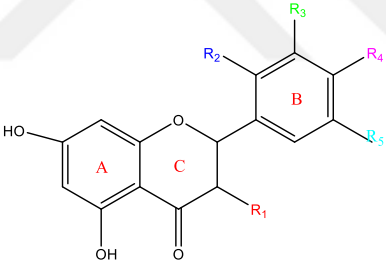


Şekil 1.10. α -Tokoferollerin serbest radikalleri giderme mekanizması (Gülçin 2012)

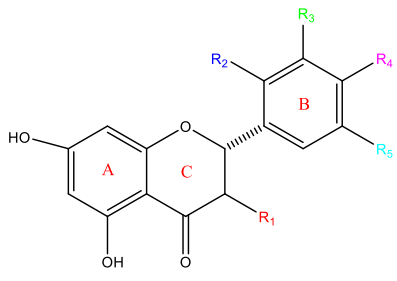
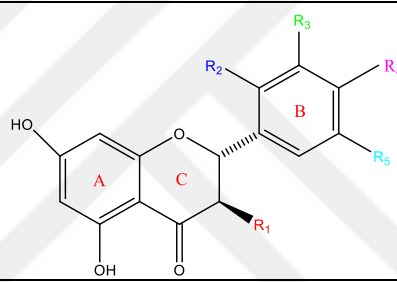
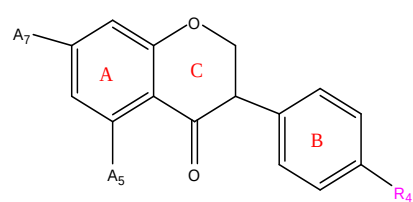
α -tokoferolün Parkinson hastalığına karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Tokoferollerin eksikliği spinoserebellar ataksi ve miyopatiler gibi nörolojik sorunlara yol açabilir (Brigelius-Flohe and Traber 1999).

Flavonoidler bitkilerin yaygın bileşikleridir. Çeşitli bitki türlerinde 4000 flavonoid içeren 8000'i aşkın polifenolik tanımlanmıştır ve bu sayı halen artmaktadır (Beecher 1999; Harborne *et al.* 1999), bitkinin yaprak, gövde, kök, meyve veya tohum gibi hemen hemen tüm kısımlarından izole edilmişlerdir. Flavonoidler bitkilerde aromatik amino asitler, fenilalanin ve tirozin, ve malonattan oluşur (Harborne 1986). Temel flavonoid yapısı, A, B ve C olarak işaretlenen üç halkada (C6- C3- C6) düzenlenen 15 karbon atomunu ihtiva eden flavan çekirdeğidir. A, B ve C olarak belirtilen üç halka içeren bu bileşiklerin genel yapısı Çizelge 1.3'te betimlenmektedir.

Çizelge 1.3. Flavonoidlerin molekül yapıları (Gülçin 2012)

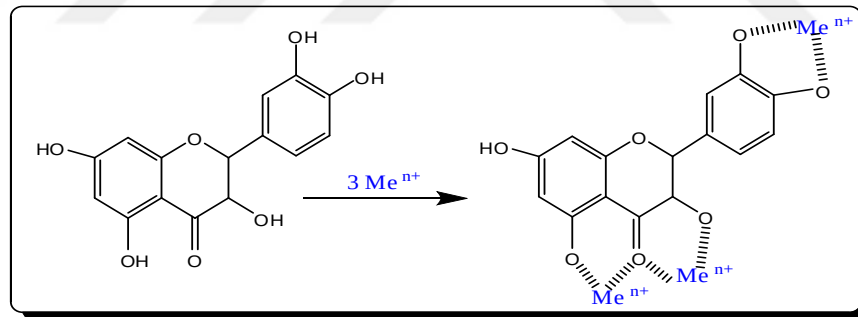
						
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavonlar	Apigenin	H	H	H	OH	H
	Cyrsin	H	H	H	H	H
	Luteolin	H	H	OH	OH	H
Flavonoller	Datiscetin	OH	H	OH	OH	H
	Quercetin	OH	H	OH	OH	H
	Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
	Morin	OH	OH	H	OH	H
	Kaempferol	OH	H	H	OH	H

Çizelge 1.3. (devam)

						
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavanonlar	Hesperetin	H	H	OH	OCH ₃	H
	Naringenin	H	H	H	OH	H
						
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavanonol	Taksifolin	OH	H	OH	OH	H
						
İzoflavonlar		A ₅	A ₇	R ₄		
	Geniştein	OH	OH	OH		
	Genistin	OH	Oglc	OH		
	Daidzein	H	OH	OH		
	Daidzin	H	Oglc	OH		
	BiochaninA	OH	OH	OCH ₃		
	Formononetin	H	OH	OCH ₃		

Flavonoidler çok etkin antioksidanlardır ve düşük-yoğunlukta lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladıkları öne sürülmüştür. Flavonoidler ayrıca diyetimizin başlıca antioksidan bileşenleri arasındadır. Günlük alım miktarı 100 mg üzerindedir. Flavonoidler genel olarak gıdalardan zayıf şekilde emilirler ve plazmanın genel antioksidan kapasitesi üzerindeki etkileri henüz tespit edilmemiştir. Flavonoidlerin en önemli kazançları oksidatif hastalıklara karşı korumaları, çeşitli enzimlerin aktivitesini modüle etmeleri ve belirli reseptörlerle etkileşimleridir (Gülçin 2012).

Flavonoidlerin güçlü antioksidan özellik göstermelerinin nedenlerinden biri; aromatik halka yapılarında bulunan hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek indirgeme reaksiyonlarına girerek serbest radikalleri yok edebilirler. Metal şelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla OH^- ve O_2^- gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler (Gülçin 2012).



Şekil 1.11. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması (Gülçin 2012)

Sık rastlanan flavonoidlerin bazıları şunlardır; krisin, luteolin, datisetin, kuersetin, mirisetin, morin ve kaempferoldür. Ayrıca, bitkilerdeki flavonoidlerin çoğu glikozidler olarak ortaya çıkar (Macheix *et al.* 1990). Flavonoidlerin lipid peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği hem doğal lipid ürünleri hem de model lipidler için iyi bilinir ve iyi belgelenmiştir (Gülçin 2012).

Flavonoidler insan diyetindeki polifenolik bileşiklerin en yaygın ve popüler grubudur ve bitkilerin her yerinde bulunurlar. Koroner kalp hastalığını önleyebildikleri ve antioksidan etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Gülçin *et al.* 2011a, 2011b).Kuarsetin ve kaemferol doğada yaygın olarak bulunan flavonoidlerdir. Flavonoidlerin α -tokoferol gibi klasik fenolik antioksidanlar gibi davranmadığını, sadece ılımlı zincir-kırıcı aktiviteler gösterdiği kanıtlanmıştır (Gülçin 2012).

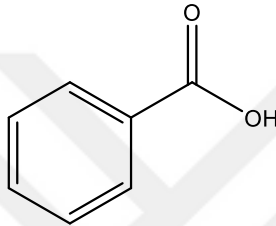
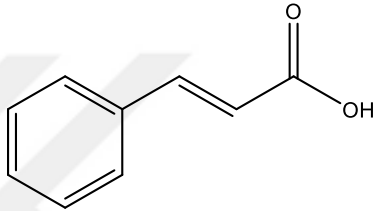
Fenolik asitler üzerine son dönemdeki odaklanma, koroner kalp hastalığı, felç ve kanserler (Gülçin *et al.* 2010a) ve antiglokoma (Çoban *et al.* 2007; Öztürk Sarıkaya *et al.* 2011; Innocenti *et al.* 2010; Şentürk *et al.* 2011) gibi oksidatif hasarlı hastalıklarına karşı meyve ve sebze yenmesi yoluyla potansiyel koruyucu rollerinden kaynaklanmaktadır (Gülçin 2012).

Fenolik asitler, serbest ve bağlı şekilde bitkilerde bulunan diyet fenoliğinin yaklaşık %30'unu oluşturur. Fenolik asitler, ya benzoik asit grubundan ya da sinamik asit grubundan ortaya çıkan aromatik karboksilik asitlerin hidroksil türevleridir. p-Hidroksil-benzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, vanilik asit (4-hidroksil-3-metoksibenzoik asit), sirinik asit (4-hidroksi-3,5-dimethobenzoik asit), p-kumarik asit, kafeik asit (3,4-dihidroksinamik asit), ferulik asit (3-metoksi-4-hidroksinamik asit), sinapik asit (3,5-dimetoksi-4-hidroksinamik asit), silorjenik asit (3-3,4-dihidroksinamonil), kinik asit ve rozmarinik asit gibi fenolik asitler bitkiler krallığında yaygın şekilde dağılmıştır (Öztürk Sarıkaya *et al.* 2010).

Fenolik asitlerin ve türevlerinin antioksidan aktivitesi aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısı ve konumuna, bağlanma yerine ve hidroksil gruplarının aromatik halkadaki karşılıklı konumuna ve yer değiştirenlerin türüne bağlıdır (Rice-Evans *et al.* 1996). Çizelge 1.4'te görülebileceği üzere fenolik asitlerin hidrobenzoik asitler ve hidroksinamik asitler olmak üzere iki ana grubu vardır;. Hidroksinamik asitlerin hidroksibenzoik asitlerden anlamlı derecede daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Sinamik asitlerde $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ gurubunun bulunması benzoik asitteki COOH grubundan daha yüksek antioksidan kapasitesini sağlar (Gülçin 2012).

Fenol omurga yapısında farklı yer değiştirenler bulunması onların antioksidan özelliğini, bilhassa hidrojen-verme kapasitesini modüle eder. *Orto-* veya *para-* konuma hidroksil grubu gibi elektron veren grubun getirilmesi fenolün veya fenolik asidin antioksidan aktivitesini artırır (Pokorny 1988).

Çizelge 1.4. Fenolik asitlerin benzoik asit ve sinamik asit türevleri olarak sınırlandırılması

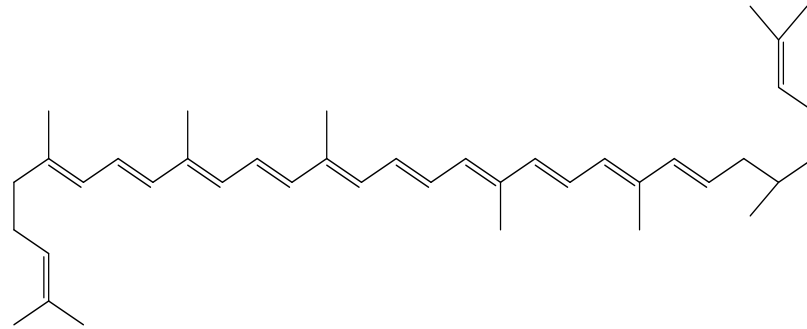
	
Sinamik Asit	Benzoik Asit
Gallik Asit	Kafeik Asit
p-Hidrobenzoik Asit	p-Kumarik Asit
3,4-Dihidrobenzoik Asit	Rosmarinik Asit
Vanilik Asit	Ferulik Asit
Sirinjik Asit	Sinapik Asit
Protokateşik Asit	Klorojenik Asit

Antioksidanlar farklı radikal veya oksidan kaynaklarına farklı şekilde tepki gösterebilir. Örneğin, karotenoidler fenoliklere ve diğer antioksidanlara göre peroksil radikallerinin iyi gidericileri değildir ama diğer çoğu fenoliklerin ve antioksidanların göreceli olarak etkisiz olduğu singlet oksijenin giderilmesinde istisnaidirler (Prior *et al.* 2005; Gülçin 2012).

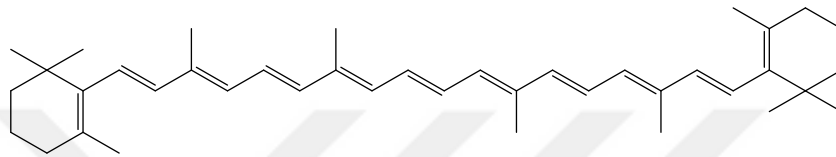
Doğal hayvansal yağda çözünür bileşiklerin bir sınıfı olan karotenoidler temel olarak bitkilerde kendiliğinden sentezlenirler. İnsan organizmasında, karotenoidler de antioksidan savunma sisteminin parçasıdır. İnsan diyetindeki nicel olarak en önemli

karotenoidler β -karoten, lisopen, lutein, β -kritosiantin, zeaksantin ve antaksindir. Likopen domates ve karpuz, papaya, pembe greyfurt ve pembe guava gibi diğer kırmızı meyvelerde bulunan bir karotenoid pigmentidir. Adı domatesin tür sınıflandırması olan *Solanum lycopersicum*'dan türetilmiştir. β -Karoten bitkilerde ve meyvelerde bol miktarda bulunan güçlü renge sahip bir kırmızı-turuncu pigmenttir. Karotenlerin bu genel sınıfı arasında, β -karoten, molekülün her iki ucunda beta-halkaları olmasıyla ayırt edilir (Gülçin 2012).

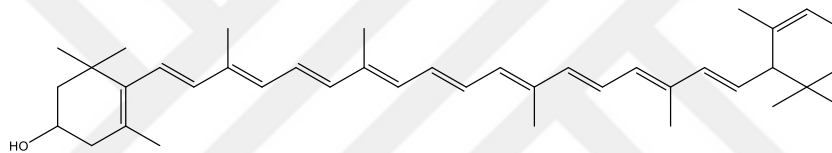
β -Siroptoksantin, doğal bir karotenoid pigmentidir. *Physalis* türündeki bitkilerin taçyaprakları ve çiçekleri, portakal kabuğu, papaya, yumurta sarısı, tereyağı, elma ve sığır kan serumu dahil çok sayıda kaynaktan izole edilmiştir. Ayrıca, lutein bir ksantofil ve doğal olarak oluşan karotenoidlerin en bilinenlerinden birisidir. Ispanak ve kıvırcık lahana gibi yeşil yapraklı sebzelerde, yumurta sarısında, hayvansal yağlarda ve retinada da bulunur. Zeaksantin, gözün retina kısmında bulunan iki primer ksantofil karotenoidlerden birisidir. Birçok karotenoidler gibi astaksantin, renkli, lipid-çözünür bir pigmenttir. Mikroalg, maya, somon, alabalık, kril, karides, kerevit, kabuklular ve bazı kuşların tüylerinde bulunur. Somon etinin ve pişmiş deniz kabuklularının rengini verir. Astaksantin, bazı karotenoidlerden farklı olarak, insan vücudunda A vitaminine (retinol) dönüştürülmez. A vitamininin çok fazlası insanlar için toksiktir ama astaksantin daha düşük bir toksisitesi vardır. antioksidan aktivitesi diğer karotenoidlerden biraz daha düşük bir antioksidandır (Gülçin 2012).



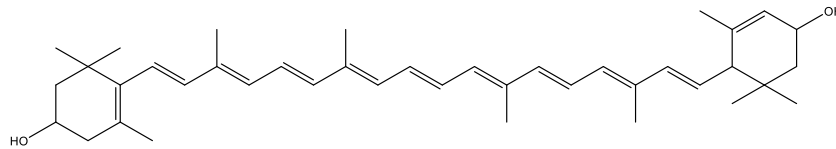
Likopen



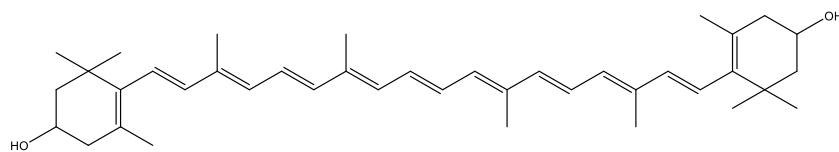
Beta-karoten



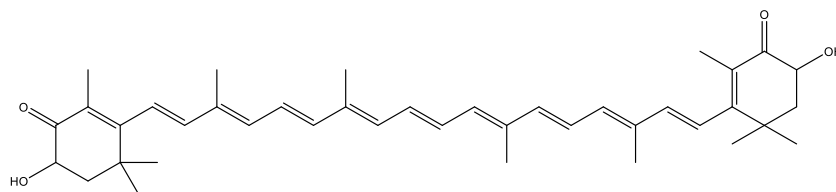
Beta-Siroptoksantin



Lutein



Zeaksantin



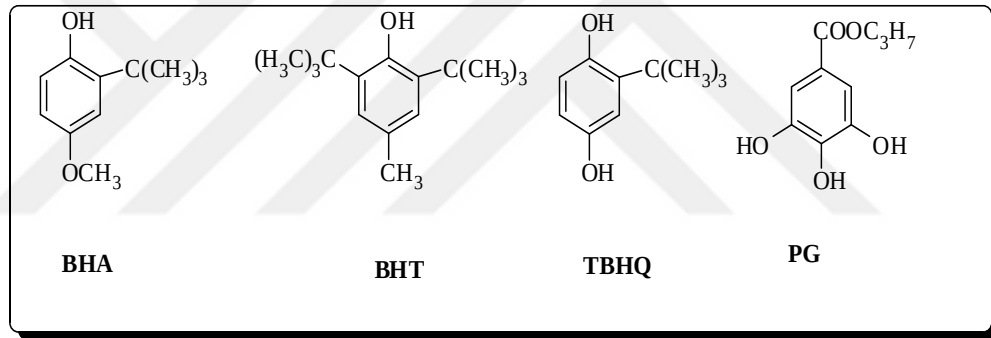
Astaksantin

Şekil 1.12. β -karoten, likopen, lutein, β -sirotoksantin, zeaksantin ve astaksantin gibi bazı karotenoid pigmentlerin sırasıyla kimyasal yapısı (Gülçin 2012)

1.9. Sentetik Antioksidanlar

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil galatlar (PG) ve tersiyer bütillenmiş hidroksikinon (TBHQ) dur. Bu antioksidanların güvenliği son zamanlarda toksik olmaları nedeniyle tartışılmaktadır (Çakır *et al.* 2006; Gülçin *et al.* 2009).

En yaygın kullanılan antioksidanlar BHA ve BHT'nin toksik ve kanserojenik etkilerinden dolayı kullanımlarına sınırlamalar getirildi. Bundan dolayı bitki orijinli doğal antioksidan çalışmaları son yıllarda artmış durumdadır (Gülçin 2011).



Şekil 1.13. Kullanılan en yaygın sentetik antioksidanlar

Sentetik ve doğal antioksidanların avantajları ve dezavantajları Çizelge 1.5'te özetlenmektedir (Ames 1996). Ancak, antioksidan kullanmanın faydaları riskinden ağır basmaktadır. Gıdalarda antioksidanlar olmadan, oksidasyon ürünleri oluşur ve bunlar sağlık üzerinde antioksidanların olası zararlı etkilerinden daha büyük bir riske neden olur.

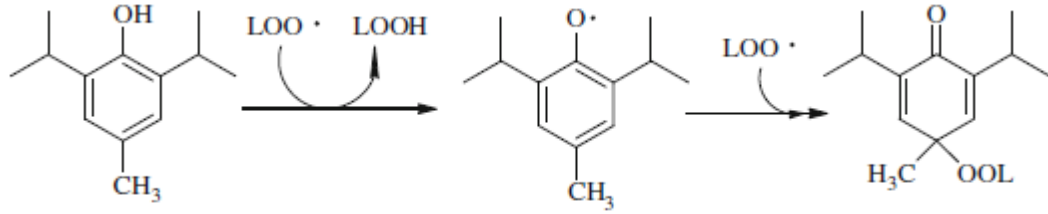
Çizelge 1.5. Sentetik ve doğal antioksidanların avantajları ve dezavantajları

Sentetik antioksidanlar	Doğal antioksidanlar
• Ucuzdur. • Yaygın olarak kullanılır. • Orta ile yüksek arası antioksidan aktivitesine sahiptirler. • Güvenli değildirler. • Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır. • Çözünürlükleri düşüktür. • Bu antiokasidanlara ilgi giderek azalmaktadır. • Bazıları yağ dokusunda depolanır	• Pahalıdır. • Bazı ürünlerin kullanımı kısıtlanmıştır. • Geniş bir aralıkta antioksidan aktivitesine sahiptirler. • Zararsızdırlar. • Kullanımları ve uygulamaları artmıştır. • Geniş bir aralıkta çözünürler. • Bu antiokasidanlara ilgi giderek artmaktadır. • Tamamen metabolize olurlar.

1.10. Antioksidanların Etkisi

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, antioksidanların, organizmalar, dokular veya cansız sistemleri oksidatif strese karşı korunmasındaki önemi belirtilmiştir. Bu ifade fizyoloji, farmakoloji, beslenme ve hatta gıda işlemeyi içeren çeşitli alanlarda yapılan çalışmalar tarafından desteklenmektedir (Magalhaes *et al.* 2009). Antioksidanlar oksidasyon nedeniyle gıdalarda oluşan bayatlama veya lezzet bozulmasını geciktirebilen, yavaşlatabilen veya önleyebilen maddeler olarak tanımlanabilir (Gülçin 2012).

Antioksidanların aktiviteleri sadece yapısal özelliklerine, örneğin peroksil ve diğer aktif türlere karşı kimyasal reaktivitelerine değil aynı zamanda konsantrasyon, sıcaklık, ışık seviyesi, substrat seviyesi, sistemin fiziksel durumu, prooksidanlar veya sinerjistler gibi hareket eden çeşitli mikrobileşiklere de bağlıdır (Gülçin 2012). Zincir başlama ve yayılmanın yan tepkimelerinde bir antioksidanın, katılımının etkinliğinden bir azalma ortaya çıkaracağı da bildirilmiştir. Örneğin, tepkimeden kaynaklanan peroksidienozlar (Şekil 1.14.) yüksek sıcaklık veya UV ışığı altında BHT'nin faydalılığını sınırlandırır çünkü kinetik zincir tepkimeyi devam ettiren yeni serbest radikaller üretirler.



Şekil 1.14. Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) yağ asidi otooksidasyonu engelleme mekanizması

Antioksidanlar vücutta serbest radikallerin etkilerine karşı bir savunma faktörü olarak işlev görür. Antioksidanlar ROS'ları elimine etmekle kalmaz aynı zamanda hücrel redoks durumunu ayarlar ve redoks sinyal transdüksiyonunu etkinleştirir. Başlamayı ve yayılma adımlarını inhibe etmek suretiyle, tepkimenin sonlanmasına ve oksidasyon sürecini gecikmesine yol açarak etki ederler. Şu anda, çeşitli sayıda sentetik antioksidanlar yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak, bu bileşiklerin kullanımı toksik ve kanserojen etkileri üzerindeki şüpheler nedeniyle yasalar tarafından kısıtlanmaktadır. Bitkisel gıdalar, serbest radikal hasarını engelleyen C vitamini, α - tokoferol, karotenoidler, flavonoid ve fenolik asitler gibi doğal antioksidan kaynaklarıdır. Serbest radikallerle tepkime için fenolik hidroksil grubu sağlayabilirler. Bunun sonucu olarak, hastalıkları dejenere eden oksidatif mekanizmaları engelleyeceklerdir. Bu yüzden, gıda uygulamaları için doğal ve daha güvenli antioksidanlara karşı artan bir ilgi ve tüketicilerin tercihlerinde doğal antioksidanlara doğru yükselen bir eğilim vardır. Bunların tümü antioksidanların doğal kaynaklarını keşfetme yönündeki çabalara hız vermiştir (Gülçin 2006a, 2007, 2010).

Genel olarak, gıda bileşeklerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için singlet elektron transferi (SET) tepkimesine dayanan yöntemler ve hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan yöntemlerle olmak üzere iki yöntem vardır. Son ürün, mekanizmaya bağlı olmaksızın aynıdır ama yan tepkimeleri için kinetik ve potansiyel güçleri farklıdır. SET-temelli yöntemler, bir antioksidanın metaller, karboniller ve radikaller dahil herhangi bir bileşiği indirgemek için bir elektronu transfer etme kabiliyetini tespit eder (Huang *et al.* 2005; Gülçin 2012).

HAT-temelli yöntemler, bir antioksidanın hidrojen vermesiyle serbest radikalleri giderme konusundaki yeteneğini ölçer. HAT tepkimeleri çözücü ve pH değişikliğinden etkilenmez ve genellikle oldukça hızlı olup saniyeler ile dakikalar içinde tamamlanırlar. Metaller dahil indirgeyici ajanlar bulunması HAT yöntemlerinde bir komplikasyondur çünkü yüksek reaktiviteye yol açabilir (Prior *et al.* 2005; Gülçin 2012).

SET-temelli yöntemler metal iyonları, karboniller ve radikaller dahil herhangi bir bileşeni indirgemek için bir elektron transfer eder (Wright *et al.* 2001). SET-temelli yöntemler bir antioksidanın metaller, karbonil grupları ve radikaller dahil herhangi bir bileşiği indirmek için bir elektron transfer etmeye yönelik kabiliyetini tespit eder: SET yöntemlerinde göreceli reaktivite temel olarak reaktif fonksiyonel grubun deprotonasyonu (Lemanska *et al.* 2001) ve iyonizasyon potansiyeline (Wright *et al.* 2001) dayanır. Böylece SET tepkimelerinin tümü pH'ya bağlıdır. Genel olarak, iyonizasyon potansiyel değerleri, deprotonasyonla artan elektron-verme kapasitesini yansıtacak şekilde artan pH ile azalır. Redoks potansiyeli ve SET yöntemleri arasındaki bir korelasyon önerilmiş (Ou *et al.* 2005) ama istikrarlı şekilde gösterilememiştir. SET tepkimeleri genellikle yavaştır ve tamamlanması uzun zaman alabilir, bu nedenle antioksidan kapasitesi hesaplamaları kinetik yerine üründeki yüzde azalmaya dayanır (Sartor *et al.* 1999). Metaller gibi eser bileşikler ve kirleticiler SET yöntemlerine karışabilir ve sonuçların yüksek değişkenliği yanında zayıf tekrarlanabilirliği ve zayıf istikrarına yol açabilir (Ou *et al.* 2005).

SET-temelli yöntemler aşağıdaki tahlilleri içerir:

- Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak total fenolik tayini
- Troloks denklik antioksidan kapasitesi (TEAC) tayini
- Ferrik iyon indirgeyici antioksidan aktivite (FRAP) tayini
- Bir oksidan olarak Cu^{2+} kompleksi kullanarak total antioksidan kapasite tayini
- 1,1-Difenil-2-pikrilhidraliz radikal (DPPH $\cdot$) giderme tayini
- 2,2-Azinobis 3-ethibenzihiozoline 6-sülfonik asit radikali (ABTS $\cdot^+$) giderme tayini
- N,N-dimetil-p-etilbenzitiazolin radikal (DMPD $\cdot^+$) giderme tayini

➤ Bakır iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitesi tayini (CUPRAC)

ABTS yöntemlerinin hem HAT hem de SET mekanizmaları kullandığı bildirilmiştir (Prior *et al.* 2005). Ayrıca örneğin biyolojik sistemlerde veya gıda maddelerinde başlıca makromoleküllerle etkileşen ve onlara hasar veren oksidanlar için temizleme kabiliyetini ölçen diğer tahliller de vardır (Huang *et al.* 2005; MacDonald-Wicks *et al.* 2006):

- Süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) giderme tayini
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) giderme tayini
- Hidroksil radikali ($\text{HO}^{\cdot}$) giderme tayini
- Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) giderme tayini
- Peroksinitrit (ONOO^-) giderme tayini

Besin bileşiklerinin potansiyel koruyucu etkilerini daha iyi yansıtan antioksidan özelliklerinin ölçmek için bu birden çok yöntem önerilir. Bu genel bakışın bir ana hedefi kimyasal ilkeleri, bazı varyasyonlarını, yakın zamanlardaki uygulamaları ile avantajları ve eksikliklerini gözden geçirmektir.

1.11. Likenler

Likenler, bitkiler ve mantarlardan farklı olarak tek bir organizma değil, mantarlar ile alglerin veya siyanobakterilerin beraberliğinden ve bütünlüğünden oluşan simbiyotik canlılardır (Koçer 2012).

Bilimsel anlamda likenlerle ilgili bilgiler ilk kez onbeşinci yüzyılda verilmeye başlanmıştır. İnsan kafatası iskeleti üzerinde büyüyen bir çeşit liken, epilepsi tedavisinde kullanılmış ve kişide iyileşme özelliği baş gösterdiğinden çok değerli kabul edilmiştir. Likenlerin Avrupa ülkelerinde de onaltıncı yüzyıldan itibaren çeşitli

hastalıkların tedavisinde dekoksasyon (demleme) veya infüzyon şeklinde kullanıldığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (Altun 2007).

Liken maddeleri primer metabolitler (intraselüler) ve sekonder metabolitler (ekstraselüler) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Likenler tarafından oluşturulan primer metabolitler, hücre duvarı ve protoplastlara bağlı suda çözünen ve su ile ekstrakte edilebilen proteinleri, amino asitleri, polikaretenoidleri, polisakkaritleri ve vitaminleri içermektedir. Bu metabolitlerin bazıları mantarlar ve algler tarafından sentezlenmektedir (Hale 1974).

Likenler yapılarında bulunan çeşitli asitlerden dolayı pek çok hastalık üzerinde iyileştirici etkiye sahip olmalarının yanı sıra, antibiyotik, antimikrobiyal, antiviral, antiprotozoal, antioksidan, antienflamatuar, analjezik, antipüretik, antiproliferatif, ve sitotoksik aktiviteye de sahiptirler (Altun 2007).

Fizyolojik kapasitede azalma ve çevresel stresler, aerobik canlı metabolizmasının doğal sonucu olarak oluşan serbest radikallerin artışına neden olmaktadır. Diyetle yeterli miktarda alınan likenlerin, organizmada serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon sonucu oluşan doku hasarlarını önlemede etkili olacağı ve dolayısıyla yaşam süresini uzatabileceği de düşünülmektedir (Altun 2007).

Likenler kayalar, ağaçların gövde, dalları ve hatta yaprakları, toprak, kiremit, beton, cam, ahşap materyal, deri, kumaş gibi doğal ve yapay çok değişik substratlar üzerinde kolayca büyüebilmektedirler. Deniz seviyesinden yüksek dağlara, çöllerden arktik bölgelere, tropiklere kadar dünyanın hemen hemen her yerinde ise yayılım gösterirler (Nash 1996).

Likenler, antibiyotik ve antikanser ilaçları için araştırılmış ve çok düşük konsantrasyonlarda patojenik bakteriler ve kanser hücrelerine karşı bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Shrestha and Clair 2013).

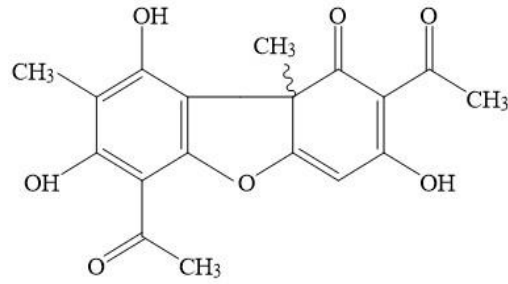
1.12. Çalışmada Kullanılan Fenolik Bileşikler

Bu çalışmada kullanılan usnik asit, vulpinik asit ve psoromik asit fenolik bileşikleridir. liken bitkisinin sekonder metabolitleridir.

1.13. Usnik Asit

Çeşitli liken türlerinde bulunan dibenzofuran türevlerinden doğal olarak oluşur (Jin *et al.* 2013). Usnik asit en yaygın ve en fazla bulunan ikincil metabolitlerden biridir. Usnik asit antiviral, antimitotik, antienflamatuar ve analjezik etkiye sahiptir (Rabelo *et al.* 2012). Usnik asit, *Usnea*, *Cladonia*, *Lecanora*, *Ramalina*, *Evernia*, *Parmelia* ve *Alectoria* içeren liken türlerinin çoğunda tanımlanmıştır (Cansaran *et al.* 2006).

İlk olarak 1844 yılında Alman bilim adamı W. Knop tarafından izole edilmiş ve ilk olarak Curd ve Robertson tarafından 1933-1937 tarihleri arasında sentezlenmiştir. Normal şartlar altında usnik asit; acı, sarı ve katı maddedir. Rasemik karışım olmasının yanı sıra D ve L formlarının olduğu bilinir. Usnik asit içeren liken ekstraktları ilaç, parfümeri, kozmetik ve ekolojide de kullanılmıştır. *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Pneumococcus* gibi gram pozitif bakteriler ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi diğer bakterilere ve bazı patojenik mantarlara karşı güçlü antibiyotik etkisi vardır. UV absorpsiyonu, koruyucu özellikleri, büyümeyi engelleyici, böcek öldürücü gibi özellikleri vardır. Usnik asit ve sodyum usniat gibi tuz formu, bilimsel bir veri olmamasına rağmen zayıflamak için yiyeceklerde bir katkı bileşeni olarak Amerika'da kullanıldığı bildirilmiştir. Usnik asitin yüksek konsantrasyonlarında bazı toksik etkilere sahip olduğuna inanılır (Anonim 2017).



Şekil 1.15. (+)-Usnik asitin açık yapısı

Liken bileşikleri olan Parietin, atranorin, usnik asit ve gyrophorik asidin, insan kanser hücrelerine etkileri araştırılmış, usnik asidin diğerlerine göre daha etkili anti kanser ajanı olduğu bulunmuştur (Backorova *et al.* 2010). Likenlerin ikincil metabolitleri olan usnik asit vb asitlerin topoizomerez I ve II enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi ve hücre ortamında bu bileşiğin DNA bağlayıcı özelliğine etkileri araştırılmıştır (Plsikova *et al.* 2014). Usnik asit ve atroninin insan prostat ve melenom kanser hücrelerine karşı etkisi araştırılmış ve her iki bileşiğinde kanser hücrelerine karşı güçlü inhibitör etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Galanty *et al.* 2017).

UV ışınlarına karşı koruması olan ve antioksidan gibi davranan usnik asit, tıbbi ve kozmetik açıdan da önemlidir. UV-B ışını altında İnsan lenfosit hücre çizgilerinde *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) kullanılarak ekstrakt edilen usnik asitin prooksidant ile oksidant özellikleri araştırılmıştır (Kohlhardt-Floehr *et al.* 2010).

Farklı liken türlerinden elde edilen usnik asitin, Gram pozitif bakterilerde DNA ve RNA'nın sentezini inhibe edip etmediği araştırılmıştır (Maciazg-Dorszynska *et al.* 2014). Dermal yanıklar için pansuman olarak kollegen içerikli usnik asitin etkileri araştırılmış, dermal yanıklarda olumlu etkilerin olduğu görülmüştür (Nunes *et al.* 2010). İnsan nöron hücresinde usnik asitin redoks karakterizasyonu, toksik etkisi ve antioksidant potansiyel aktivitesi araştırılmıştır (Rabelo *et al.* 2012). Gastrit ülser bulunan sıçanlarda usnik asitin antioksidan ve mide koruyucu etkileri araştırılmış, usnik asit uygulamasında SOD, glutatyon peroksidaz seviyelerinde artma, lipid

peroksidasyonda azalma olduğu gözlenmiş, usnik asitin, oksidatif zararları azaltıcı etkisi nedeniyle mide koruyucu olabileceği öne sürülmüştür (Odabaşoğlu *et al.* 2006).

Usnea complanata liken türünden elde edilen psoromik asit ve usnik asitin antioksidant ve kardiyovasküler koruyucu etkileri araştırılarak; lipid peroksidasyon inhibisyonu, nitrikoksit radikal temizleme aktivitesine bakılmıştır (Behera *et al.* 2012). *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. Liken türlerinden izole edilen fenolik bileşiklerin DPPH radikal temizleme ve lipid peroksidasyonu aktivitelerine bakılmış, usnik asit lipid peroksidasyonu inhibisyonu ve DPPH radikal temizleme aktivitesi göstermediği bulunmuştur (Atalay *et al.* 2011).

Bazı liken türlerinin antioksidan özellikler araştırılmış, atranorin ve fumarprotocetraric asit içeren *Cladonia furcata*, atranorin, chloroatranorin, physodik asit ve physodalik asit içeren *Hypogymnia physodes*, gyrophorik asit ve umbilicarın içeren *Lasallia pustulata*, atranorin, protocetraric asit, usnik asit ve caperatic asit içeren *Parmelia caperata*, atranorin ve salazinik asit içeren *Parmelia sulcata* liken türleri aseton, methanol ve sulu ortamda ekstrakte edilerek, süperoksit anyon temizleme ve DPPH radikal temizleme yöntemleriyle antioksidan aktivitelerine bakılmış, antioksidan aktiviteleri ekstraksiyonda kullanılan çözücülere göre farklılık gösterdiği ve yüksek ışık, hava kirliliği ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin likenlerin antioksidan sentezini ve antioksidan aktivitelerini azalttığı görülmüştür (Kosanić *et al.* 2010).

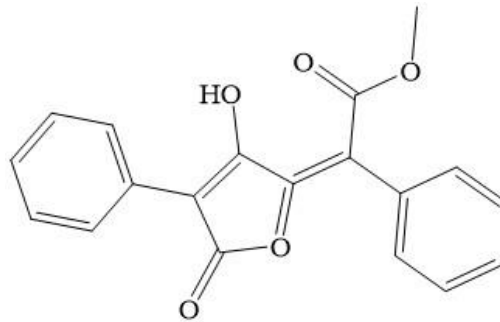
Liken metabolitlerinin (difraktaik asit, lobarik asit, usnik asit, vicanicin, variolarik asit, protolichesterinik asit) üç tane kanser hücreğine [MCF-7 (breast adenocarcinoma), HeLa (cervix adenocarcinoma) HCT-116 (colon carcinoma)] karşı çoğalma, reaktif oksijen türlerine etkileri araştırılmış, usnik asitin en önemli sitotoksik ajan olduğu, bu bileşiklerin DPPH yöntemi ile antioksidan etki göstermedikleri ve HeLa hücresi tarafından yapılan oksidatif zararları önlemedikleri görülmüştür (Brisdelli *et al.* 2013).

Ramolina roesler liken türlerinin antioksidant ile antibakteriyel etkilerine bakılarak, DPPH yöntemiyle antioksidant özelliği araştırılmıştır (Sisodia *et al.* 2013).

Parmelia caperata, *P. saxatilis* and *P. Sulcata* liken türlerinin asetonla ekstrakte edilerek elde edilen kimyasal bileşiklerin (usnik asit, depsidon salazininik asit ve protocetraric) antioksidan (Süperoksit Anyon Radikal Temizleme, DPPH, İndirgeme Gücü), antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerine araştırılmış, bu liken türlerinin güçlü antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu görülmüştür (Manojlovic *et al.* 2012). *Usnea* ve *Taninia Candida* likenlerinden ekstre edilen norstiktik asit ve usnik asit bileşiklerinin biyolojik aktivitelerine süperoksit anyon temizleme antioksidan yöntemiyle bakılmıştır (Rankovic *et al.* 2012).

1.14. Vulpinik Asit

İlk kez 1925 yılında izah edilmiştir. Berrak sarı renkli ve nispeten toksiktir. Gram pozitif bakterilere karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Farklı liken bileşiklerinde (vulpinik asit) yaraların iyileşmesi ve tümör hücrelerinin antiproliferatif etkisinin araştırılması yapılmıştır (Burlando *et al.* 2009). Aromatik halkalı vulpinik asitin tavşanlarda, eklem iltihabı üzerine antienflamatuvar etkilerine bakılmıştır (Foden *et al.* 1975).

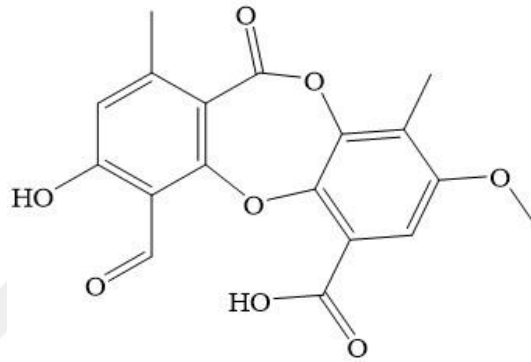


Şekil 1.16. Vulpinik asitin açık yapısı

1.15. Psoromik Asit

Usnea komplanat liken türünden üretilen psoromik asit ve usnik asitin kardiyovasküler koruyucu etkisi ve serbest radikal temizleme (FRSA) ve nitrik oksit radikal temizleme

(NORSA) antioksidan özellikleri incelenmiştir (Behera *et al.* 2012). Şili ve Antartik bölgelerde farklı liken türlerinden bilinen altı maddenin (psoromik, difraktoik, atranorin, lobarik, perlatolik, variolarik asit) faredeki gastrit yaralardaki gastoprotektif etkileri araştırılmıştır (Sepulveda *et al.* 2013). Psoromik asitin, RabGGTase (Transferaz enzimi) üzerindeki inhibisyonu araştırması yapılmıştır (Deraeve *et al.* 2011).



Şekil 1.17. Psoromik asitin açık yapısı

1.16. Araştırmanın Amacı ve Önemi

Çalışmada fenolik yapıya sahip Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin antioksidan özellikleri ile insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri (hCA I ve II), asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Birçok hastalığın tedavisi bazı enzimlerin inhibisyonu veya aktivasyonu üzerinden yapılabilmektedir. Bu nedenle çalışmada kullanılan Psoromik, Usnik ve Vulpinik asitlerin inhibisyon ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların yeni ilaçların sentezi ve bazı hastalıkların tedavisi açısından önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kolinesterazların varlığı 1914'te Dale tarafından varsayım olarak ortaya atılmış ve 1926'da Loewi ve Navratil tarafından gösterilmiştir. 1937'de Marnay ve Nachmansohn Torpedo ve Electrophorus'un elektrikli organlarında ve nöromüsküler fonksiyonlarda asetilkolinesterazın yüksek konsantrasyonlarını gözlemlemiştir (Marnay and Nachmansohn 1938).

Yapılan çalışmalar, ilk olarak görünüşe göre evrim mükemmel bir enzim yaratmıştır. Kolinesterazlar, asetilkolinin asetilkolinesteraz tarafından hidrolizinin substratın moleküler difüzyonu tarafından belirlenen maksimum teorik sınıra yaklaşması ile bilinen en hızlı enzimler arasındadır. İkinci olarak, kolinesterazlar çözünür, membrana-bağlı ve bazal lamine-ankrajlı formlar içeren son derece zengin bir moleküler polimorfizm gösterir. Üçüncü olarak, kolinesterazların *in vivo* ekspresyonu ve çoklu moleküler formlarının dağılımı gelişim ve hücrel farklılaşmanın kayda değer bir endeksini oluşturur. Dördüncü olarak, asetilkolinesterazın kolinerjik sinapsların dışında mevcudiyeti ve fonksiyonu anlaşılmamış bir kardeş enzim olan bütirilkolinesterazın varlığı, kolinesterazların asetilkolinin hidrolizi dışında fonksiyonlara dahil olabileceğini öne sürmektedir (Massoulie *et al.* 1993).

AD korteks ve limbik sistem dahil başlıca beyin bölgelerini etkileyen bir nörodejeneratif rahatsızlıktır ve en azından bir diğer bilişsel fonksiyonun bozulmasıyla bellekte ilerleyen azalmayla karakterize edilir (Whitehouse *et al.* 1981). 1970'lerin sonunda White ve çalışma arkadaşları AD hastalarının beyinlerinde, merkezi sinir sisteminin dikkati arttırmaya ve öğrenmeyi kolaylaştırmaya hizmet eden ana nörotransmitterlerinden biri olan asetilkolin (ACh) eksikliği olduğunu keşfetmişler. AD'de en çok belirtilen beyin eksikliklerinden birisi kolinerjik sistemdedir ve bu nedenle birçok tedavi rejimi kolinerjik transmisyonu arttırmayı hedefler (Hollander and Mos 1986).

AD hastaları için bir destek olarak uygun diğer bir madde, antioksidan olarak davranarak dokularda yükseltgen stresi önleyen ve bunun sonucu olarak nöro-korumayı destekleyen α -tokoferoldür. Çalışmalar non-streoid anti-inflamatuar ilaçların β -amiloid peptitlerin birikmesinin neden olduğu inflamasyonun azaltılmasını ve nöro-korumayı destekleyerek erken evrelerdeki hastalarda hastalığın ilerlemesini önemli derecede azalttığını göstermektedir (Souza *et al.* 2016). Birkaç *in vivo* deney, BChE'nin kolinergic nörotransmisyonun sürekli regülasyonuna imkan vererek AChE yokluğunu telafi edebileceğini göstermiştir. Kolinesterazların β -amiloid ve nörofibriler yumaklara ilişkin birkaç klasik olmayan özellik sergilediği ve bu nedenle AD patogenezi için önemli olduğu göstermiştir. Yakın zaman önceki çalışmalar, BChE'nin merkezi sinir sisteminde, ACh seviyelerini düzenlemek suretiyle motor kontrolünü, farkındalık, biliş ve davranış modülasyonu üzerinde etki yaptığını göstermiştir (Lodarski *et al.* 2014).

Yüksek seviyede selektif, tersinir, merkezi sinir sistemini penetre edebilen BChE inhibitörleri, örneğin, N1-fenil-norsimserin (PEC) ve analogları yakın zaman önce geliştirilmiş ve beyin BChE'nin fizyolojik rolünün açıklanmasını sağlamıştır. Beyin ACh'ını yükseltmeye ilave olarak, PEC'nin yaşlı sağlıklı sıçanlarda uzun süreli potansiyasyonu (LTP; öğrenmenin bir moleküler bağıntısı) artırdığı, bilişsel performansı iyileştirdiği ve insan β -amiloidu aşırı çıkaran transgenik farelerde düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak, selektif BChE inhibisyonunun β -amiloid-bağılantılı bilişsel fonksiyon bozukluğu üzerindeki etkisinin halen açık olmadığı belirtilmiştir (Furukawa-Hibi *et al.* 2011).

Eugenol türevlerinin (Topal *et al.* 2017), Bromfenol türevlerinin (Bayrak *et al.* 2017; Öztaşkın *et al.* 2015), Benzilizokinolin ve türevlerinin (Zi-Chen Xu *et al.* 2014), nusiferin ve türevlerinin (Yang *et al.* 2014), donepezil türevleri (Özturan Özer 2012), terpenoit, glikozit ve kumarin (Mukherjee *et al.* 2006), donepezil, galantamin ve rivastigminin (Birks 2006), sülfamid ve sülfonamidin (Akıncıoğlu *et al.* 2013), Sülfamil ve karbamatların (Göçer *et al.* 2013). AChE enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

2,4-Diklorofenoksiasetik asitin (2,4-d) kılıçkuyruk (*xiphophorus hellerii*) balıklarının bazı dokularında asetiklorinesteraz (AChE) aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır (Turan 2012). *Xanthium strumarium* L. bitkisinden izole edilen bileşiklerin AChE ve BChE inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Alpaslan 2013).

Karbonik anhidraz (CA), HCO_3 dehidrasyonunun katalize olmamış oranının, kanın gaz değişimi/aktarımı yüzeyinde harcadığı zaman boyunca CO_2 salınımının çok düşük olduğunun farkına varılması sonucunda 1932 yılında kırmızı kan hücrelerinde keşfedildi. Davenport (1939) tarafından mide ve Davenport ve Wilhelmi (1941) tarafından böbrekte bulundu (Gilmour 2010). CA ilk olarak memeli eritorisitinden, daha sonra çok farklı bitki ve hayvan dokularından saflaştırılarak izole edildi (Göçer 2014). Yapılan çalışmalarla da hayvan CA enzimleri ile bitki CA enzimleri arasında çeşitli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. Enzimin bitkilerdeki molekül kütlesi 160 kDa ile 260 kDa arasında hegzamerik yapıda olduğu ve memelilerde ise molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002). Keilin and Martin (1944) hCA aktivitesi ile Zn içeriği arasında bağlantı olduğunu belirterek Zn'nin katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Bu şekilde hCA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçti (Göçer 2014). 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 CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Akıncıoğlu *et al.* 2013)

Fenolik bileşikler ikincil bitki metabolitleridir ve bitkisel kökenli gıda ürünleri dahil hemen hemen tüm bitkisel materyallerde bulunur. Bu bileşiklerin hem insan hem de hayvan diyetlerinin entegre bir parçası olduğu düşünülmektedir (Gülçin 2006a). Doğal antioksidanların çoğunluğu fenolik bileşiklerdir ve doğal antioksidanların en önemli grupları tokoferoller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir (Shahidi and Naczki 1995; Gülçin 2012). Günümüze kadar bu konularda binlerce çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda farklı kaynaklardan saflaştırılan veya saf maddelerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri yoğun bir şekilde araştırılmıştır ve araştırılmaya da devam edilmektedir. Bu

bağlamda bromfenol türevleri (Öztaşkın *et al.* 2015), propofol (Gülçin *et al.* 2005a), bazı dimerik fenol bileşikleri (Gülçin and Daştan 2007), dantrolene sodyum (Büyükokuroğlu *et al.* 2001), melatonin (Gülçin *et al.* 2003b; Gülçin 2008), serotonin (Gülçin 2008), morfin (Gülçin *et al.* 2004a), tannik asit (Gülçin *et al.* 2010b), L-Karnitin (Gülçin 2006b), L-Adrenalin (Gülçin 2009), L-Tirozin ve L-Dopa (Gülçin 2007), yeni sentezlenmiş kurkumin (Ak and Gülçin 2008) ve rezveratrol (Gülçin 2010) gibi saf ve biyolojik açıdan önem arz eden moleküllerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri çalışılmış ve bu maddelerin bazıları için muhtemel mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlara ek olarak farklı kaynaklardan saflaştırılan maddelerin veya saf maddelerin antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. *Perilla pankinensis* bitkisinden total olarak saflaştırılan antosiyaninler (Gülçin *et al.* 2005b), sarmaşık bitkisinden α -hederin, hederasaponin-C, hederakolşizit-E ve -F saponinleri (Gülçin *et al.* 2004b), *Chionanthus virginicus* bitkisinden oleoropin ve ligustrozit gibi sekoiridoidler saflaştırılmış (Gülçin *et al.* 2009) antioksidan ve antiradikal aktiviteleri incelenmiştir. *Vinca herbacea* bitkisinden ise majdin ve izomajdin maddeleri saflaştırılmış ve bu maddelerin apoptotik, antioksidan ve antiradikal özellikleri incelenmiştir (Gülçin *et al.* 2012b), eugenol (Gülçin 2011), kafeik asit fenetil esteri (Göçer and Gülçin 2011) gibi maddelerin de son zamanlarda antioksidan aktiviteleri araştırılmış ve standart antioksidan olan α -tokoferol ve troloks ile mukayeseleri yapılmış ve muhtemel mekanizmalar ileri sürülmüştür.

Bunların dışında galanga (Polat Köse *et al.* 2015), rezene tohumu (Oktay and Gülçin 2002), kivi (Dawes and Keene 1999; Bursal and Gülçin 2011), nane (Elmastaş *et al.* 2005), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008) lavanta ve karanfil (Gülçin *et al.* 2004c), ılgın (Oktay *et al.* 2007), turunçgiller (Saleh *et al.* 1998), brokoli (Gülçin *et al.* 2004d), kıızılcık (Gülçin *et al.* 2005c), defne (Elmastaş *et al.* 2006a), mantar (Elmastaş *et al.* 2006b), anason (Gülçin *et al.* 2003a), , evelek (*Rumex crispus*) (Yıldırım *et al.* 2001), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısırgan (Gülçin 2002), meyan kökü ve yaprakları (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Şerbetçi and Gülçin 2009), kiraz sapı (*Cerasus avium* L.) (Bursal *et al.* 2013), turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) (Kalın *et al.* 2015), mersinin (*Myrtus communis*) (Annakkaya

2012), zencefil (Stoilova *et al.* 2007), ökse otu (Uçar *et al.* 2006), oğul otu (Köksal *et al.* 2011) ve tarçın (Chua *et al.* 2008) gibi birçok meyve ve sebze ile zencefil yağı (Singh *et al.* 2008) ve karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012a) gibi bitkisel yağların ve propolisin (Gülçin *et al.* 2010a) antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca zeytinyağı (Blekas and Boskou 1998) ve meyve sularında (Wen *et al.* 1999) yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir. Ayrıca patates (Friedman 1997), soğan (Ewald *et al.* 1999), fasulye (Ewald *et al.* 1999) ve ıspanak (Gil *et al.* 1999) gibi çeşitli sebzelerin de antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Bu çalışmada Sigma Chemical Company'den L-tirozin, *p*-nitrofenil asetat ve Sepharose-4B standart serum albumin; E. Merk AG'den sülfanilamit, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum perklorat, brom timol mavisi, sodyum sülfat, sodyum asetat, hidroklorik asit, 2-merkaptotanol, sülfirik asit, fosforik asit, glisin, metanol, izoproponal, akrilamid, etanol, sodyum barbital, G-250, coomassie brilliant blue R-250, N,N'-metilen bisakrilamid ve diğer kimyasal maddeler; laboratuvarından karbondioksit gazı temin edilmiştir. N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, 3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit) asetilkolinesteraz enzimi, asetilkolin tiyoyodür, 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), usnik asit, vulpinik sit ve psoromik asit ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich (GmbH, Sternheim, Germany)'ten alındı.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometre	: Shimadzu, UV mini -1208
pH metre	: Thermo
Hassas terazi	: Denver Instrument
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	: Sanyo, japan
Otomatik pipetler	: Eppendorf ve Socorex
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Firstreem Calypso Mk 1 glass Still

Magnetik karıştırıcı	: Jeio Tech
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük Kuartz Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

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

1. Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon (0,2 M NaHCO₃, pH:8,8) : 16,8 g NaHCO₃, 950 mL saf suda çözüldü, 1N NaOH ile pH:8,8'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
2. Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl /0,1M Na₂SO₄, pH:8,7) : 14,2 g Na₂SO₄ ve 3,0275 g Tris 950 mL saf suda çözüldü, 1 N HCl ile pH:8,7'ye ayarlandı ve hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
3. Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti (25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7): 3,026 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü, 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildi ve hacim 1 litreye tamamlandı.
4. 25 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH: 6,3 (kolona tutunmuş HCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH: 6,3'e titre edildi ve toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
5. Kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (25 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl, pH: 6,3): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH: 6,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.
6. Kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti (0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄, pH: 5,6): 9,187 g NaClO₄ tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol CH₃COONa.3 H₂O, 120 mL saf su içerisinde çözüldü, 1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya ayarlandı ve saf su ile toplam hacim 150 mL'ye tamamlandı
7. CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon (15 M Na₂CO₃ / 0,1 M

NaHCO₃ pH:10): 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃ 1 litre saf suda çözülerek hazırlandı.

8. Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti (0,05 M Tris-SO₄, pH: 7,4): 6,055 g Tris 950 mL saf su içerisinde çözüldü ve 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e ayarlanarak saf su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

9. Proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan çözelti (Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi): 50 mL %95'lik etanol, 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 ile çözüldü, üzerine %95'lik fosforik asit ilave edildi ve saf su ile çözeltinin hacmi 1 litreye tamamlandı.

10. 0,025 M veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp pH:8,2'ye kadar 0,1 M NaOH ile titrasyonundan sonra saf su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

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

12. İndikatör çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,218 g NaHCO₃ 1 litre saf suda çözülerek hazırlandı.

13. %0,04'lük Brom Timol Mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N'lık NaOH içinde çözüldü ve hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

14. Stok fenolik maddelerin çözeltilerinin hazırlanması: Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asit çözeltileri hazırlandı.

a) 10 mg Usnik Asitin üzerine 6 mL DMSO'da çözülerek, DMSO ile hacim 10 mL'ye tamamlandı.

b) 10 mg Vulpinik Asit üzerine 6 mL DMSO'da çözülerek, DMSO ile hacim 10 mL'ye tamamlandı.

c) 6 mg Psoromik Asit Asit üzerine 4 mL DMSO'da çözülerek, DMSO ile hacim 6 mL'ye tamamlandı.

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

1. SDS-PAGE için kullanılan numune tamponu: 1 M 0,65 mL Tris-HCl (pH:6,8), 1 mL %10'luk SDS, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi ve 1 mL %100'lük gliserin karıştırıldı ve saf su ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Bu tamponun öncesinde, 950 µL numune tamponundan 50 µL β merkaptotanol ilave edildi.
2. SDS-PAGE için kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü, üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edildi ve toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
3. Elektroforez jelinin boyanması için kullanılan boyama çözeltisi: %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ve 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250 ile hazırlandı.
4. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 0,8 g bisakrilamid ve 30 g akrilamid 100 mL su ile çözüldü.
5. SDS çözeltisinin hazırlanması (%10'luk): 10 g SDS, 90 g saf su ile çözüldü.
6. Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (3 M, pH 8,8): 36,3 g Tris, 48 mL 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
7. Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.
8. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %10 asetik asit, %50 metanol ve %40 su karışımı hazırlandı.

c) FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

1. 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması: 2,46 g NaCH_3COO alındı ve 80 mL saf suda çözüldü. pH metre ile pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 40 mM'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 0,334 mL %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. 10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,312 g TPTZ alındı ve 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.

4. 20 mM'lık FeCl_3 Çözeltisinin Hazırlanması: 0,54 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve 100 mL saf suda çözüldü.

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

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

1. %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ saf suda çözülerek toplam hacim 150 mL'ye tamamlandı.

2. %0,1'lik FeCl_3 çözeltisinin hazırlanması: 85 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ saf suda çözüldü ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 10 g TCA saf suda çözüldü ve toplam hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

4. 0,2 M pH: 6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g Na_2HPO_4 yaklaşık 180 mL saf suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

e) CUPRAC metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisinin hazırlanması: 47 mg CuCl_2 50 mL saf suda çözüldü.

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

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

f) DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

1. 10^{-3} M'lık DPPH çözeltilisinin hazırlanması: 40 mg DPPH 100 mL etanolda tamamen çözününceye kadar 16 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

g) ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 2,84 g Na_2HPO_4 180 mL saf suda çözündü, pH'sı 6,6'ya ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

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

3. 2,5 mM'lık potasyum persülfat çözeltilisinin hazırlanması: 66,25 mg $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$, 0,1 M'lık pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

h) DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık asetat tamponunun hazırlanması (pH 5,3): 2,05 g CH_3COONa , 230 mL saf suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 5,3'e ayarlanarak, toplam hacim 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.

2. 0,1 M'lık DMPD çözeltilisinin hazırlanması: 209 mg DMPD 10 mL destile suda çözülerek hazırlandı.

3. 0,001 M'lık DMPD^{•+} çözeltilisinin hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltilisinden 1 mL alındı 100 mL'lik ve 0,1 M'lık (pH 5,25) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 mL ve 0,05 M'lık FeCl_3 ilave edilerek hazırlandı.

4. 0,05 M'lık FeCl_3 çözeltilisinin hazırlanması: 0,81 g FeCl_3 100 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

i) Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,05 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,8): 1,42 g Na_2HPO_4 yaklaşık 180 mL saf suda çözülerek pH'sı 7,8'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. $1,33 \times 10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltisinin hazırlanması: 12 mg riboflavin 100 mL, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
3. $4,46 \times 10^{-5}$ M'lık metiyonin çözeltisinin hazırlanması: 0,665 mg metiyonin 100 mL, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.
4. $8,15 \times 10^{-8}$ M'lık NBT çözeltisinin hazırlanması: 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 mL'ye fosfat tamponuyla (pH 7,4, 0,1 M) tamamlandı.

i) Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

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

j) Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

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

k) Bütirilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 30,27 g Tris alındı ve 5mM'lık 0,370 g EDTA 200 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH'sı 8'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
2. 5mM'lık Bütirilkolin Kolin İyodat Çözeltisinin Hazırlanması: 0.007 gr Bütirilkolin kolin İyodat alınarak 50 mL saf suda çözüldü.
3. 0,35mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması: 0.0035 g DTNB alındı 25 mL saf suda çözüldü.

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

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

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

3.3.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması

Alınan taze insan eritrositleri hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını ayırmak için +4°C'de 25.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklı dikkatli bir şekilde alındıktan sonra, çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi (Çoban *et al.* 2008).

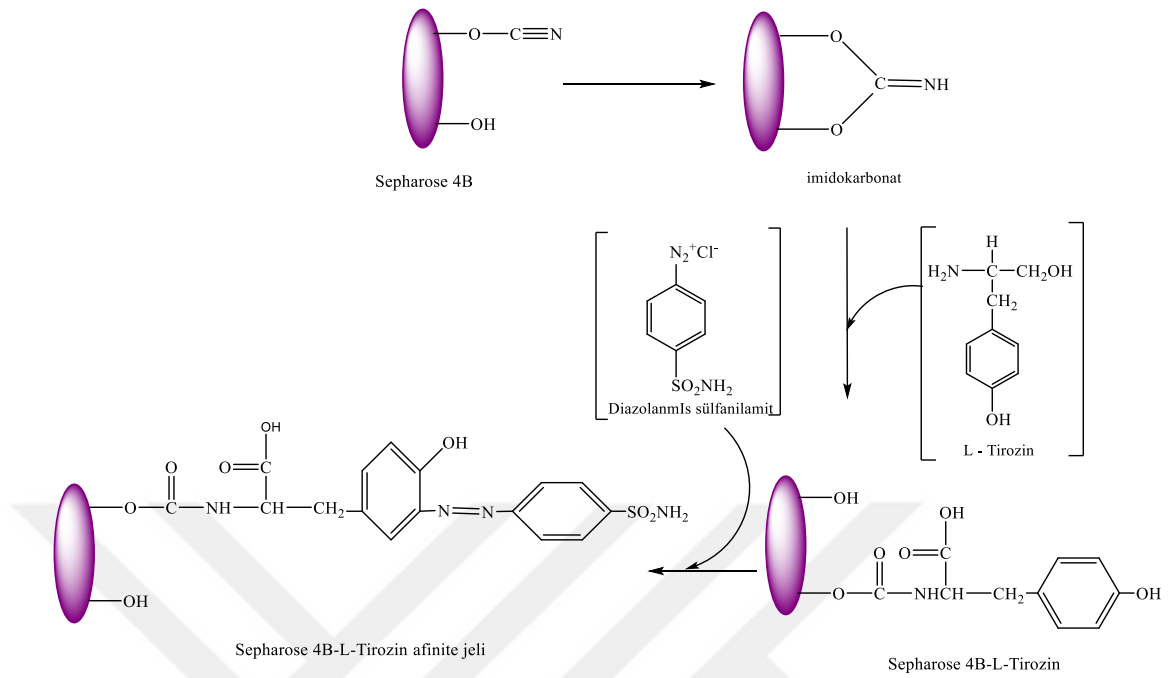
3.3.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

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

Afinite jeli, CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolonun materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldıktan sonra sülfanilamit diazollanarak tirozine tutturuldu. Tirozin, afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimin spesifik olarak bağlanmasını sağlamaktadır. Karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olan Sülfanilamit, söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması için afinite jelinin yapısına girerek kullanıldı (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

b) CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO_3 tamponu (pH: 10) ile yıkandı, bir behere konulup üzerine aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma işlemlerinin, 90 saniyeden daha az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve sonrasında süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı, 16 saat boyunca 4°C sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin bitiminde reaksiyona girmeyen tirozinin tamamen uzaklaştırılabilmesi için, yıkama suyu bol su ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkandı. Yıkama 0,2 M 100 mL NaHCO_3 tamponuyla (pH:8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

c) Sülfanilamit kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamit, 0°C civarında 1 M, 10 mL HCl içinde çözüldü ve üzerine 75 mg NaNO_2 bulunan 0°C'deki 5 mL çözeltiden damla damla ilave edildi. Reaksiyondan 10 dakika sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'a ayarlanarak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı ve 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris- SO_4 (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Aynı tampondan üzerine bir miktar daha ilave edilerek saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1.'de gösterildi.



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

d) Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel, dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alındı, süspanse edildi ve su trombu vasıtasıyla vakumla havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktürüldükten sonra peristaltik pompa vasıtasıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Alınan eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesi kolonun dengelenmiş olduğunu gösterdi.

e) Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu

Santrifüj sonrasında alınan hemolizat, katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlandı, kolona tatbik edildi ve CA enziminin kolona bağlanması ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması için kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Kolona 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) tamponu tatbik edildikten sonra hCA I enzimi,

0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) çözeltisi tatbik edildikten sonra hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı ile elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alındı, 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı.

3.4. CA Enzim Aktivitesi Tayini

3.4.1. Hidrataz aktivitesi

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

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 mL 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 eklendiği andan itibaren indikatörün renginin maviden sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün renginin maviden 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.

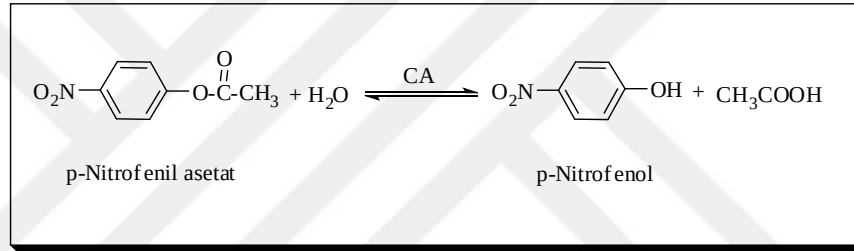
$$EU = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

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.

3.4.2. Esteraz aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olmasına dayanmaktadır. Bu yöntem kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi, *p*-nitrofenilasetat substratını, 348 nm’de absorbsiyon veren *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenole hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



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

348 nm’de *p*-nitrofenolat ve *p*-nitrofenol’ün her ikisi de aynı absorbansı gösterir. Bu nedenle fenol grubunda bulunan H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü değiştirmemektedir (Göçer and Gülçin 2013).

348 nm’de 1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırası ve miktarları aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

Çizelge 3.1. Esteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (pH:7.4, 0.05 M)	400	460
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	360	360
Saf su	240	140
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	1000	1000

Çizelge:1.3'deki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C'de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg kullanılan *p*-nitrofenilasetat, 1mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişliğini hazırlamak, esterın sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere göre hidroliz reaksiyonunu en az inhıbe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Kalitatif protein tayini

Bu metot, proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi ilkesine dayanır (Segel 1968). Bu metotla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün

elüatlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Elüatlar kuvarz küvetlere alındı ve spektrofotometrede absorbansları köre karşı okundu.

3.5.2. Kantitatif protein tayini

Bu metotla saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları belirlendi. Bu metot organik boyaların proteinlerdeki asidik ve bazik gruplarla etkileşip renk oluşturması esasına dayanır. Proteine Coomassie Brilliant Blue G-250 bağlandıktan sonra oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Boyanın proteine bağlanması süratle gelişir. Çözeltilerde protein-boya kompleksi uzun zaman kalır. Bu yöntemdeki hassasiyet 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976). Tayin işlemlerinde takip edilen prosedür şu şekildedir: 1 mL’si 1 mg protein içeren standart sıgır albümin çözeltisi tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL miktarlarında alındı, bütün tüplerin hacmi saf suyla 0,1 mL’ye tamamlandı. Daha sonra bütün tüplere 5 mL renklendirme reaktifi ilave edildi ve vorteksle karıştırıldı. 10 dakikalık süre sonunda 595 nm ve 3 mL’lik küvetlerde absorbans değerleri köre karşı okundu.

0,1 mL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı ve absorbanslara karşılık gelen µg protein değerleri standart grafiğe dönüştürüldü. Protein tayini yapılacak örnekler için aynı metot uygulandı ve standart grafikten miktar tayini belirlendi.

3.6. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

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

İnsan kanından saflaştırılan CA enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlemek amacıyla en az 5 değişik substrat konsantrasyonu kullanıldı ve optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek, grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (1970). Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptoetanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin %20 ayırma jelinde elektrofözezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban *et al.* 2008).

3.8. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin Etkilerinin Belirlenmesi

Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin, saflaştırılan CA izoenzimleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemiyle yapıldı. Daha sonra IC₅₀ ve K_i değeri bulundu ve inhibisyon türleri belirlendi.

3.9. Antioksidan Çalışmaları

3.9.1. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme (FRAP metodu)

İndirgeme kuvveti tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmiş şekline göre yapıldı (Gülçin 2009). Bunun için öncelikle 1mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere konuldu, hacim saf su ile 1 mL'ye getirildi. Sonrasında her bir tüpe 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH:6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyumferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] ilave edildi ve karışım 50°C'de 20 dk inkübe edildi. Bu reaksiyon karışımına sırasıyla 2,5 mL %10'luk triklorasetik asit (TCA) ve 0,5 mL FeCl₃ (%0,1) ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Köz olarak saf su, kontrol için numune yerine su kullanıldı.

3.9.2. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme

Fenolik yapıdaki bileşiklerin Cu^{2+} indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif bir modifikasyonu ile yapıldı (Ak and Gülçin 2008).

Glutatyon ve non-protein tiyollar gibi tiyol-türü antioksidanları ölçebilir (Gülçin and Daştan 2007; Karaman *et al.* 2009). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşik tüplerine 0,25 mL bCuCl_2 çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolik neokuprin çözeltisi ($7,5 \times 10^{-3}$ M) ve 0,25 mL NaCH_3COO tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla ilave edildi. Yarım saatlik süre sonunda 450 nm’de köre karşı gelen absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak saf su kullanıldı.

3.9.3. FRAP indirgeme

Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asit ve standart çözeltiler aktarılır. Hacimleri 0,5 mL’ye tampon çözelti ile tamamlanır. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 μL 20 mM’lık FeCl_3 çözeltisi ve hazırlanışı yukarıda belirtilen FRAP reaktifinden 2250 μL ilave edilerek toplam hacmin 5 mL’ye tamamlanır. Deney tüpleri Vortex’de karıştırılır ve 10 dakika sonra 593 nm’de absorbansları kaydedilir. Kör olarak asetat tamponu kullanılır

3.9.4. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme

Başlangıçta 7 mM’lık ABTS çözeltisi hazırlandı, üzerine 2,45 mM’lık persülfat çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek ABTS radikalleri üretilirdi. ABTS radikal çözeltisinin kullanılmasından önce kontrol çözeltisinin 734 nm’deki absorbansı fosfat tamponuyla $0,700 \pm 0,025$ nm’ye ayarlandı. Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına (10-30 $\mu\text{g/mL}$) birer mL ABTS radikal çözeltisi eklendikten sonra yarım saat inkübe edildi ve 734 nm’de absorbanslar köre karşı okundu. Etanol kör olarak kullanıldı.

3.9.5. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikal giderme

DPPH[•]'ın 10^{-3} M'lık çözeltisi serbest radikal olarak, daha önce hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyona sahip fenolik bileşiklerin stok çözeltisi ise numune olarak kullanıldı. Deney tüplerine sırasıya 10, 20 ve 30 µg/µL konsantrasyonlarında stok çözeltiler konuldu, etanol ile tüplerin toplam hacimleri 2 mL'ye tamamlandı. Stok DPPH[•] çözeltisinden her bir numune tüpüne 1 mL ilave edildi. Oda sıcaklığı ve karanlıkta yarım saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Kontrol olarak, 3 Ml etanol ve 1 mL DPPH[•] çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans miktarı, geriye kalan DPPH[•] çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

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

N,N'-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (1999). Önce renkli radikal katyon (DMPD^{•+}) oluşturuldu. Bunun için 100 mL'lik DMPD çözeltisinin (pH: 5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 mL FeCl₃ ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 mL'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı. DMPD^{•+} radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik dansitesi FeCl₃ çözeltisi ile $0,900 \pm 0,100$ nm'ye ayarlandı.

Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asiti ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10–30 µg/mL) deney tüplerine aktararak saf suyla hacimleri 0,5 mL'ye tamamlandı ve üzerlerine 1 mL DMPD^{•+} çözeltisi eklenere 50 dakikalık bir inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sonra absorbans değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.9.7. Süperoksit anyon radikali (O_2^-) giderme

Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitesi, nitroblue tetrazoliumun (NBT) spektrofotometrik ölçümü vasıtasıyla ortaya çıkarıldı (Zhishen *et al.* 1999). Daha önce hazırlanan stok çözeltiler bu amaç için de kullanıldı. Bunun için numune ve standartların farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lık ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu çözeltisinin üzerine sırasıyla riboflavin, metiyonin ve NBT'den $1,33 \times 10^{-5}$, $4,46 \times 10^{-5}$ ve $8,15 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonlarına karşılık gelen miktarları eklendi. Oluşan reaksiyon karışımları 40 dakika boyunca oda sıcaklığında 20 W'lık floresan ışığı altında bekletildikten sonra 560 nm'de absorbansları okundu. Kör olarak saf su kullanıldı.

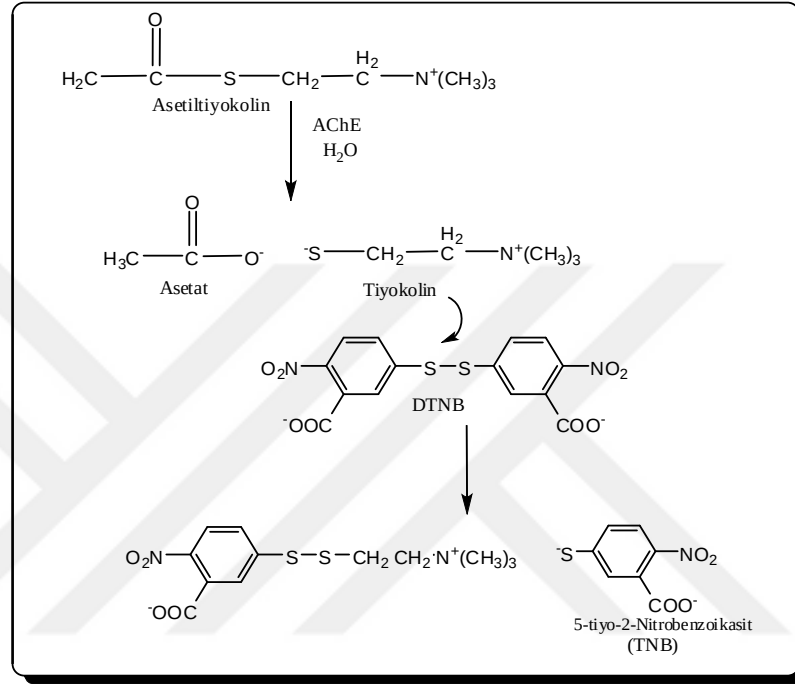
3.9.8. Bipiridil Ferröz İyonları (Fe^{2+}) şelatlama

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

3.10. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin Etkilerinin Belirlenmesi

Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin, Asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Asetilkolinesteraz yöntemiyle yapıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesteraz enzimleri, asetilkolinin tiyokolin ile asetata parçalanma reaksiyonunu katalizlerler. DTNB ile tiyokolinin reaksiyonu sonucu sarı

renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Meydana gelen rengin ölçümü 412 nm dalga boyunda yapılır (Ellman *et al.* 1961). Örnek ve kör kuvvetlerinin absorbansları 0. ve 5. dakikalarda 412 nm’de ölçülür.



Şekil 3.3. Asetilkolinesteraz aktivitesinin Ellman metoduyla tayini (Ellman *et al.* 1961)

Çizelge 3.2. Asetilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-HCl	100	100
Saf Su	770	760
İnhibitör	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	30	30
Asetilkolintiyoiyodür	50	50

3.11. Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin Etkilerinin Belirlenmesi

Usnik Asit, Vulpinik Asit ve Psoromik Asitin BChE üzerindeki etkisi araştırıldı. Daha sonra IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi. Bu metodun esası ise şu şekilde açıklanabilir; yukarıda bahsedildiği üzere Kolinesteraz enzimleri, asetilkolinin tiyokolin ile asetata parçalanma reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonuyla sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit meydana gelir. Meydana gelen rengin ölçümü 412 nm dalga boyunda yapılır (Ellman *et al.* 1961). Örnek ve kör kuvvetlerinin absorbansları 0. ve 5. dakikalarda 412 nm'de ölçülür.

Çizelge 3.3. Bütirilkolinesteraz yöntemi ile yapılan çalışmanın kuvvet içeriği

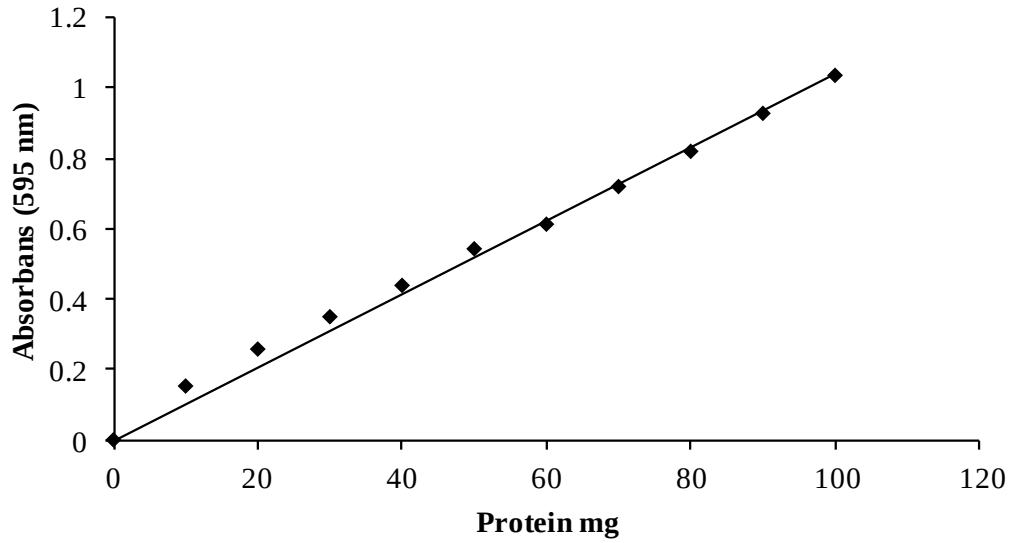
Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (μ L)	Numune Tüpü
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
İnhibitör	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Bütirilkolintiyoiyodür	50	50

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.1.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

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

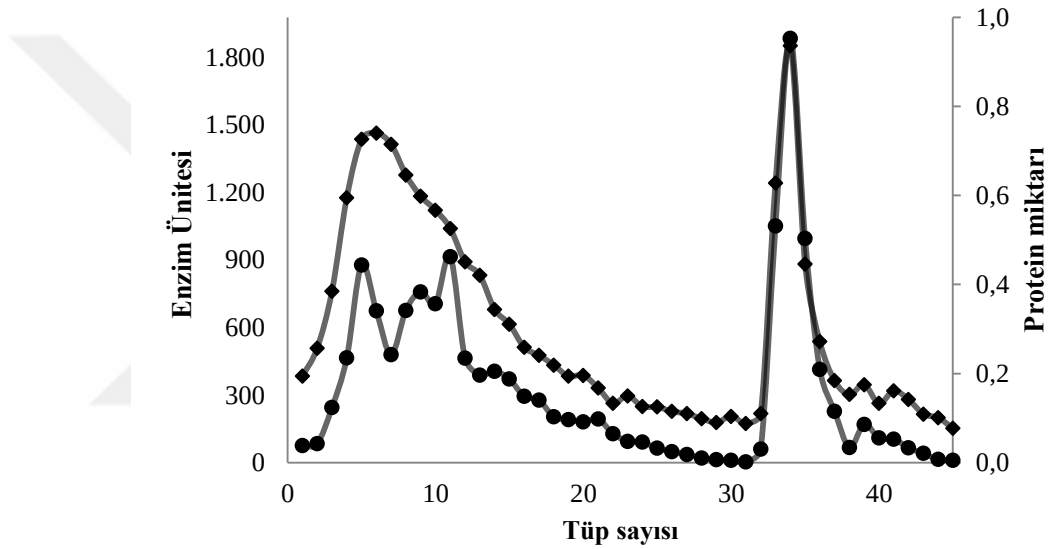


Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik

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

İnsan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı.

Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona yüklendi. Kolondan önce 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) tamponu geçirilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1.5'er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.2' de gösterildi.



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

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

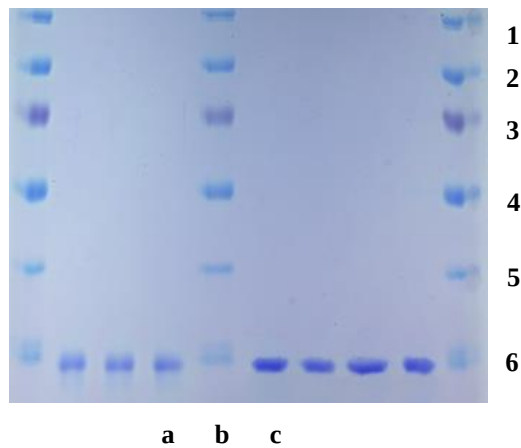
İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizatın Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı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

Çizelge 4.1. Afinite kolonu yardımıyla insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

Numune Türü		Aktive (EÜ/mL)	Toplam Hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein(mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite	Verim (%) (EÜ/mg)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat		1410	23	119,66	2752,18	32430	11,78	100	1
Sepharose-4B- L-tirozin- sülfanilamid afinite kolon	CA – I	444,44	12	0,10	1,20	5333,28	4444.40	16,44	377,28
	CA – II	2700	4,5	0,28	1,26	12150	9642,85	37,46	818,57

4.1.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamid jel elektroforezine saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).



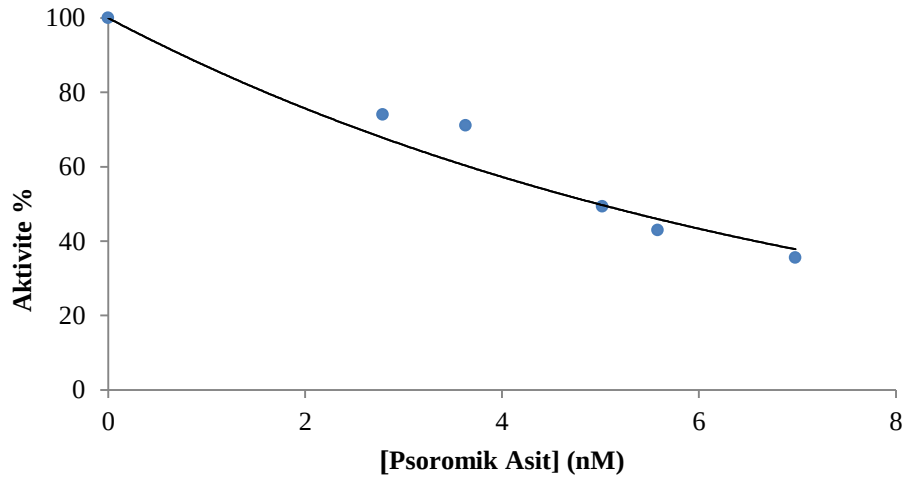
Şekil 4.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

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

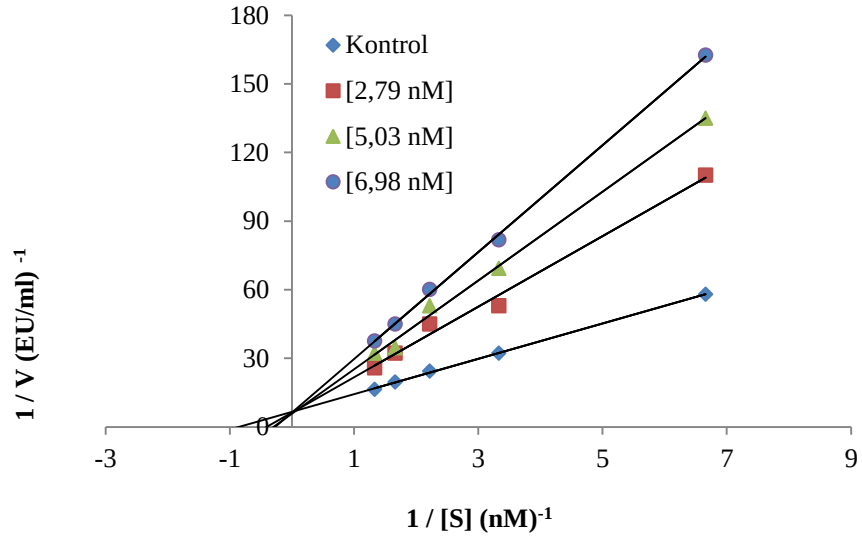
4.1.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid bileşikleriyle ilgili sonuçları

a) hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid bileşikleriyle ilgili sonuçları

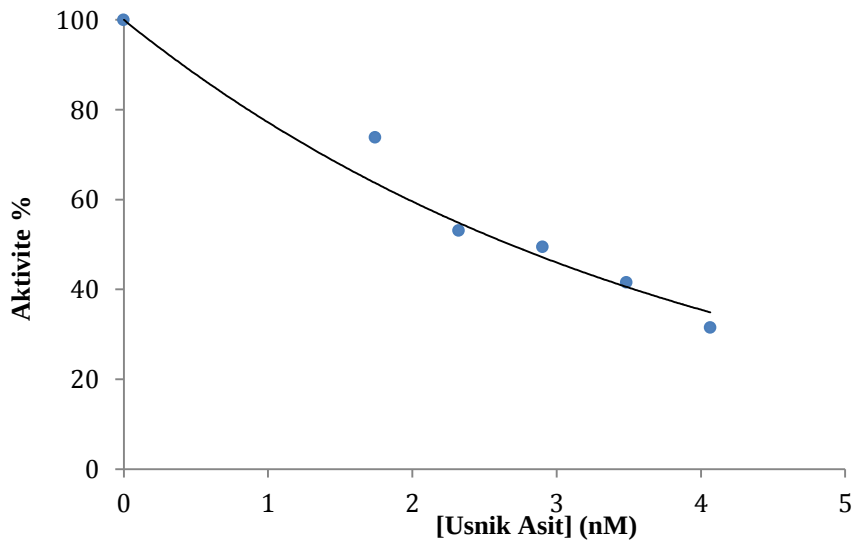
Doygun substrat konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamidin saflaştırılan hCA I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen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



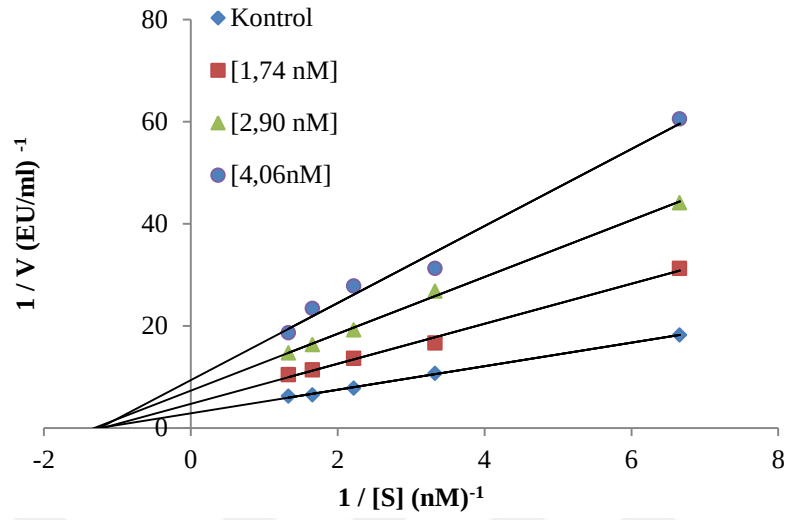
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği



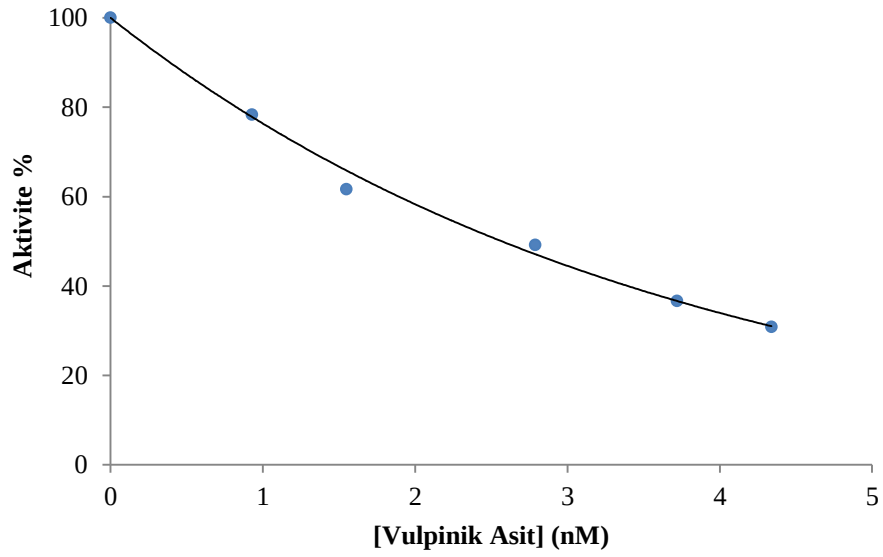
Şekil 4.5. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



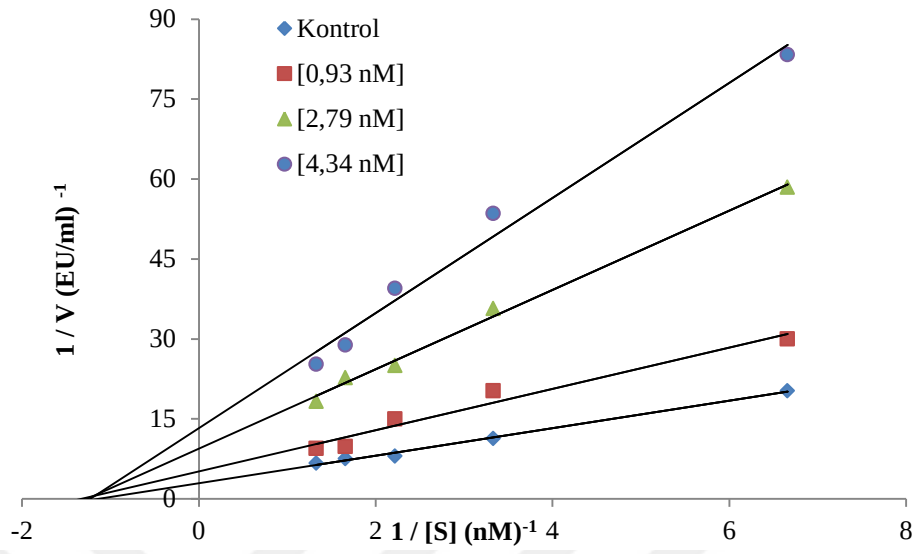
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği



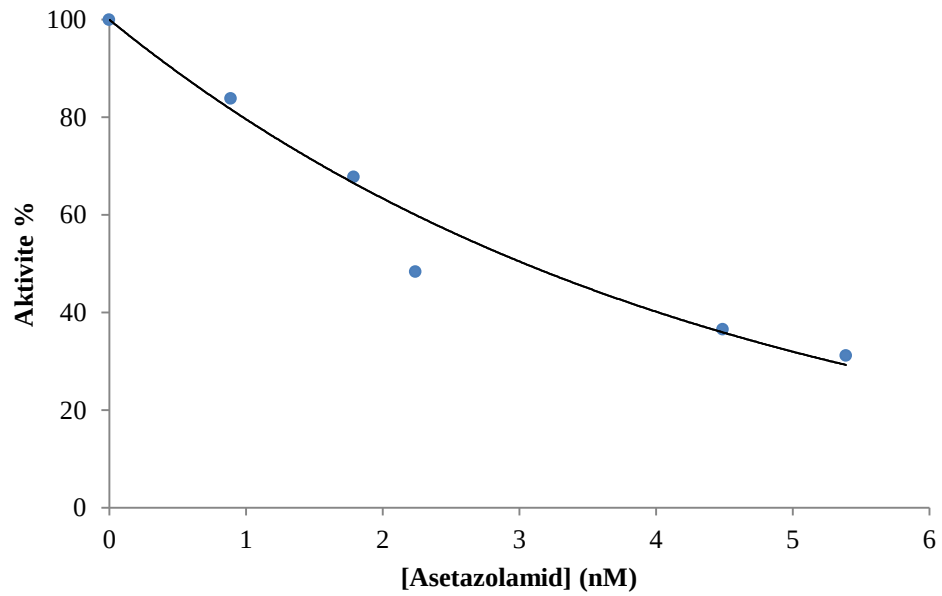
Şekil 4.7. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



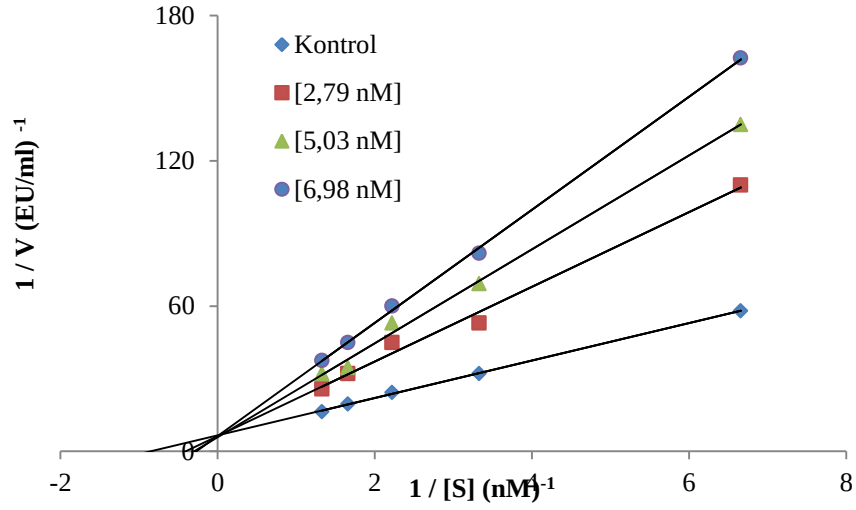
Şekil 4.8. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği



Şekil 4.9. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği



Şekil 4.11. hCA I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

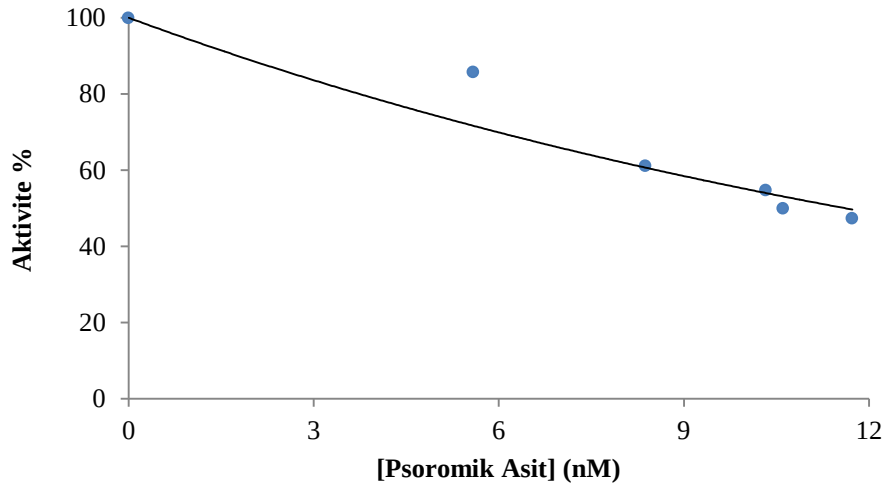
Çizelge 4.2. hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid'in K_i değeri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	IC_{50}	K_i Ortalama	İnhibisyon	R^2
	(nM)	(nM)	Türü	
Psoromik asit	4,985	2,833	Yarışmalı	0,9424
Usnik asit	2,675	2,133	Yarışmasız	0,9571
Vulpinik asit	2,566	1,246	Yarışmasız	0,9939
Asetazolamid	3,039	4,246	Yarışmalı	0,9521

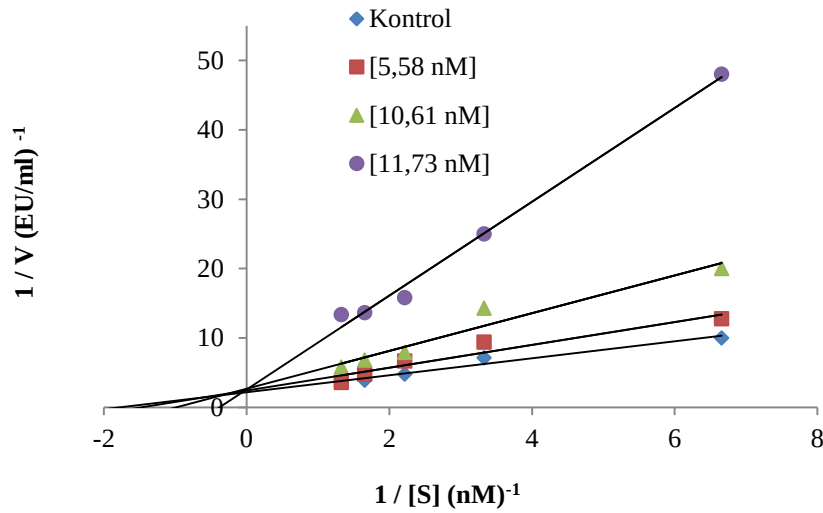
b) hCA II izoenziminin esterez aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asit ile ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin, saflaştırılan hCA II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

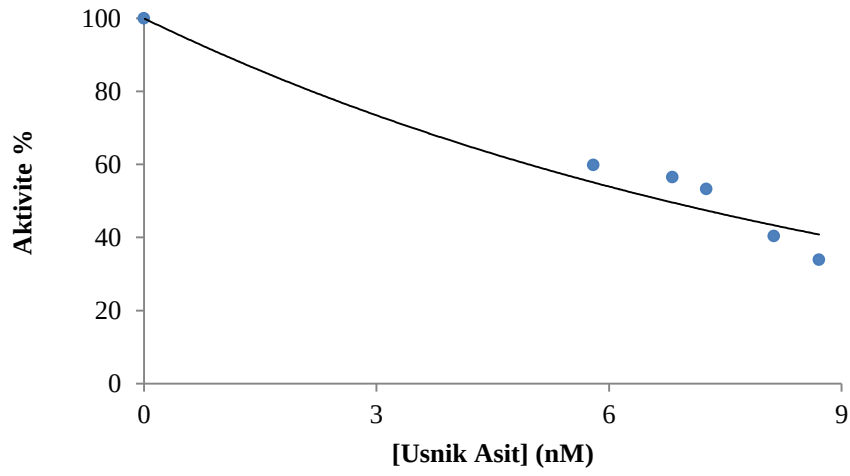
Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite (%) - [I] ve K_i grafikleri çizildi. Ve çizilen grafiklerden her bir madde için K_i değerleri hesaplandı.



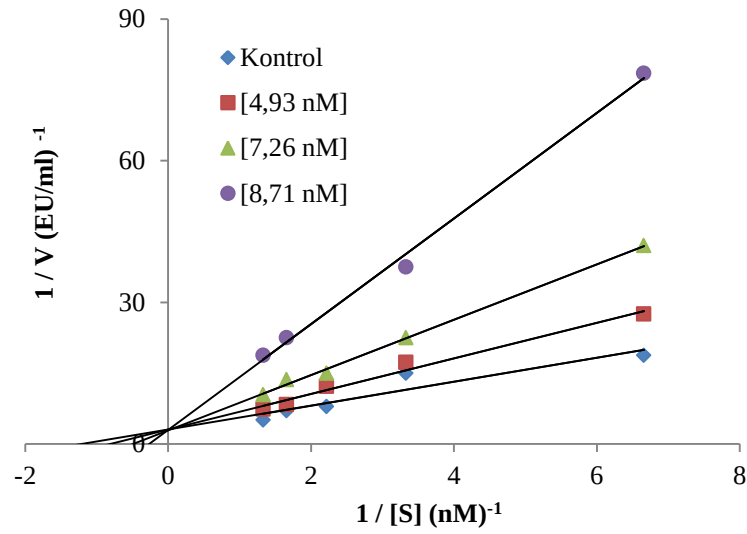
Şekil 4.12. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Psoromik Asit] grafiği



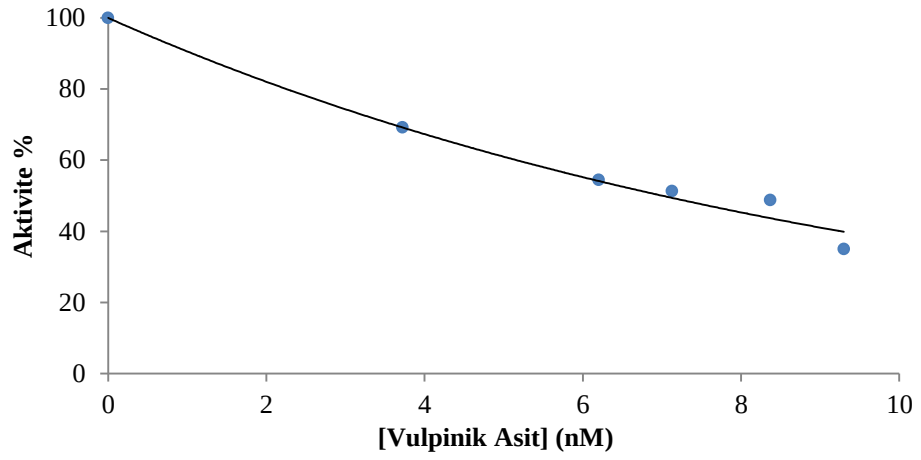
Şekil 4.13. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



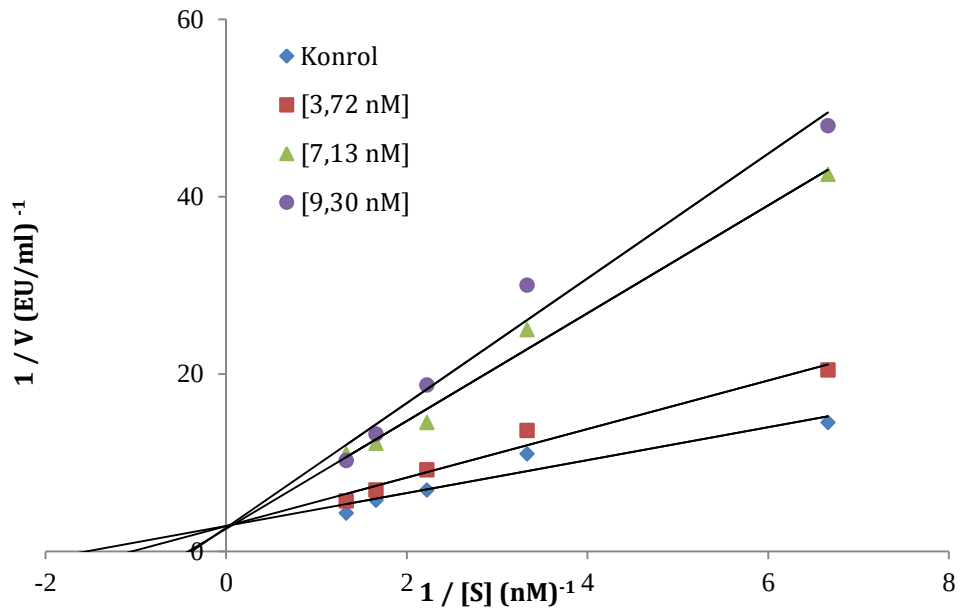
Şekil 4.14. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği



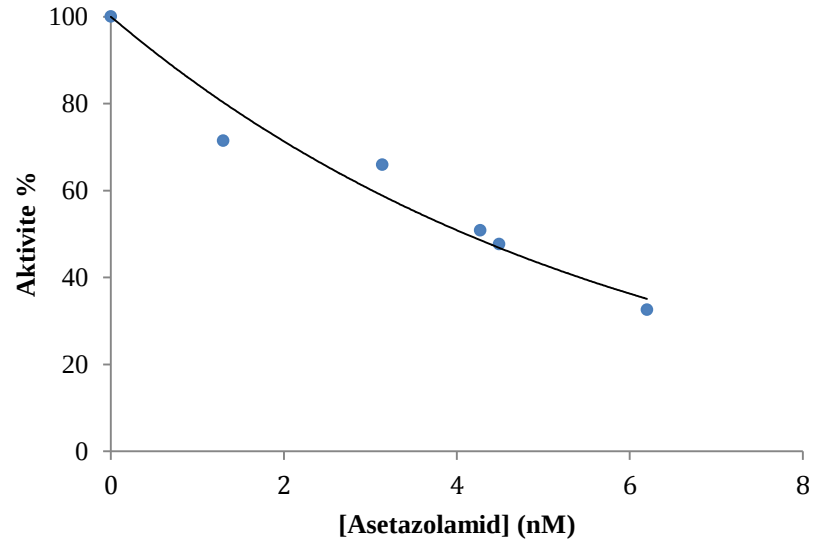
Şekil 4.15. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



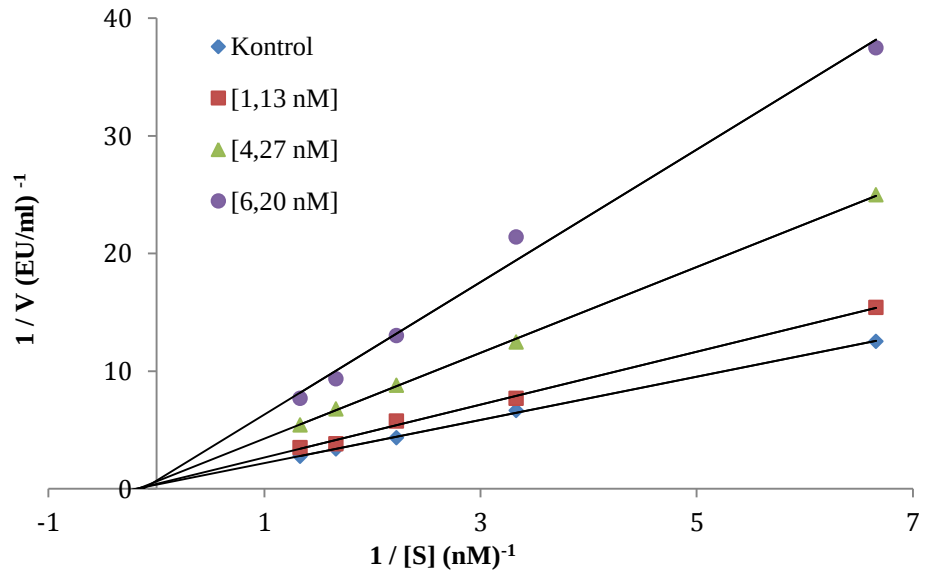
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği



Şekil 4.17. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı Asetazolamid Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] grafiği



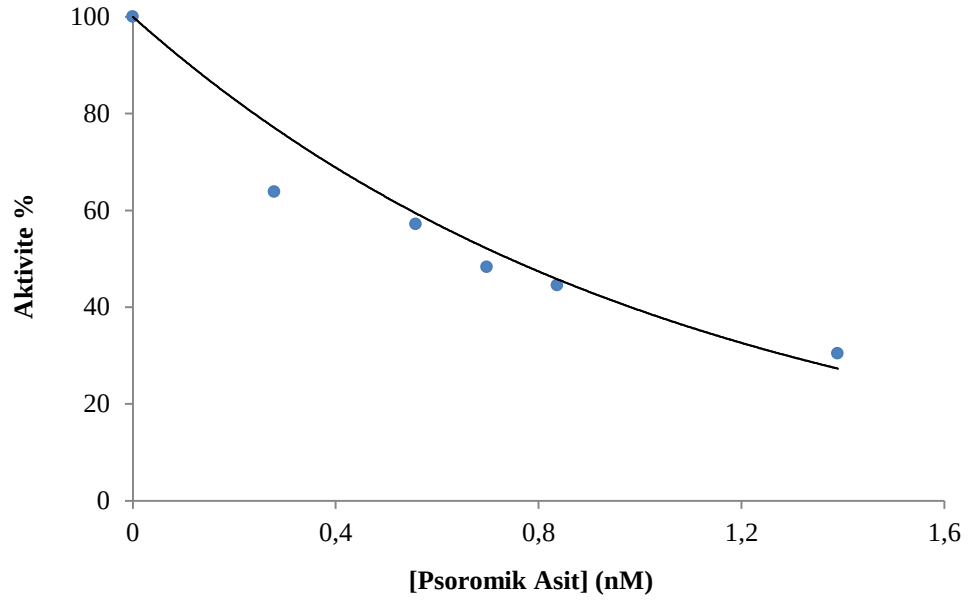
Şekil 4.19. hCA II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Asetazolamid konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.3. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit ve Asetazolamid'in K_i değerleri ve inhibisyon türleri

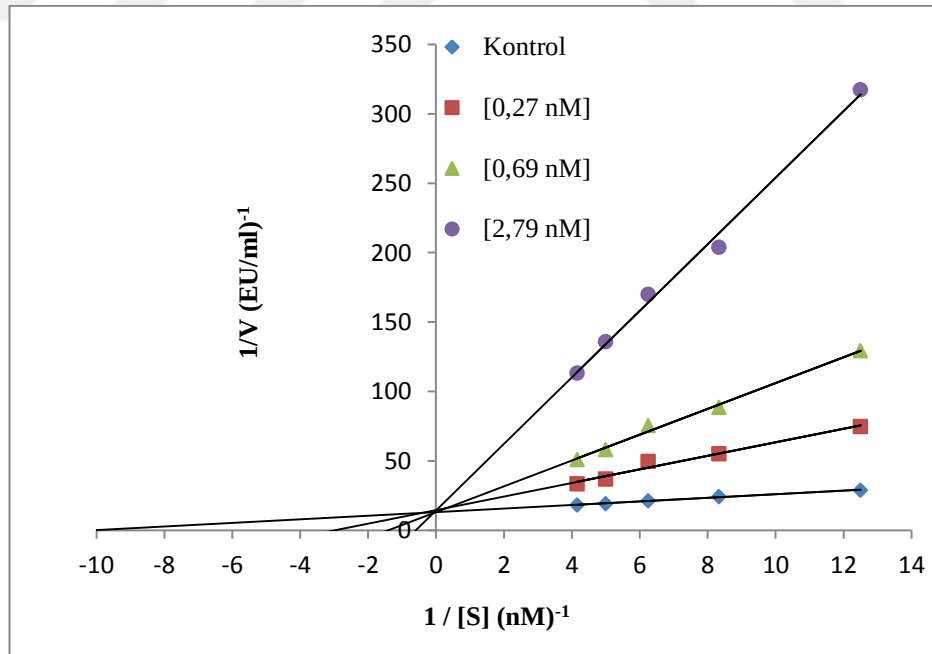
İnhibitör	IC₅₀	K_i Ortalama	İnhibisyon	R²
	(nM)	(nM)	Türü	
Psoromik asit	11,550	14,230	Yarışmalı	0,9170
Usnik asit	6,730	5,900	Yarışmalı	0,8890
Vulpink asit	7,00	4,560	Yarışmalı	0,9514
Asetazolamid	4,100	6,430	Yarışmasız	0,9540

4.2. Asetilkolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit ve Takrin'in inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

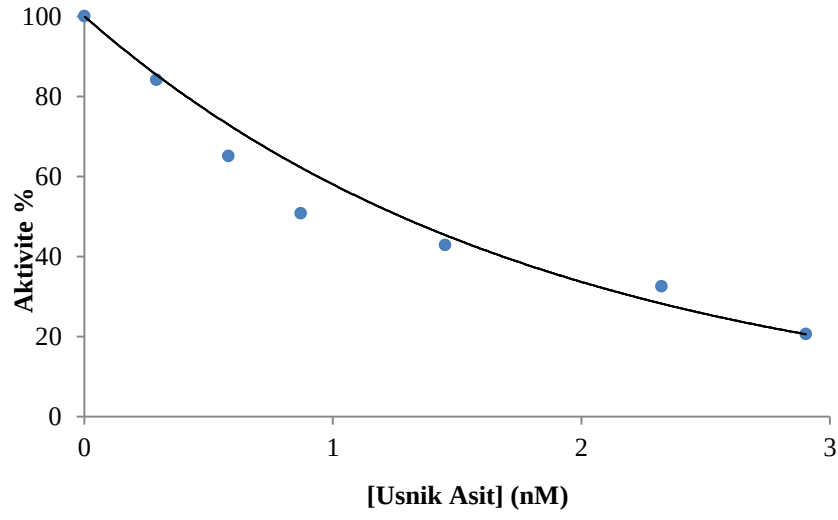
Doygun substrat konsantrasyonunda Asetilkolinesteraz enzimi için Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit ve Asetazolamid'in inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler Asetilkolin esteraz yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



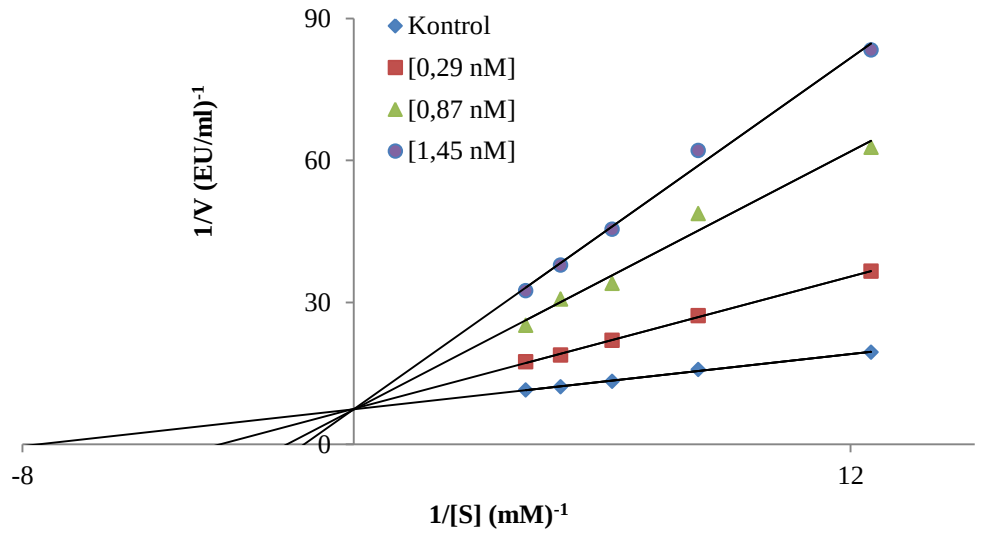
Şekil 4.20. Asetilkolin esteraz enziminin Asetilkolinesteraz yöntemiyle çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Psoromik Asit] grafiği



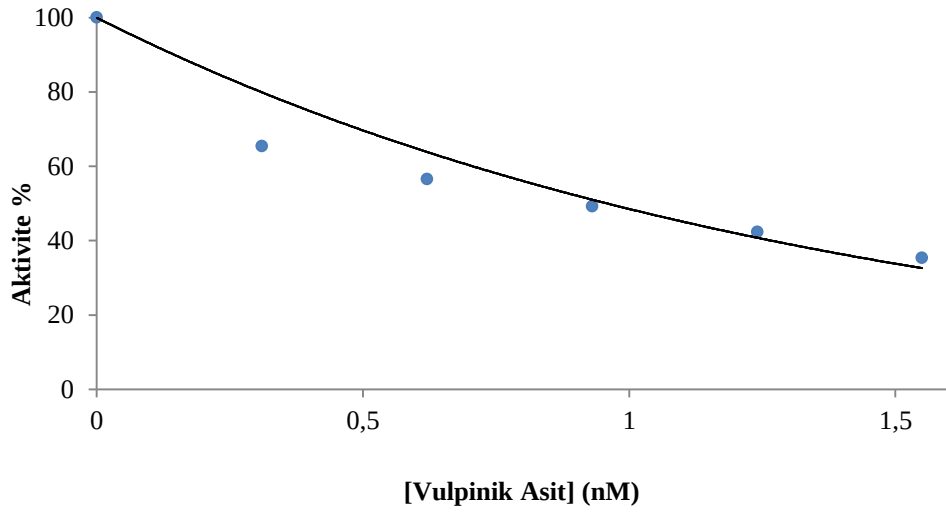
Şekil 4.21. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



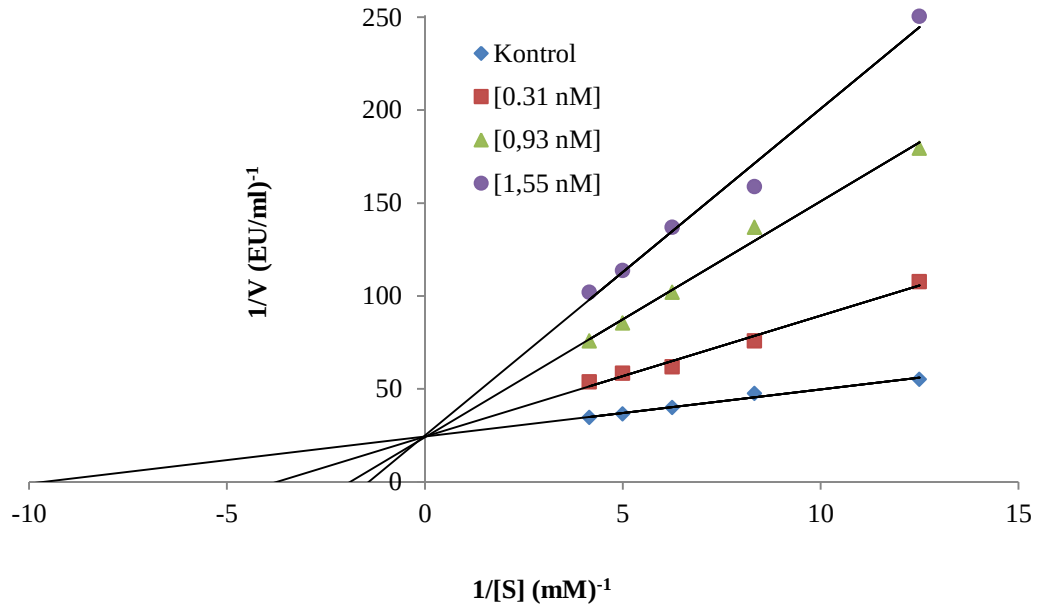
Şekil 4.22. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği



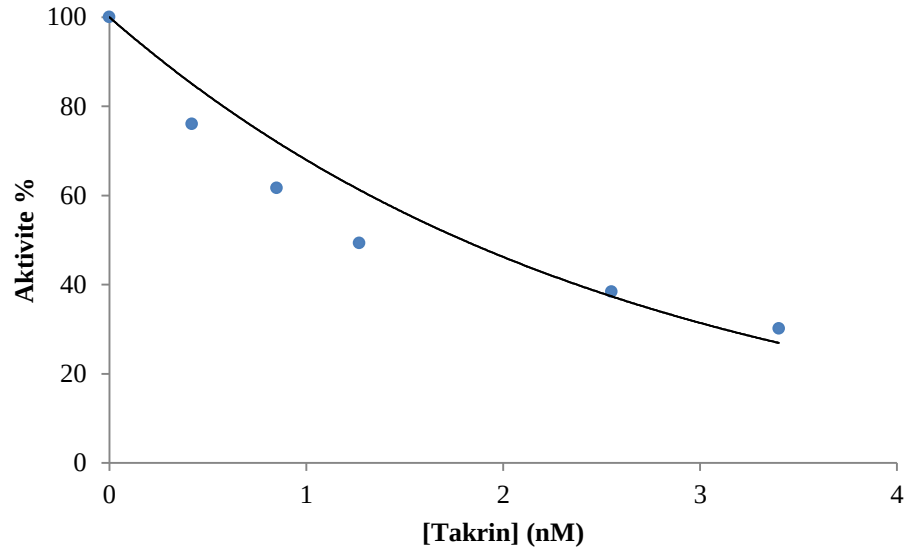
Şekil 4.23. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



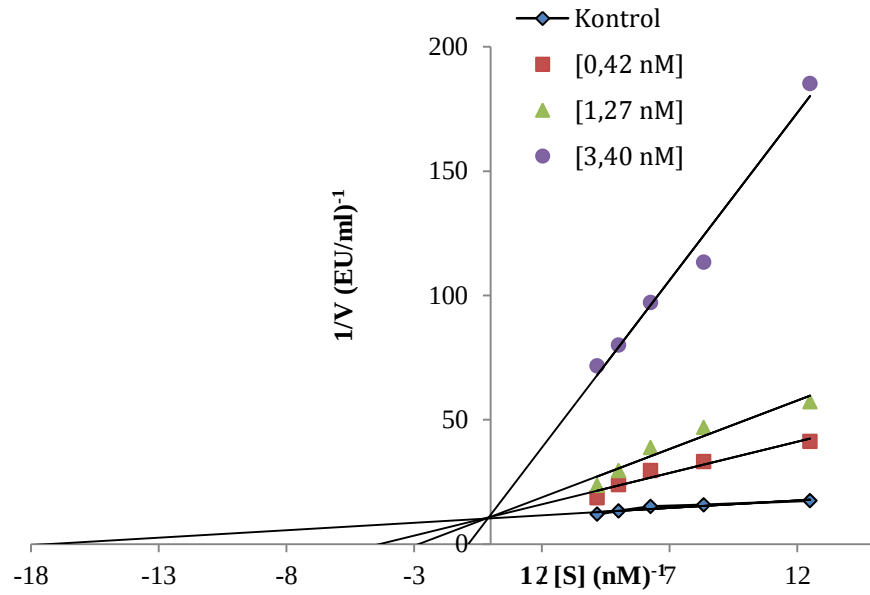
Şekil 4.24. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Vulpinik Asit] grafiği



Şekil 4.25. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.26. Asetilkolinesteraz enziminin 5 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Takrin] grafiği



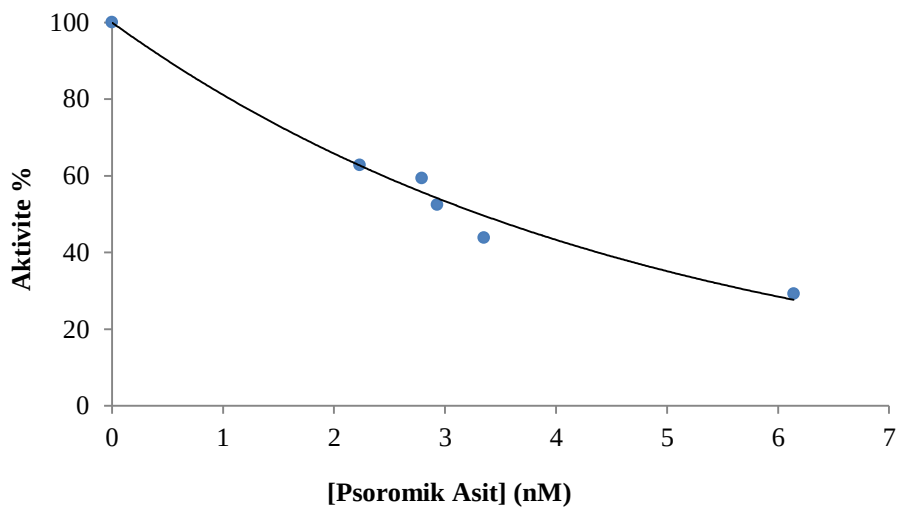
Şekil 4.27. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.4. Asetilkolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri

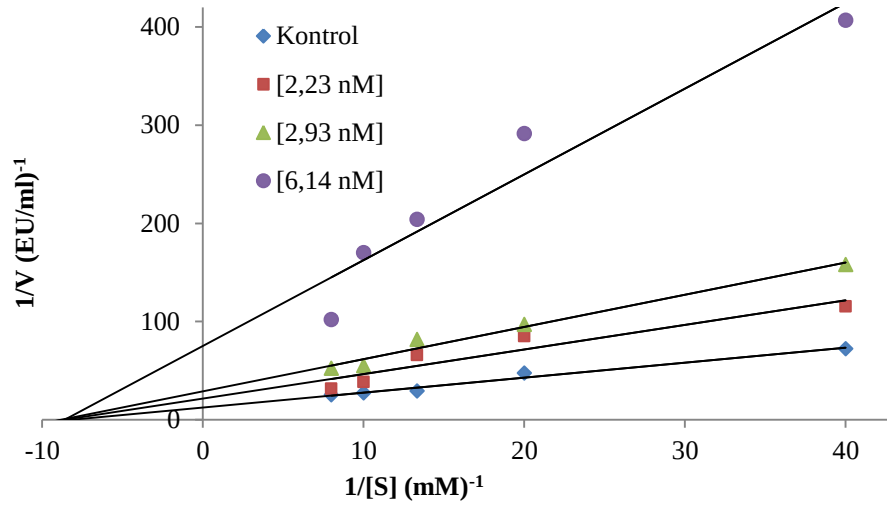
İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	K _i Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	R ²
Psoromik asit	0,742	0,122	Yarışmalı	0,9301
Usnik asit	1,273	0,239	Yarışmalı	0,9572
Vulpinik asit	0,958	0,227	Yarışmalı	0,9031
Takrin	1,795	0,160	Yarışmalı	0,9008

4.3. Bütirilkolinesteraz enziminin aktiviteleri üzerine Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin inhibisyon etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

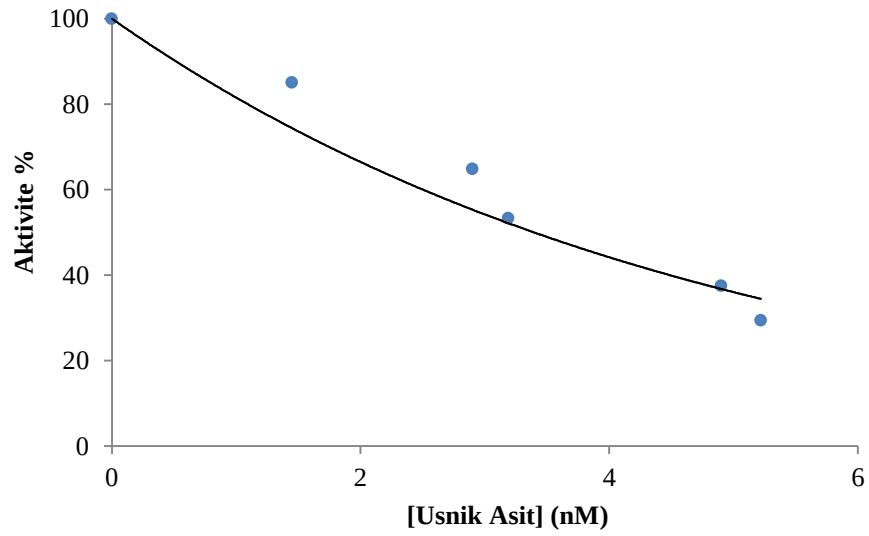
Doygun substrat konsantrasyonunda Bütirilkolinesteraz enzimi için Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler kolin esteraz yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir madde bileşik için K_i değerleri hesaplandı.



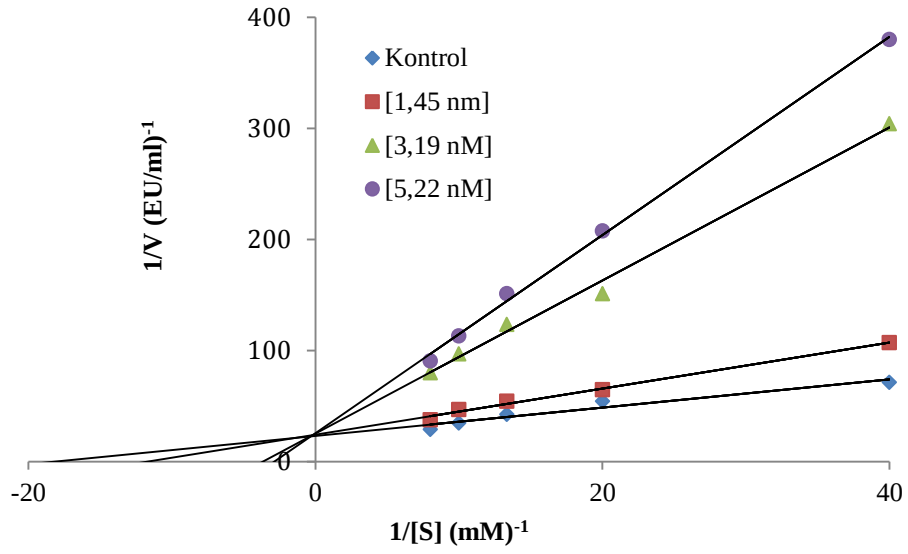
Şekil 4.28. Bütirilkolinesteraz enziminin Ellman yöntemiyle ile çalışılan 5 farklı Psoromik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Psoromik Asit] grafiği



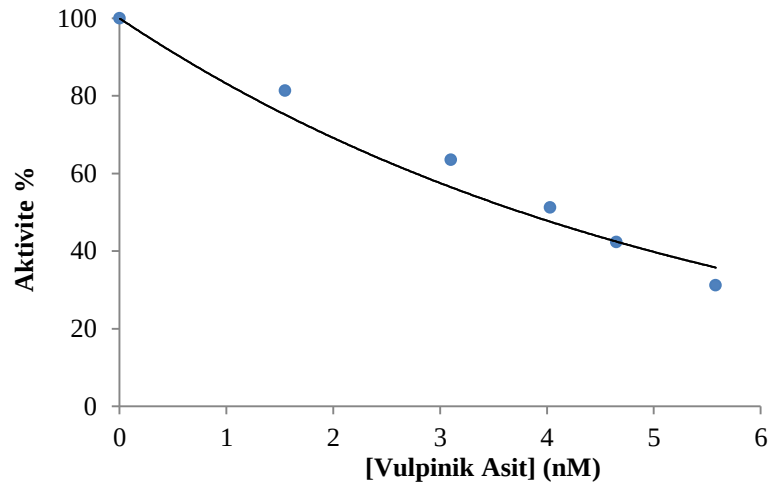
Şekil 4.29. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Psoromik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



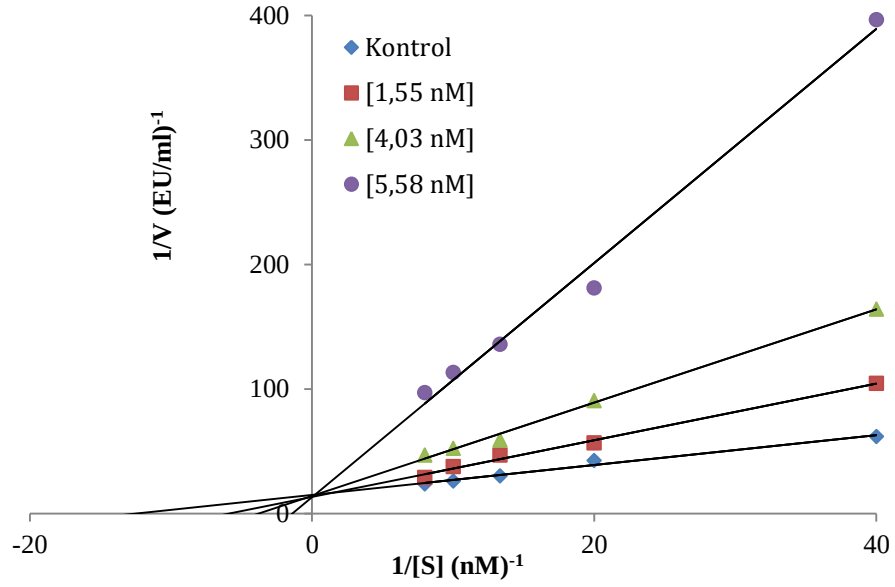
Şekil 4.30. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Usnik Asit] grafiği



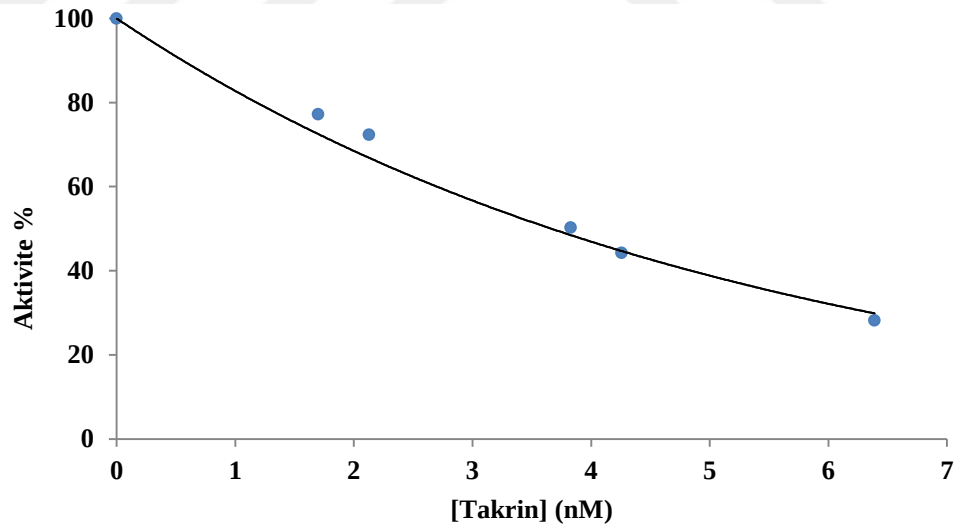
Şekil 4.31. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Usnik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



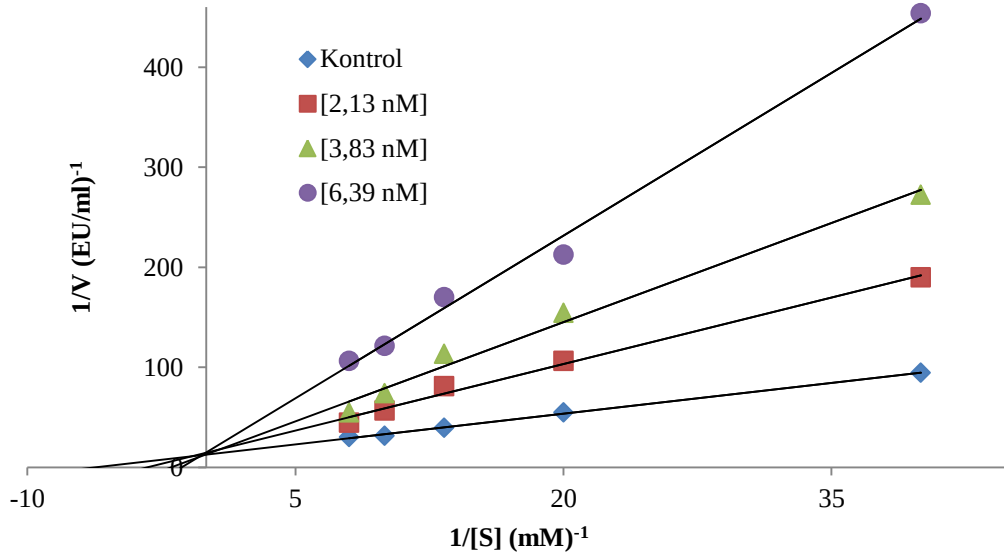
Şekil 4.32. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Vulpinik Asit] grafiği



Şekil 4.33. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Vulpinik Asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.34. Bütirilkolinesteraz enziminin 5 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği



Şekil 4.35. Bütirikolinesteraz enzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Takrin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.5. Bütirikolinesteraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in K_i değeri ve inhibisyon türleri

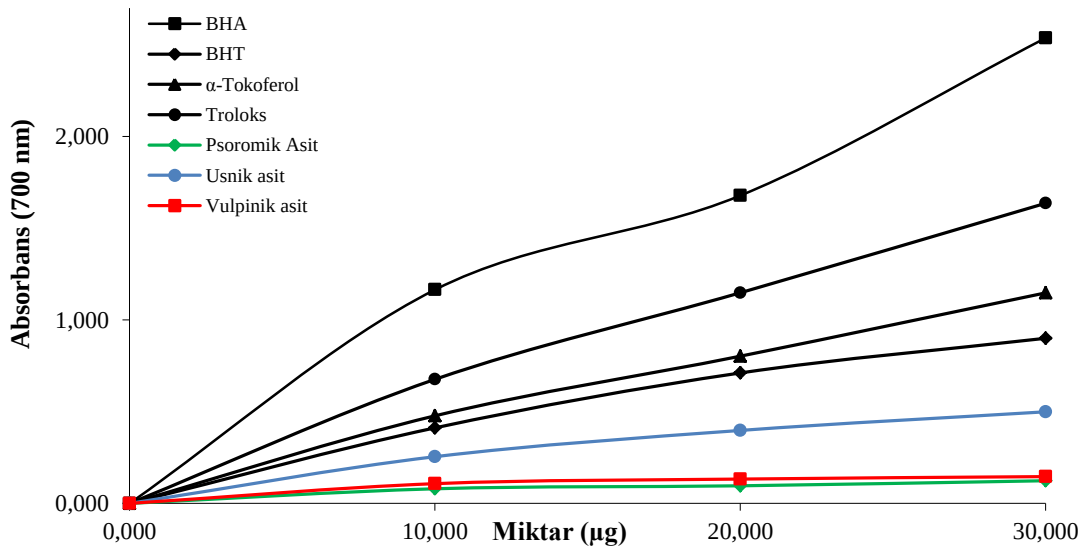
İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	K _i Ortalama (nM)	İnhibisyon Türü	R ²
Psoromik asit	3,315	2,079	Yarışmasız	0,9723
Usnik asit	3,397	1,425	Yarışmalı	0,9376
Vulpinik asit	3,766	1,302	Yarışmalı	0,9519
Takrin	3,666	1,984	Yarışmalı	0,9587

4.4. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.4.1. Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kuvveti bulguları

Bu metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlarda yeşil renge dönüşmektedir (Gülçin 2006b; Gülçin *et al.* 2006). Çalışmada kullanılan Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik

asitin indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit indirgeme potansiyel farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.36).

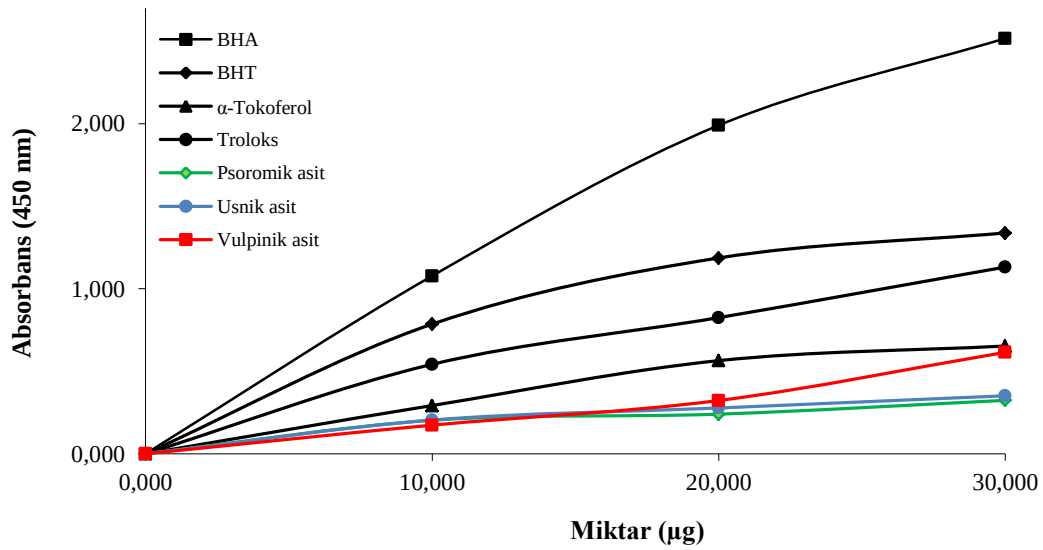


Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.36) her bir standart antioksidan ve Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin için 20 $\mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.6'da verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları $\text{BHA} > \text{Troloks} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{BHT} > \text{Usnik Asit} > \text{Psoromik Asit} > \text{Vulpinik Asit}$ şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca Çizelge 4.6'da gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

4.4.2. Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kuvveti (CUPRAC metodu) bulgular

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.37). Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.37) her bir standart antioksidan, Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin için 20 $\mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.6'da verilerek birbirleriyle mukayese edildi.



Şekil 4.37. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Bu konsantrasyonda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında $\text{BHA} > \text{BHT} > \text{Trolox} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{Vulpinik Asit} > \text{Usnik Asit} > \text{Psoromik Asit}$ şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi.

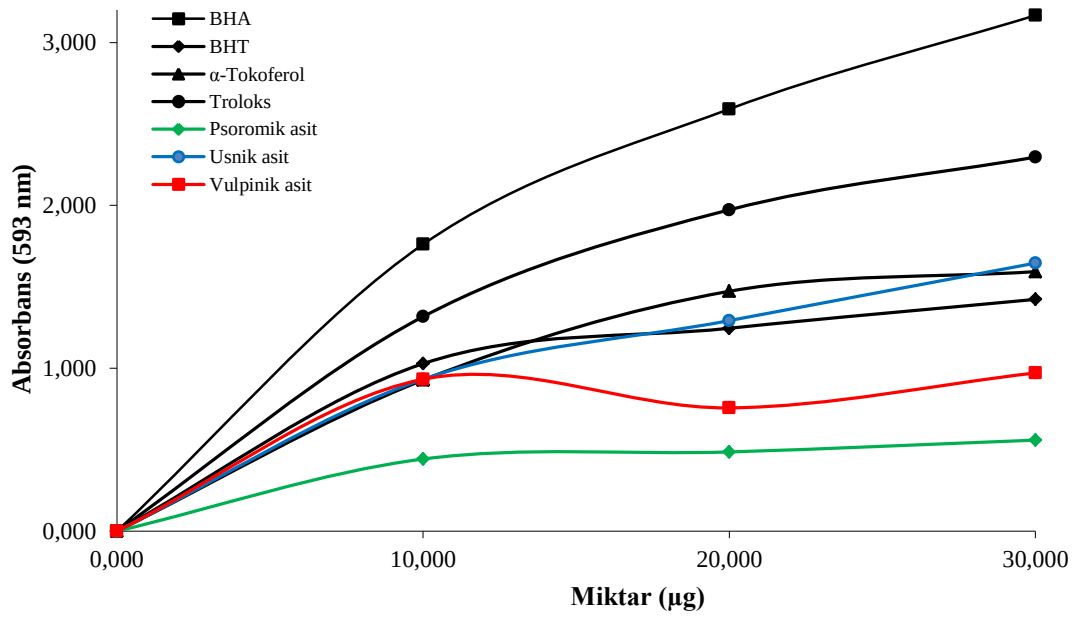
Çizelge 4.6. 20 µg/mL konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpink asit çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Metodu	CUPRAC Metodu	FRAP Metodu
BHA	1,677	1,990	2,591
BHT	0,711	1,187	1,246
α-Tokoferol	0,802	0,564	1,473
Troloks	1,148	0,825	1,973
Psoromik asit	0,258	0,240	0,486
Usnik Asit	0,278	0,277	1,293
Vulpinik Asit	0,096	0,323	0,757

4.4.3. Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottur. Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{2+}) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm’de maksimum absorbans gösterir. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.22). Ayrıca Çizelge 4.6’da ise 20 µg/mL’deki absorbanslarının mukayese edildi.

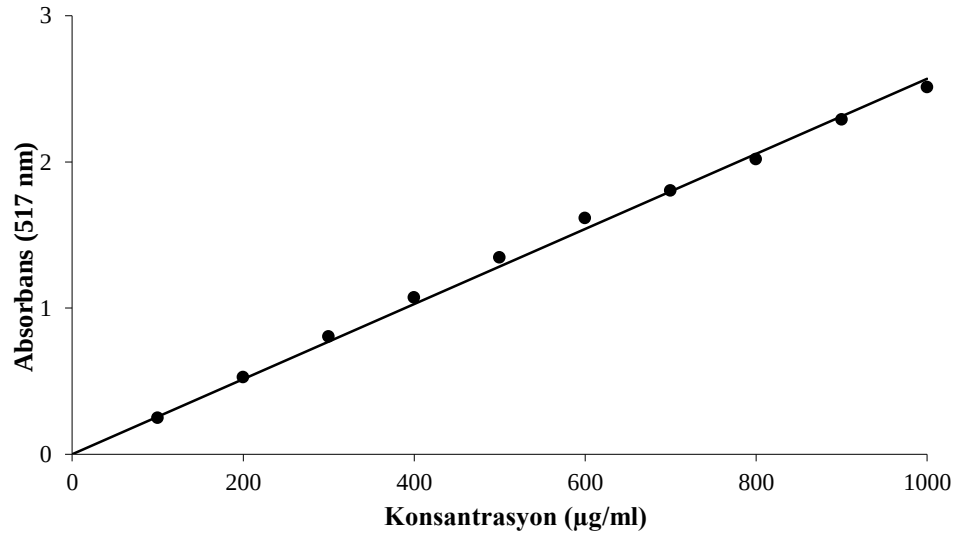
Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin standart antioksidanlarla mukayesesi yapıldı ve BHA > Troloks > α -Tokoferol > BHT > Usnik asi > Vulpinik asit > Psoromik asit şeklinde bir sıralama gözlemlendi.



Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin FRAP metoduna göre indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve trolox ile karşılaştırması

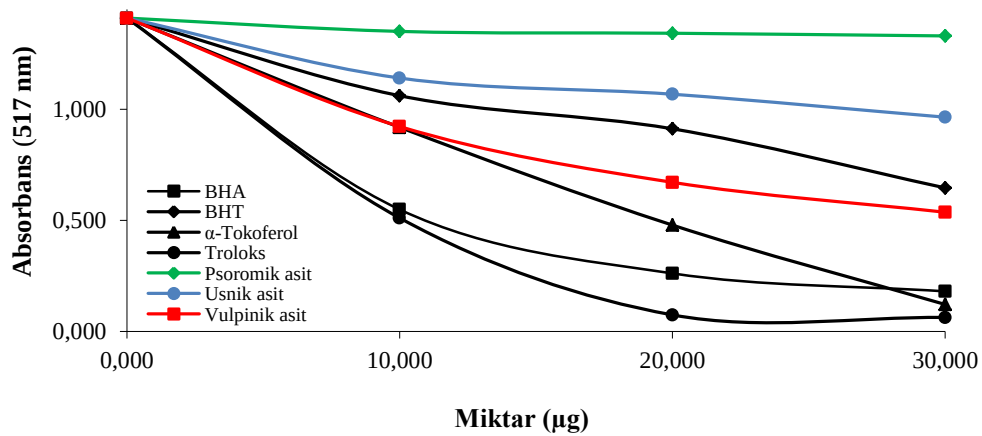
4.4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve trolox gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu (r^2 : 0,9966) (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.40'da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

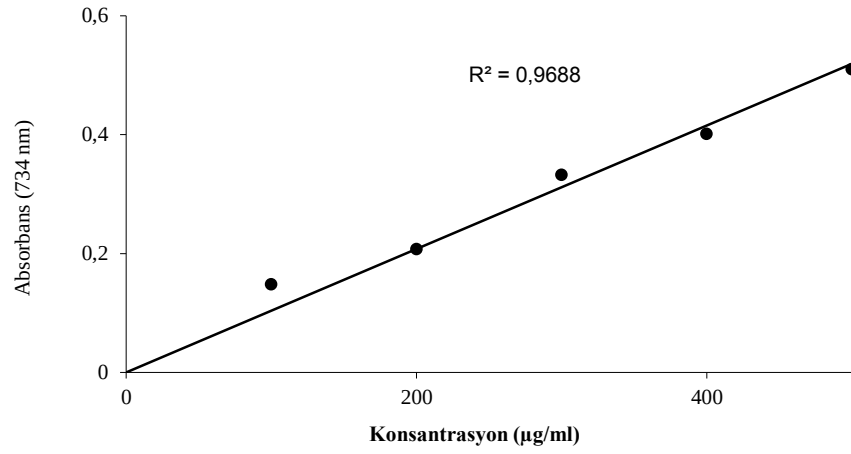


Şekil 4.40. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) DPPH radikali giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

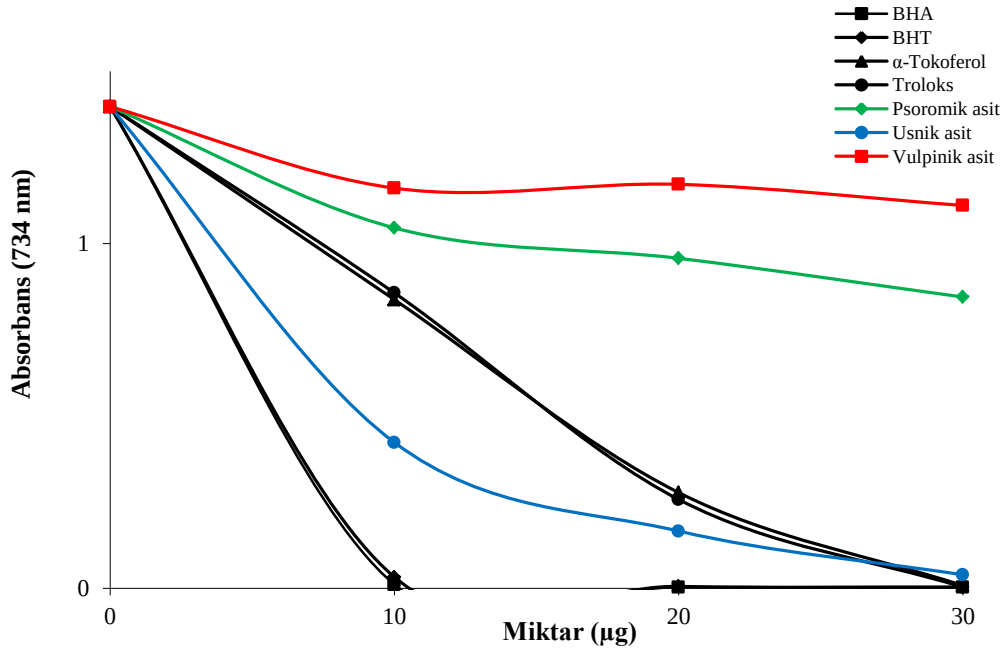
Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.40) her bir standart, Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5). Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler: Troloks > α -tokoferol > BHA > Vulpinik asit > BHT > Usnik asit > Psoromik asit şeklindedir.

4.4.5. ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi $ABTS^{+}$ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller Ae1996; Gülçin *et al.* 2007b). Bunun için öncelikle ABTS'den $ABTS^{+}$ 'nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 4.25.'de görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbans değeri 0.750 ± 0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi. Bu aşamadan sonra Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinde çalışmada kullanılan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $ABTS^{+}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2:0,9688$) (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. ABTS⁺ giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS⁺ için hazırlanan standart grafik



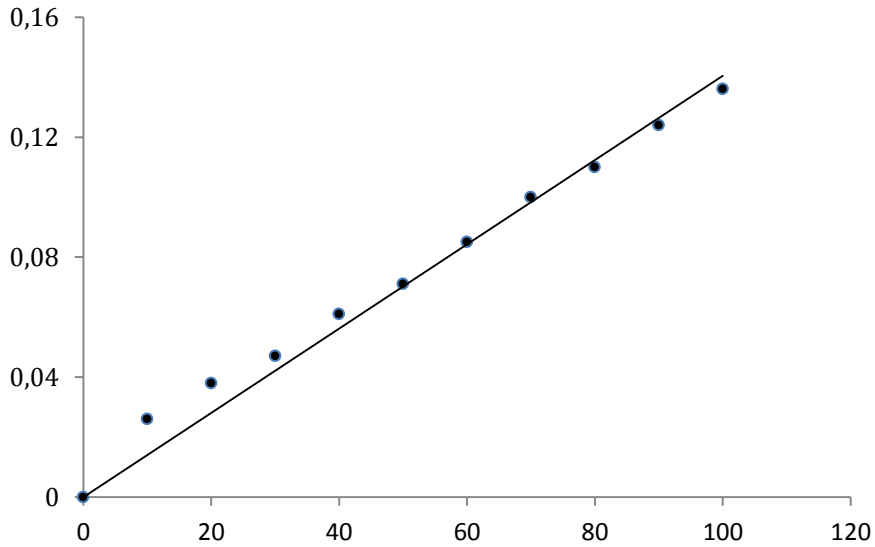
Şekil 4.42. Farklı konsantrasyonlardaki Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin (10-30 µg/mL) ABTS⁺ giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.42) her standart ve Psoromik asit, Usnik asit ve

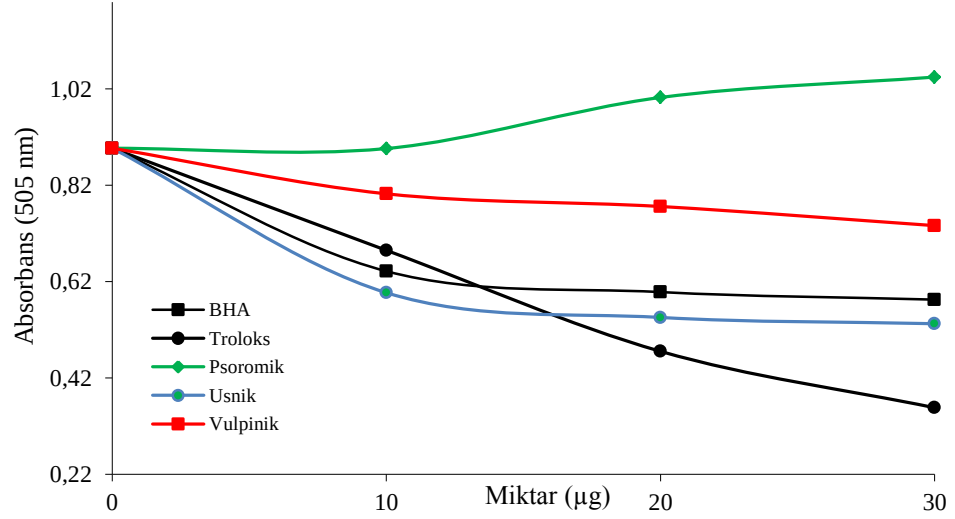
Vulpinik asitin için ayrı ayrı IC_{50} değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5). Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde $ABTS^{++}$ giderme aktivitesi sergilediler: BHA > BHT > trolok s> α -tokoferol > Psoromik asit > Usnik asit > Vulpinik asit

4.4.6. DMPD radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $DMPD^{++}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı (Şekil 4.43). $DMPD^{++}$ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan $DMPD^{++}$ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.



Şekil 4.43. $DMPD^{++}$ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik



Şekil 4.44. Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit 10 µg/mL konsantrasyonundaki DMPD⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırması

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin DMPD⁺ radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.44) Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asit ile kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DMPD⁺ giderme aktivitesi Troloks > Usnik asit > BHA > Vulpinik asit > Psoromik asit

Çizelge 4.7. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH[•], ABTS^{•+}, DMPD⁺ radikali giderme IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

	DPPH [•] Giderme	ABTS ^{•+} Giderme	DMPD ⁺ Giderme	O ₂ ^{•-} Giderme	Metal şelatlama
BHA	9,24	2,70	40,76	15,40	10,34
BHT	27,72	2,96	*	22,35	17,77
α-Tokoferol	9,76	5,02	*	21,01	27,72
Troloks	8,01	4,30	22,35	30,13	8,05
EDTA				-	6,24
Psoromik Asit	346,50	38,50	144,37	15,06	8,66
Usnik Asit	49,50	59,00	33,00	20,38	18,68
Vulpinik Asit	20,38	77,00	99,00	34,65	9,62

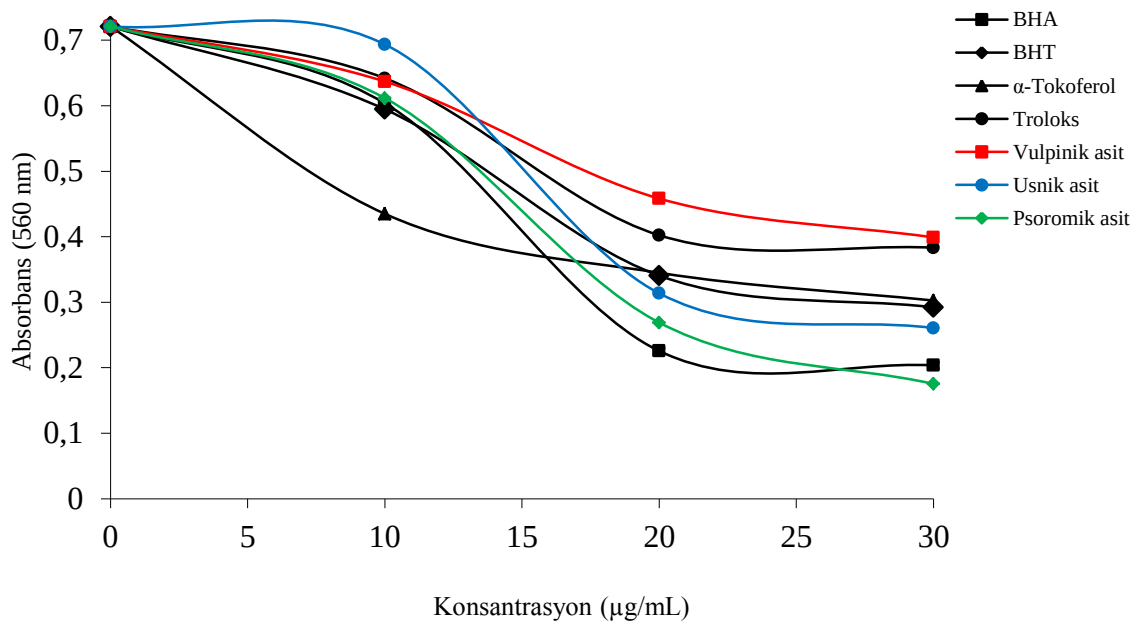
*DMPD⁺ giderme metodunda her iki standart antioksidan bileşik aktivite göstermemektedir (Gülçin 2008).

4.4.7. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi riboflavin / metiyonin / ışık metoduna göre yapıldı. Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

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

Formülde verilen λ_{560-K} kontrol numunesinin absorbans değeridir. λ_{560-N} ise çalışmada kullanılan antioksidan numunelerin absorbans değeridir (Gülçin *et al.* 2004a).

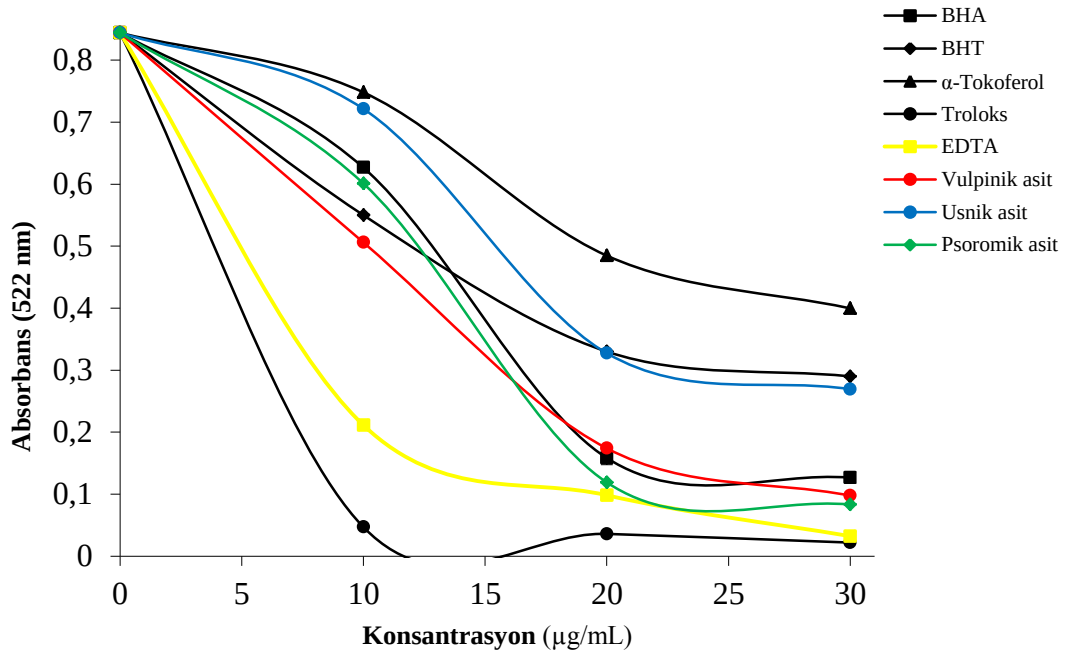


Şekil 4.45. Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit'in çözeltilerinin süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol, troloks, Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit ile karşılaştırması

Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit ve kullanılan standart antioksidanlar sırasıyla şu şekilde süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi sergilediler: Psoromik Asit > BHA > Usnik asit > α-Tokoferol > BHT > Troloks > Vulpinik asit.

4.4.8. Metal şelatlama bulguları

Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil kullanılarak belirlendi. Bu tayinde farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/mL) konsantrasyonlarına karşılık gelen grafik çizilerek IC₅₀ değerleri grafikten hesaplandı ve Çizelge 4.7’de verildi. Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla bipiridil metal şelatlama kapasitelerinin mukayesesinde EDTA > Troloks > Psoromik Asit > Vulpinik Asit > BHA > BHT > Usnik Asit > α-tokoferol şeklinde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.46. Farklı konsantrasyonlarda (10-30 µg/mL) Vulpinik Asit, Usnik Asit ve Psoromik Asit’in bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan EDTA, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (CA) enzimi pH düzenleyici bir enzim olarak bilinmektedir ve oldukça hızlı bir reaksiyon olan, karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) dönüşüm reaksiyonunu katalizler (Gülçin *et al.* 2004e). Karbonik anhidraz bu reaksiyonu katalizlediğinde reaksiyon hızını arttırarak saniyede 10^4 - 10^6 reaksiyon hızına kadar ulaşmasını sağlar (Çoban *et al.* 2007). CA enziminin on altı izoformu çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal sürece ilgilidir. Yakın zaman önce, birçok dokuda son derece bol bulunan proteinlerden olan iki sitosolik hCA izoformuna (hCA I ve II) yönelik özel bir ilgi olmuştur. hCA I vücutta her yerde bulunacak şekilde eksprese olurken, kan ve gastrointestinal sistemde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur. hCA II ise ödem, epilepsi, irtifa hastalığı ve glokom dahil farklı hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Özgeriş *et al.* 2016). CA, biyofiziksel, biyoanalitik ve organik kimyasal çalışmaların yanı sıra ilaç tasarım çalışmaları inhibitörü olarak hizmet vermek için uygun bir proteindir. (Akıncioğlu *et al.* 2013)

CA enzim ailesinin fizyolojik olarak protein-ligand bağlama ve inhibisyon çalışmaları için oldukça ilgi çekici olmasının birkaç nedeni vardır, Bunlar;

1. Monomerik enzim olan CA'nın normal bir molekül kütlesine (30 kDa civarında) sahip olması, tek-zincirli bir protein olması ve her ne kadar en yaygın CA II de hiç disülfid bağı, pendant şekeri veya fosfat grubu olmasa da, diğer bütün izoformlarda disülfid bağı, pendant şekeri veya fosfat grubunun olması.
2. CA II'nin oldukça yaygın ve ucuz bir enzim olması.
3. Laboratuvar şartlarında kusursuz dayanıklılığı sayesinde izoenzimlerin saflaştırılmasının ve çalışılmasının kolay olması.
4. Çoğu izoenzimlerin aminoasit sekansının belirlenmiş olması,
5. X-Ray difraksiyon analiziyle aktif memeli izoformların birçoğunun yapısı ve aktif bölge geometrisinin detaylı olarak tanımlanmış ve katalitik mekanizmasının oldukça anlaşılmış olması.

6. Sadece yüksek turnover sayısına sahip CO₂ hidraz/dehidrataz aktivitesine sahip değil aynı zamanda karboksilik asit esterlerine, fosforik asit esterlerine ve sülfat esterlerine doğru esteraz aktivitesi göstermesi
7. Zn²⁺ iyonunu bağlayan ligantlarla birlikte olan inhibisyon mekanizması oldukça basit ve güzel tanımlanmış olmasıdır (Aksu *et al.* 2013).

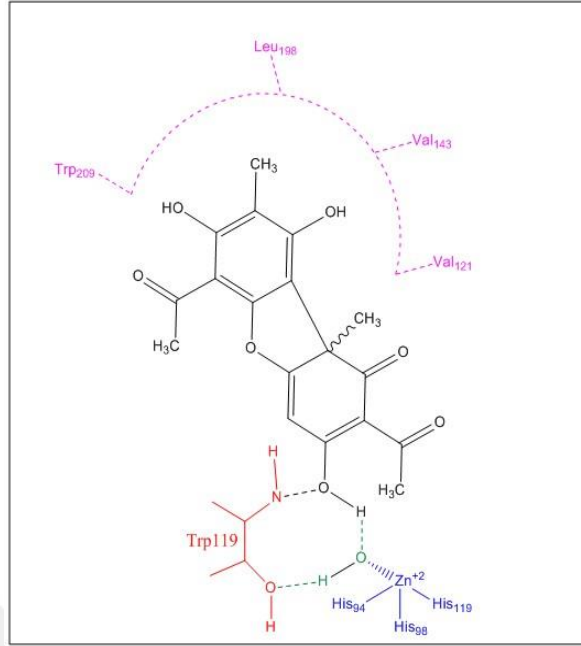
Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin hCA I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi amacıyla her iki CA izoenzimleri öncelikle saflaştırıldı. Bu amaçla Sepharose-4B-L-Tirozin sülfanilamid afinite jeli hazırlandı. Bunun için Sepharose-4B üzerinde hazırlanan afinite jeli kullanıldı. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve aktifleştirilen jele L-tirozin uzantı kolu takıldı. Sonra, sülfanilamid diazolanarak L-tirozine kenetlenendirildi. Sülfanilamid, CA izoenzimin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligant olarak kullanıldı. Tirozin ise enzimin matriksle etkileşimini engellemek ve liganda daha iyi kenetlenmesini sağlamak amacıyla uzantı kolu olarak seçildi. Afinite jele tutunan hCA I ve II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/ 1.0 M NaCl (pH: 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-PAGE uygulandı. hCA I için spesifik aktivite 4444,40 EU/mg olarak ve verim ise %16,44 olarak bulundu. Diğer taraftan hCA II izoenzimi ise spesifik aktivitesi 9642,85 EU/mg olarak, verim ise %37,46 olarak hesaplandı.

Afinite kromatografisi, protein saflaştırma teknikleri içerisinde tek basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan bir tekniktir. Çalışmalarımız süresince, orijinal afinite jeli için denenen tüm koşulların kolon elüatları, eşit hacimde alınıp bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Afinite kromatografisi ile CA izoenzimlerinin saflaştırılması sırasında elüatların protein muhtevalarının 280 nm de absorbanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan gibi aromatik halka içeren amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorban vermesi esasına dayanır (Segel 1968). Dolayısıyla

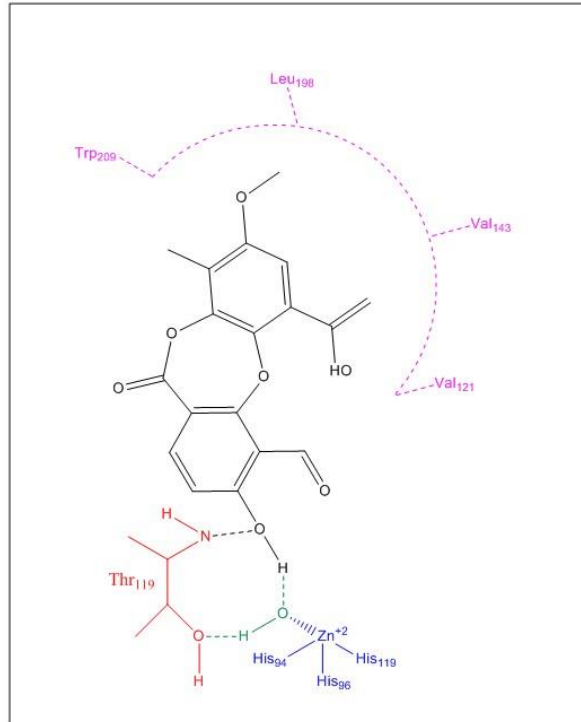
her bir proteinin, tirozin ve triptofan içeriklerinin farklı olması, onların spesifik bir absorpsiyon katsayısına sahip olmalarını gerekli kılar. Bir protein zincirindeki tirozin ve triptofan amino asitlerinin sayısı biliniyorsa, o proteinin 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonundan, protein miktarı da bulunabilir. Çalışmada Coomassie-Blue yöntemiyle de kantitatif protein tayini yapıldı. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı ve tercih edilmesinin sebebi çok kısa sürede uygulanabilir olması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Çalışmada CA izoenzim aktivitesi tayini için Amstrong ve arkadaşları tarafından değiştirilen esteraz yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin esası karbonik anhidrazın, ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (1966). CA izoenzimleri, *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenole hidroliz eder ve oluşan ürün ise 348 nm’de absorpsiyon vermektedir. *p*-Nitrofenil asetat suda çözünmediği için, az miktarda asetonda çözüldü, daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltileri hazırlandı. Çözücü olarak asetonu seçilmesinin sebebi ise asetona hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır (Verportee *et al.* 1967).

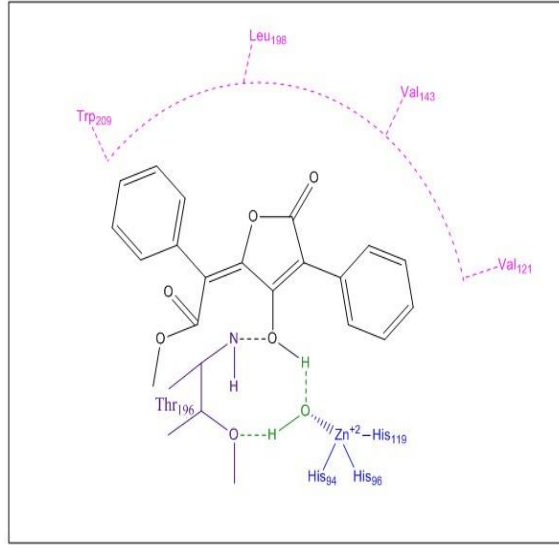
Bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonu ile fenollerin fonksiyonel aromatik -OH grubunun etkileştiği tahmin edilmektedir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199’un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla -OH’ını enzim aktif bölgesinin Zn^{2+} iyonuna bağlı su/hidroksit iyonuna bağlar (Şentürk *et al.* 2009). Daha önceki fenolik bileşiklerin inhibisyon mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda çalışmada kullanılan liken metabolitlerinin aşağıdaki gösterildiği gibi bir CA izoenzimini aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna bağlanma modeli önerilebilir (Şekil 5.1, 5.2 ve 5.3).



Şekil 5.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna Usnik asitin muhtemel bağlanma modeli



Şekil 5.2. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna psoromik asitin muhtemel bağlanma modeli



Şekil 5.3. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna vulpinik asitin muhtemel bağlanma modeli

Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin K_i ve IC_{50} değerleri, iyi bir inhibitör olarak bilinen Asetazolamid'in K_i ve IC_{50} değerlerine benzerlik gösterdiğinden dolayı, Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit hCA I ve II izoenzimleri için inhibitör olarak kullanılabilir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. hCA I ve II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Asetazolamid'in IC_{50} ve K_i değerleri

İnhibitör	hCA I		hCA II	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)
Psoromik asit	4,985	2,833	11,550	14,230
Usnik asit	2,675	2,133	6,730	5,900
Vulpinik asit	2,566	1,246	7,000	4,560
Asetazolamid	3,039	4,246	4,100	6,430

Çalışmada Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpink asitin AChE ve BChE üzerine inhibisyon etkisi ile ilgili araştırmalar da yapıldı. AChE ve BChE genetik, yapısal ve substrat özgüllükleri ile geniş bir aralıktaki inhibitörlere karşı hassasiyetleri farklıdır. BChE için en iyi kolin substratı olan bütirilkolon onun doğal substratı değildir ve BChE insanlar için fizyolojik olarak esansiyel değildir. Anti-kolinesteraz ajanları süpürdüğü

ve sinaptik AChE'yi inhibitörlerden koruduğu önerilmesine rağmen BChE'nin fonksiyonu açıklığa kavuşturulamamıştır. AChE'e kıyasla, BChE'nin daha geniş bir aralıkta substrata özgüllüğü vardır ve inhibitörlerin daha geniş bir aralığı ile etkileşime gider. Bunun sonucu olarak, BChE organofosforlu sinir ajanı zehirlenmesinde olası bir stokiyometrik biyo süpürücü olarak incelenmiştir. Yakın zaman önce BChE'nin memelilerin sinir sisteminde geniş ölçüde dağıldığı gösterilmiştir ve bu onun nöral fonksiyonlara ve nörodejeneratif hastalıklara olası ilgisini işaret etmektedir. BChE'nin spesifik inhibisyonunun Alzheimer hastalığı gibi demansların tedavisi için daha etkin ilaçlar geliştirmek üzere yeterli bir strateji olabileceği bulunmuştur. Bazı selektif bütirikolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığında bulunan asetilkolin seviyelerini arttırdığı ve anormal amiloid oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Sekutor *et al.* 2012).

AChE temel olarak nöronlar ve aksonlarla ilgiliyken, BChE temel olarak beyin içindeki glial hücreler tarafından salgılanır (Aslam *et al.* 2014). Darvesh *et al.* tarafından yapılan çalışmalar spesifik nöronların presinaptik ACh'yi bölmek için AChE yerine BChE kullandığını belirtmiştir. Gerçekte, insan hipokampusu ve amigdalasındaki kolinerjik nöronların %10-15'i hücre gövdelerinde ve proksimal dendritlerinde AChE yerine BChE çıkarır (Furukawa-Hibi *et al.* 2011).

Yapılan çalışmalar AD hastalarında, beyinin belirli bölgesindeki AChE aktivitesi azalırken, asetikolinden sorumlu BChE'nin aktivitesinin arttığını göstermiştir (Garibov *et al.* 2016). Sağlıklı insan beyinde, AChE ve BChE 4:1 oranı bulunur. Ancak, AD hastalığının ileri safhasında, beyinde AChE aktivitesi %45'e kadar azalabilir ve bu durum BChE aktivitesi 2 katına kadar yükselebilir (Furukawa-Hibi *et al.* 2011).

Alzheimer Association'ın verilerine göre AD yaşlılıkta demansın en yaygın nedenidir. Demansın farklı türlerinin her birinin oranını belirlemek kolay bir iş değildir. Örneğin, yaşam sırasında doğru bir tanı konması her zaman mümkün olmayabilir. Nihai tanı sadece beyin yapısındaki değişikliklerin doğrudan gözlenebildiği ölümden sonra konabilir. (Heinrich and Teoh 2004). Alzheimer hastalığının kesin tedavisi yoktur.

Günümüzde kullanılan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Hastalığı ortadan kaldıran tedavi uygulaması bulunmamaktadır. Bu amaca yönelik olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri (Donepezil, Rivastigmin) genel olarak kullanılmaktadır (Göçer *et al.* 2013). Ancak bu inhibitörlerin gastrointestinal sorunlar ve hepatoksite gibi istenmeyen yan etkileri olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, AD'nin tedavisi için yeni inhibitörler tasarlanması son derece önemlidir (Bayrak *et al.* 2017; Özgeriş *et al.* 2016).

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin K_i ve IC_{50} değerleri, iyi bir inhibitör olarak bilinen Takrin'in K_i ve IC_{50} değerlerine benzerlik gösterdiğinden dolayı, Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asit Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz enzimleri için inhibitör olarak kullanılabilir (Çizelge 5.2.).

Çizelge 5.2. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz enzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve Takrin'in IC_{50} ve K_i değerleri

İnhibitör	AChE		BChE	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)
Psoromik asit	0,742	0,122	3,315	2,079
Usnik asit	1,273	0,239	3,397	1,425
Vulpinik asit	0,958	0,227	3,766	1,302
Asetazolamid	1,795	0,160	3,666	1,984

Ayrıca çalışmamızda Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asit ve hCA I ve II izoenzimleri, AChE ve BChE üzerine inhibisyon etkisinin araştırılması çalışmalarının yanında antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi, antiradikal özellikleri ile ilgili çalışmalarda yapıldı. Yapılan çalışmalar şunlardır:

1. Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi,
2. Kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme kapasitesi,
3. FRAP metoduna göre Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesi,
4. Bipiridil kullanarak ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi,

5. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi,
6. ABTS⁺ giderme aktivitesi,
7. DMPD⁺ giderme aktivitesi
8. Riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan O₂^{•-} giderme aktivitesi

Bu metotlar kullanılarak Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asit farklı derişimlerde antioksidan kapasiteleri belirlendi. BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile kıyaslamaları yapıldı.

Bir maddenin antioksidan olduğunu gösteren en büyük krterlerden birinin onun indirgeme kapasitesidir. Budan dolayı çalışmada kullanılan liken metabolitlerinden olan psoromik asit, usnik asit ve vulpinik asitin Fe³⁺-Fe²⁺ transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, Kuprak metoduna göre kuprik iyonlarını (Cu²⁺) kupröz iyonlarına (Cu⁺) indirgeme kapasitesi ve FRAP metoduna göre Fe³⁺-TPTZ indirgeme kapasitesi gibi farklı metotlar ile antioksidan aktiviteleri irdelendi.

Bir kimyasalın indirgenmesi (redüksiyon) elektron kazanması, yükseltgenmesi (oksidasyon) ise elektron kaybı olarak tanımlanır. Bir indirgeyici veya indirgen ajan, elektronlar veren ve böylece diğer bir tepkenin indirgenmesine neden olan bir maddedir. Bir yükseltgeyici veya yükselten ajan, elektronlar alan ve diğer bir tepkenin yükseltgenmesine neden olan bir maddedir. Sistemde başka bir yerde bir indirgeme olmadan bir yükseltgeme mümkün değildir. İndirgenme ve yükseltgenme bir kimyasal tepkimeyi temsil ettiğinde buna redoks tepkimesi adı verilir. Redoks tepkimeleri, yaşam sistemi için enerji sağlamak üzere gıdaların parçalanmasıyla oluşan kimyasal maddeleri yükseltgemek için havadaki oksijeni kullandığımız kimyasal tepkimeler zinciri olan biyolojik yükseltgenmenin ana tepkimesidir. Bununla beraber pro-oksidanları etkin şekilde indirgeyebilen bir antioksidan Fe³⁺'ü etkin şekilde indirgeyemeyebilir. Bir antioksidan bir indirgendir ama bir indirgen bir antioksidan olmak zorunda değildir (Prior and Cao 1999).

İlk olarak önemli metotlardan birisi olan $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+3}$ 'nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{+2}$ 'ye indirgenmesi metodu ile Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin ve Fe^{3+} 'ün ilavesiyle 700 nm'de güçlü absorbansı olan Prussian mavisi rengindeki bir kompleks madde olan $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ oluşturur. Artan absorbans, kompleks oluşumundan kaynaklı artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini verir.



Biyoaktif bileşiklerin veya gıda bileşenlerinin indirgeme gücü elektron-verme kapasitesini yansıtır ve antioksidan aktivitesiyle bağlantılıdır. Bu yöntemde, test çözeltisinin sarı rengi antioksidan örneklerinin indirgeme gücüne bağlı olarak yeşilin ve mavinin çeşitli tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak işlev görebilir (Gülçin *et al.* 2010c).

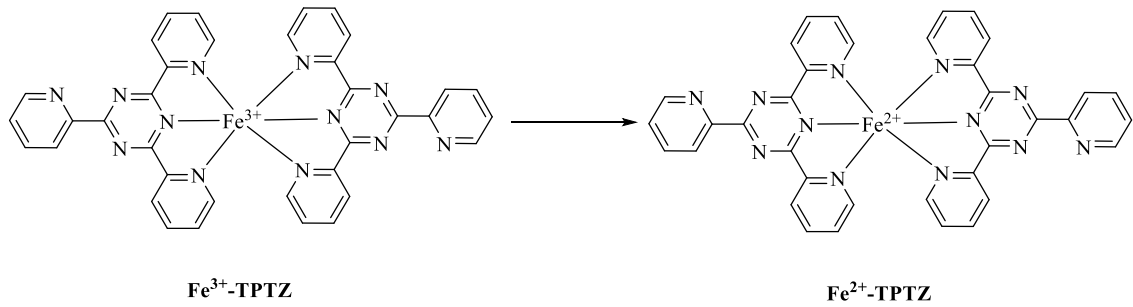
Çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin standartlara göre daha düşük indirgeme kuvvetine sahip olduğu görüldü. 20 $\mu\text{g/mL}$ 'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 5.3.'de verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı. Bu konsantrasyonda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asit ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları $\text{BHA} > \text{Troloks} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{BHT} > \text{Usnik Asit} > \text{Psoromik Asit} > \text{Vulpinik Asit}$ şeklinde olduğu belirlendi.

Çizelge 5.3. 20 µg/mL konsantrasyonunda Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ve kuprik (Cu^{2+}) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Antioksidanlar	Fe^{3+} İndirgeme Metodu	FRAP Metodu	CUPRAC Metodu
BHA	1,677	2,591	1,990
BHT	0,711	1,246	1,187
α-Tokoferol	0,802	1,473	0,564
Troloks	1,148	1,973	0,825
Psoromik asit	0,258	0,486	0,240
Usnik Asit	0,278	1,293	0,277
Vulpinik Asit	0,096	0,757	0,323

İndirgeme kapasitesini belirlemek amacıyla kullanılan ikinci metod, FRAP metodudur.

FRAP yöntemi antioksidan bileşiklerin asidik ortamda ferrik 2,4,6-tripirydyl-s-triazine kompleksini $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ yoğun mavi renkli ferröz kompleksine $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ indirgemesidir. Bu yöntem plazmadaki indirgeme gücünü ölçer, ama yöntem daha sonradan antioksidanların farklı gıda ve içeceklerde, çayda, baharatlarda, sebzelerde, meyve sularında ve meyvelerde kullanılmıştır. Şekil 5.4.'de görüldüğü gibi, tepkime ferrik 2,4,6-tripirydyl-s-triazine'in (TPTZ) renkli bir ürüne indirgenmesini ölçer (Benzie and Strain 1996).



Şekil 5.4. Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesi

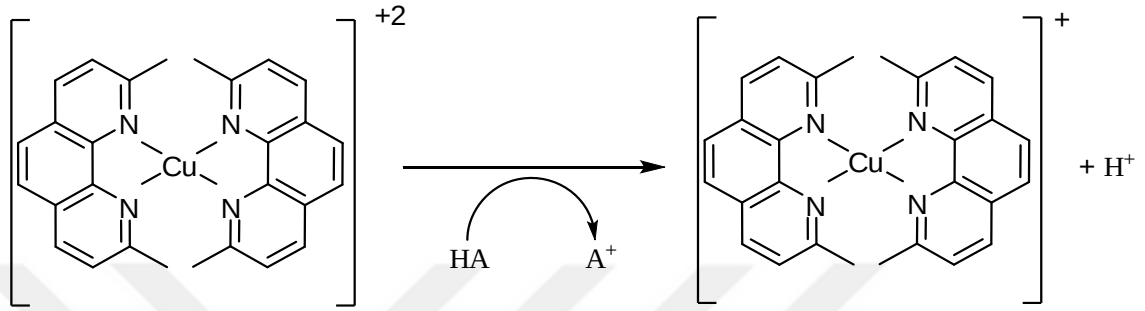
FRAP yöntemi basit, hızlı, ucuz ve sağlam olup özel ekipmanlar gerektirmez (Prior *et al.* 2005). Bu yöntemin dezavantajı, glutatyon gibi bazı antioksidanlarla çok yavaş reaksiyona girmesidir. Bu metodun çalışıldığı ortamın pH'sı 6.6 civarındadır. Düşük pH'da Fe^{3+} 'ün Fe^{2+} 'ye indirgenmesi ile renkli Fe^{2+} -TPTZ kompleksinin oluşur. Bu metodun esası; oksidan olarak kullanılan Fe^{3+} -TPTZ kompleksinin düşük pH'da renkli formdaki Fe^{2+} -TPTZ kompleksine indirgenmesidir. Oluşan renkli kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Bu demir kompleksinin redoks potansiyeli 0.70 V'tur. Bu değer ABTS^{+} 'nin redoks potansiyeline (0.68 V) yakındır (Benzie and Strain 1996).

Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasiteleri standart antioksidanlarla mukayesesi yapıldı ve BHA > Troloks > α -Tokoferol > BHT > Usnik asit > Vulpinik asit > Psoromik asit şeklinde bir sıralama gözlemlendi

İndirgeme kapasitesini belirlemek amacıyla kullanılan diğer bir metod, Kuprak metodudur. Kuprak metodu fizyolojik pH'a yakın bir pH'ta (7.0) yapılan kromejenik redoks tepkimesidir. Bu metod -SH grubu antioksidanlara tepki vermeyen yaygın uygulanan FRAP testinden farklı olarak glutatyon ve non-protein tiyollar gibi tiyol-türü antioksidanları ölçebilir (Gülçin and Daştan 2007).

Kuprak metodu ayırıcı seçicidir. Folin veya ferrik iyonu gibi yükseltgen ayıraçlardan daha düşük, $\text{ABTS}^+/\text{ABTS}$ redoks çiftine yakın bir redoks potansiyeli vardır. Ayrıca, gerçek antioksidanlar olarak sınıflandırılmayan basit şekerler ve sitrik asit Kuprak ayıracıyla yükseltgenmezken çoğu fenolik antioksidanlar uygun redoks potansiyelleri nedeniyle kolayca yükseltgenir. FRAP gibi Fe^{3+} -bazlı ayıraçlara (tiyoller gibi) ve Fe^{3+} - Fe^{2+} transformasyon yöntemlerine atıl kalan bazı antioksidanlar Kuprak ayıracıyla kolayca yükseltgenir (Apak *et al.* 2006). Bu metod, düşük maliyetli, hızlı, kararlı ve rahat uygulanabilir bir metottur. Ayrıca indirgeyici maddenin molekül yapısına bakılmadan birçok antioksidan için uygulanan bir metottur (Huang *et al.* 2005). Bu metodda, CuCl_2 ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Kullanılan neokuprin, heterosiklik bir organik bileşik ve şelatlayıcı bir ajandır. Kuprak metodu,

antioksidanlar tarafından kuprik iyonlarının (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi esasına dayanır. Neokuprinin varlığında Cu^{2+} , Cu^+ 'e indirgenir. Oluşan kompleks 450 nm'de maksimum absorpsiyon verir.



Şekil 5.5. Antioksidan bir molekül tarafından gerçekleştirilen kuprak reaksiyonu

Bu yöntemde Psoromik asit, Usnik asit, Vulpinik asitin çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldıklarında $\text{BHA} > \text{BHT} > \text{Trolox} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{Vulpinik asit} > \text{Usnik asit} > \text{Psoromik asit}$ şeklinde sıralanmanın meydana geldiği belirlendi.

Bitki ekstralarının, saf maddelerin, yiyecek ve içeceklerin antioksidan kapasitelerinin belirlemek için en popüler spektroskopik yöntemler $\text{ABTS}^{\cdot+}$, $\text{DPPH}^{\cdot}$, $\text{DMPD}^{\cdot+}$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikallerinin kullanıldığı yöntemlerdir. Özellikle $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ve $\text{DPPH}^{\cdot}$ yöntemleri basit, hızlı, hassas ve tekrarlanabilir yöntemlerdir. Bu yöntemler yüksek duyarlılığa sahiptir. Ayrıca pek çok benzer çalışmanın analizinde rahatlıkla kullanılabilirler. Radikal gidericiler peroksidasyon zincir tepkimelerini sonlandırmak ve gıda ürünlerinin niteliği ve stabilitesini iyileştirmek için peroksit radikalleri ile doğrudan tepkimeye bulunabilir ve onları süpürebilir. $\text{DPPH}^{\cdot}$, $\text{ABTS}^{\cdot+}$, $\text{DMPD}^{\cdot+}$ ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikallerinin kullanımına dayanan yöntemler gıdaların, içeceklerin ve sebze ekstralarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesindeki en yaygın spektrofotometrik yöntemler arasındadır. Hem kromojenler hem de radikal bileşikler antioksidanlarla doğrudan tepkime yapabilir.

Radikal giderme aktivitesi serbest radikallerin gıdalarda ve biyolojik sistemlerdeki zararlı rolünden ötürü çok önemlidir. Bitki fenolik bileşiklerinin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için şu anda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemler, yükseltgenme son noktasının belirlenmesi için çeşitli radikal üreten sistemler ve yöntemler kullanarak sentetik serbest radikalleri giderme yeteneğine dayanır (Gülçin 2012). Bu sebeple Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS^{•+} giderme aktivitesi, DMPD^{•+} giderme ve O₂^{•-} aktivitesi metodlarıyla radikalleri giderip gidermediği araştırılmıştır.

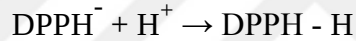
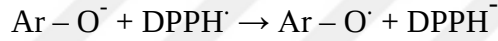
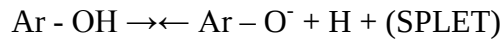
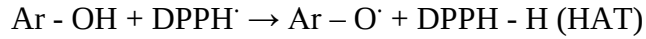
Çizelge 5.4. Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin çözeltilerinin DPPH[•], ABTS^{•+}, DMPD^{•+} radikali giderme IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Antioksidan bileşikler	DPPH[•] Giderme	ABTS^{•+} Giderme	DMPD^{•+} Giderme	O₂^{•-} Giderme	Metal şelatlama
BHA	9,24	2,70	40,76	15,40	10,34
BHT	27,72	2,96	*	22,35	17,77
α-Tokoferol	9,76	5,02	*	21,01	27,72
Troloks	8,01	4,30	22,35	30,13	8,05
EDTA				-	6,24
Psoromik Asit	346,50	38,50	144,37	34,65	9,62
Usnik Asit	49,50	59,00	33,00	20,38	18,68
Vulpinik Asit	20,38	77,00	99,00	15,06	8,66

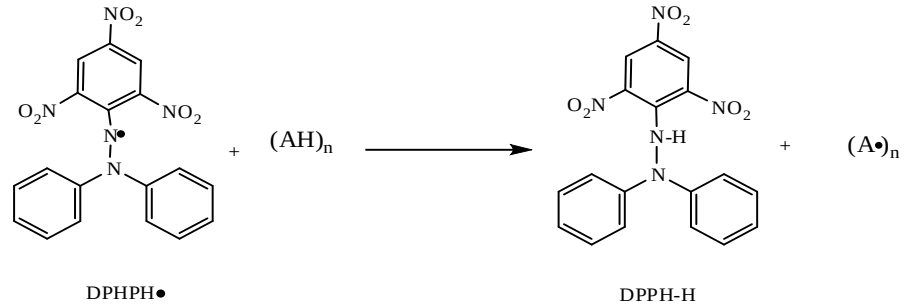
*DMPD^{•+} giderme metodunda her iki standart antioksidan bileşik aktivite göstermemektedir (Gülçin 2008)

DPPH[•] Radikal Giderme Yöntemi; aslen doğal materyallerde H-vericileri keşfetmek için ilk olarak 1950'lerde öne sürülmüştür. Daha sonra, yöntem hem fenoliklerin ve gıdaların hem de biyolojik olarak ilgili örneklerin antioksidan potansiyelini belirlemek için düzenlenmiştir. DPPH radikalleri derin mor renk taşıyan az sayıdaki stabil organik azot radikallerinden biridir.

Stabil serbest DPPH radikali fenollerin, katekollerin ve anilinlerin giderme aktivitelerinin incelenmesinde faydalı bir ayıraçtır. Şu anda yaygın şekilde kabul gören fikir fenoller ve DPPH arasındaki tepkimenin iki farklı mekanizmayla ilerlediği yönündedir: doğrudan HAT ve SPLET (Gülçin 2012).



DPPH, antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik *et al.* 2003). Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası, hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır (Şekil 5.6). Bu redüksiyonun ardından radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşur ve bu molekül 517 nm’de herhangi bir absorbans vermemektedir. Sonuç olarak DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin [(AH)_n] varlığında DPPH radikali Şekil 5.6’da belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).



Şekil 5.6. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi

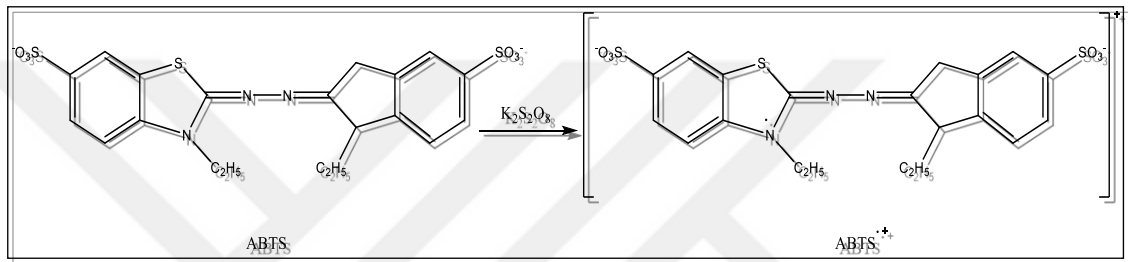
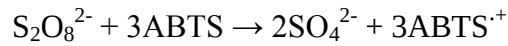
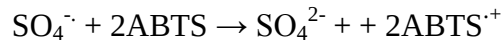
Çizelge 5.5’de görüldüğü üzere Vulpinik asitin DPPH radikal giderme aktivitesinin; standart antioksidan olan BHT’den yüksek, diğer standart antioksidanlardan düşük olduğu, Psoromik ve vulpinik asitin radikal giderme aktivitesinin ise tüm standart antioksidanlardan düşük olduğu görülmüştür.

Diğer bir radikal giderme metodu ise $\text{ABTS}^{\bullet+}$ giderme aktivitesidir. ABTS, yükseltgenler tarafından radikal katyonu olan, yoğun renkli $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ’ye yükseltgenir ve antioksidan kapasitesi antioksidan bileşiklerinin ABTS radikaliyle doğrudan tepkime yapan rengi azaltma yeteneği olarak ölçülür. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikalleri DPPH radikallerinden daha aktiftir. ABTS radikal katyonunun üretimi saf maddenin, sulu çözeltilerin ve içeceklerin total antioksidan aktivitesini ölçmek için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturur (Gülçin 2009).

ABTS yükseltgenler tarafından kendi $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katyonuna yükseltgenir. Bu amaçla, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katyonu MnO_2 kullanan kimyasal tepkime tarafından üretilir. Ancak, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katyonu genel olarak $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ’in kimyasal tepkimesi tarafından üretilir (Gülçin *et al.* 2006, 2007, 2010, 2011).

Bu yöntem, 734 nm’de soğurma gösteren karakteristik bir uzun dalga boylu soğurma spektrumu olan radikal katyon $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ’nin soğurmasının inhibisyonuna dayanır.

Yükseltgen olarak $K_2S_2O_8$ kullanılarak elde edilen sonuçlar peroksidisülfat varlığının $ABTS^{\cdot+}$ oranını arttırdığını göstermektedir. $ABTS^{\cdot+}$, $ABTS/K_2S_2O_8$ sisteminde üretilir:

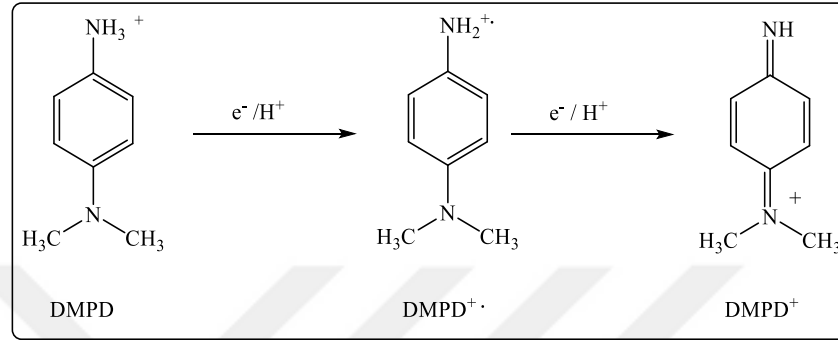


Şekil 5.7. ABTS radikalinin ($ABTS^{\cdot+}$) oluşumu

Ayrıca, ABTS radikal giderme metodu geniş bir pH aralığı boyunca değerlendirilebilir ve bu gıda bileşenleri için pH'nın antioksidan mekanizmaları üzerindeki etkisini incelemek için faydalıdır. $ABTS^{\cdot+}$ hem suda hem de organik çözücülerde çözünür ve iyonik kuvvetten etkilenmez. Böylece ekstraların ve vücut sıvılarının hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan kapasitelerini belirlemek için birden çok ortamda kullanılabilir (Awika *et al.* 2003).

Çizelge 5.4'de görüldüğü üzere Psoromik asit, Usnik asit ve Vulpinik asitin $ABTS^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesinin tüm standart antioksidanlardan düşük olduğu belirlenmiştir. $ABTS^{\cdot+}$ kullanımına çok benzer olan diğer bir metot da N,N-dimetil-p-fenilenediamin veya $DMPD^{\cdot+}$ metodudur (Fogliano *et al.* 1999). Bu yöntem, geleneksel ABTS yöntemine kıyasla daha basit, daha verimli ve daha ucuzdur. Bir yükseltgen veya bir asidik pH varlığında, $DMPD$ stabil ve renkli bir $DMPD$ radikal katyonuna ($DMPD^{\cdot+}$) dönüştürülür. $DMPD^{\cdot+}$ 'nin UV-görünür spektrumu 505 nm'de azami soğurma gösterir. Şekil 5.8'de görülebileceği üzere, bir hidrojen atomunu $DMPD^{\cdot+}$ 'ye transfer edebilen

antioksidan bileşikler suya renk verebilir ve çözeltide renk değişikliği yapabilir. Bu tepkime hızlıdır ve stabil olan son noktası antioksidan veriminin bir ölçüsü olarak alınır (Ak and Gülçin 2008).



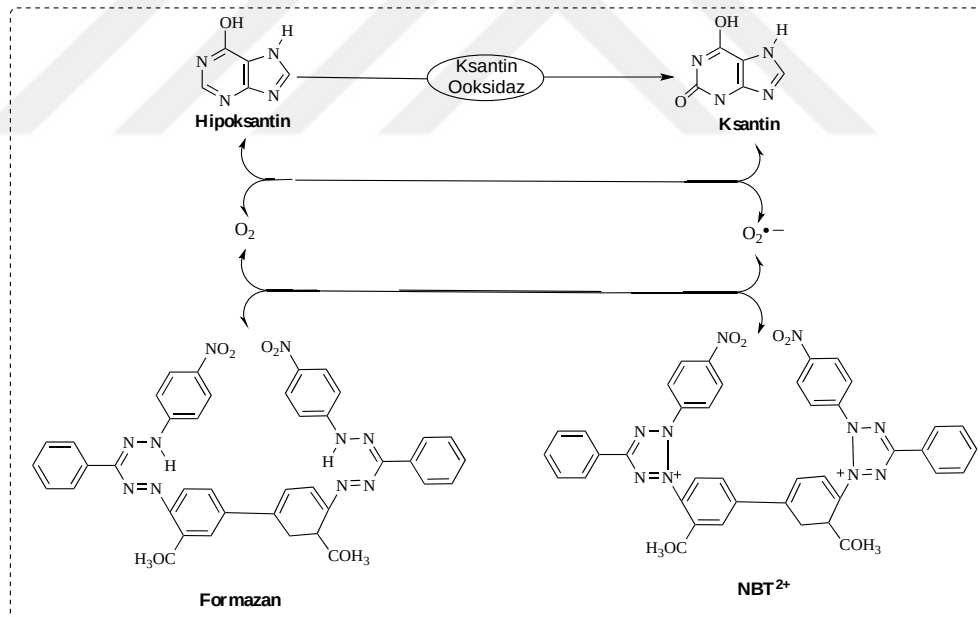
Şekil 5.8. DMPD $^{\cdot+}$ radikalinin oluşum ve giderilmesi

İlk deneyler yükseltgen çözeltisi seçimi ve DMPD $^{\cdot+}$ konsantrasyonu ile yükseltgeyici bileşik konsantrasyonu arasındaki oranın yöntemin etkinliği için kritik olduğunu göstermektedir. Radikal katyonu oluşumu çok yavaştır ve soğurmada sürekli bir artış sonucu verir. En iyi sonuçlar 0.1 mM nihai konsantrasyona kadar stabil renkli bir çözelti veren $FeCl_3$ ile elde edilir. Bu yöntem düşük maliyeti ve yüksek tekrarlanabilirliği olan analiz sağlar (Gülçin 2008). ABTS metodunun tersine, DMPD $^{\cdot+}$ metodu stabil bir son nokta garanti eder. Bu durum büyük ölçekli tarama gerektiğinde özellikle önemlidir. DMPD $^{\cdot+}$ yönteminin ana sakıncasının α -tokoferol veya BHT gibi hidrofobik antioksidanlar kullanıldığında hassasiyeti ve tekrarlanabilirliğinin dramatik şekilde düşmesi olduğu bildirilmiştir. Organik asitlerin işleme karışabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, her iki standart antioksidan bileşik bu methoda kullanılmamıştır. Usnik asitin DMPD $^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesi, BHA'dan yüksek, troloksdan düşük, psoromik ve vulpinik asitin ise; BHA ve troloksdan düşük olduğu belirlenmiştir.

Radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) biyolojik olarak oldukça toksiktirler ve *in vivo* durumda oksijenin bir elektron vermesiyle oluşurlar. Bu radikal birkaç metabolik procesten veya ışınlama ile oksijen aktivasyonunu takiben ortaya

çıkar. Süperoksit anyonu enzimatik olan ve enzimatik olmayan mekanizmalar tarafından H_2O_2 'ye çevrilir. H_2O_2 bundan başka indirgenmiş demir veya bakır gerektiren Fenton reaksiyonu tarafından, daha reaktif bir $HO\cdot$ 'ya dönüştürülür. Süperoksit anyonu, lipitlerde, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasar ortaya çıkaran H_2O_2 , $HO\cdot$ ve $^1O_2$ gibi serbest radikalleri aktive etmek için öncülerdir.

Normal dokuda, ksantin oksidaz enzimi, elektronları nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) transfer eden dehidrogenazdır. Stres sırasında, bu enzim bir oksidaz enzimine dönüştürülür ve $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 üretir. Böylece, tahlil tüpünde, pH 7.4'te ksantin oksidaz artı hipoksantin (veya ksantin) $O_2^{\cdot-}$ üretmek için kullanılabilir. Bu reaksiyon $O_2^{\cdot-}$ 'nin NBT'yi formazana indirgeme kabiliyeti ile ölçülebilir ve formazanın oluşumu 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Şekil 5.9).



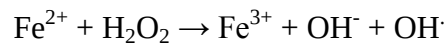
Şekil 5.9. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT $^{2+}$ 'yi formazana indirgem reaksiyonu (Gülçin 2012)

Ksantin-ksantin sistemine benzer şekilde, diğer bir yöntemde, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) varlığında fenazin metosülfatın (PMS) enzimatik olmayan bir

reaksiyonu kullanılarak $O_2^{\cdot-}$ üretilir. Her iki üretim sisteminde, $O_2^{\cdot-}$ NBT'yi 560 nm'de spektrofotometrik olarak izlenen formazana indirgeyebilir.

Yaygın olan diğer bir $O_2^{\cdot-}$ üretimi ise riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde çözünmüş oksijenden elde edilir. Riboflavin-metiyonin-ışık sistemi ile çözünmüş oksijenden türetilen süperoksit anyonları bu sistemde NBT'yi indirgeyecektir. Bu yöntemde, süperoksit anyonu 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülen mavi formazan üretmek için NBT²⁺ indirger. Antioksidanlar mavi NBT oluşumunu inhibe eder. Antioksidanlar NBT oluşumunu inhibe edebilir ve süperoksit anyon radikallerini süpürebilir. Antioksidanların varlığında 560 nm'de absorbanstaki azalma reaksiyon karışımında süperoksit anyonlarının süpürülmesini belirtir (Bursal and Gülçin 2011). Bu çalışmada Psoromik asit, Usnik Asit ve Vulpinik Asitin Riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan $O_2^{\cdot-}$ giderme aktivitesi araştırıldı ve kullanılan standart antioksidanların aktivitesi ile kıyaslandı (Çizelge 5.4.). Psoromik Asitin standartlardan daha yüksek, usnik asitin standartlarla yakın ve vulpinik asitin ise standartlardan daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Demir tüm yaşayan hücreler için esansiyel bir elementtir. Hem-içeren proteinlerin bileşiği ve hem olmayan demir-içeren enzimlerin bir metal kofaktörü olarak hayati bir rol oynar. Esansiyel doğasına rağmen, demir serbest iyon olarak bulunduğunda potansiyel olarak toksik olabilir ve Fenton reaksiyonu vasıtasıyla, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonuna yol açabilen bir tür olan hidroksil radikalının oluşumuna katalizör olarak katılır ve bu şekilde oksidatif strese neden olabilir (Gülçin 2012).



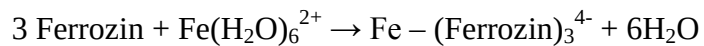
Biyokimyasal, hayvan ve insan verilerinin derlenmesi sonucu vücutta demirin artmasıyla vasküler hastalık, kanser ve belirli nörolojik durumlar gibi çeşitli hastalıkların arttığı görülmüştür. DNA ve lipid hasarına yol açan ROS'ların demir-aracılı oluşumu demirin oksijeni dokulara taşıma olan normal işlevinin abartılmasından kaynaklanıyor olarak görülmektedir. DNA'da demir-sebepli serbest radikal hasarı

kansere neden olabilmektedir ve kanser hücrelerinin demire tepki olarak hızla büyüdüğü bilinmektedir (Gülçin 2012).

Geçiş metali koordinatif şekilde doymuşsa reaktif oksijen türleri üretmek için H_2O_2 ile reaksiyona girmez. Demir şelatlayıcılar, Fe^{2+} aracılı Fenton reaksiyonunu inhibe ederek Fe^{2+} / H_2O_2 tarafından meydana gelen oksidatif hasarı önlemektedir (Ou *et al.* 2002).

Hücreleri serbest demir iyonlarının toksik etkilerine uğramaktan korumanın bir biçimi olarak, metal aralarında ferritinin tek başına en önemli demir-depolayıcı protein olarak kabul edildiği çeşitli peptidlere ve proteinlere bağlanır. Gerçekte, ferritinin molekül başına 4.500 demir atomuna kadar ayırabildiği tahmin edilmektedir; bu atomların depolaması bir ferrihidrit mineral çekirdek biçimi altında olur (Harrison and Arosio 1996).

Bu yöntemde bir antioksidanın metal-şelat oluşturma aktivitesinin bir ölçümü, bir ferröz iyonu çözeltisinin tahlil materyali ile ön muamelesinden sonra Fe^{2+} -ferrozin kompleksinin absorbans ölçümüne dayanır. Şelat oluşturuca ajanların varlığında, kompleks oluşumu bozulur ve kompleksin kırmızı renginde bir azalmaya yol açar. Bu nedenle, renk azalmasının ölçülmesi birlikte bulunan şelatörün metal-şelat oluşturuca aktivitesinin tahmin edilmesine izin verir. Daha düşük absorbans daha yüksek metal-şelat oluşturuca aktivite belirtir. Metal şelasyonu önemli bir antioksidan özelliğidir (Gülçin 2012).



Bu metal-şelat oluşturuca kapasitesi önemlidir çünkü lipit peroksidasyonunda katalize edici geçiş metalinin konsantrasyonunu azaltır. Şelat oluşturuca ajanların, redoks potansiyelini azalttıkları ve böylece metal iyonlarının okside formunu stabilize ettikleri için ikincil antioksidanlar olarak etkin olduğu bildirilmiştir. Kazazica *et al.* kaemferol gibi flavonoidlerin fonksiyonel karbonil grupları aracılığıyla Cu^{2+} ve Fe^{2+} 'yı şelate ettiğini göstermiştir. -OH, -SH, -COOH, - PO_3H_2 , C=O, -NR₂, -S- ve -O- fonksiyonel

grupların iki ya da daha fazlasını içeren yapıları olan bileşikler elverişli bir yapı-fonksiyon konfigürasyonunda metal şelasyon aktivitesi gösterebilir (Yuan *et al.* 2005; Gülçin 2006a).

Psoromik asit ve Vulpinik asitin EDTA'dan düşük, Troloksla benzer, diğer standartlardan yüksek metal şelatma kapasitesine sahip olduğu, Usnik asitin ise tokoferolden yüksek, diğer standartlardan düşük metal şelatma kapasitesine sahip olduğu belirlendi.

Bu tez kapsamında birer fenolik yapıya sahip olan ve liken metabolitlerinden olan psoromik asit, usnik asit ve vulpinik asitin, hCA I ve II izoenzimleri ile AChE ve BChE enzimleri üzerine güçlü inhibisyon etkisine sahip oldukları gözlemlendi. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, psoromik asit, usnik asit ve vulpinik asitin Alzheimer ve glokom hastalıklarının araştırılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Bu maddelerin ileride tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1379-1385.
- Akıncıoğlu, A., Akıncıoğlu, H., Gülçin, İ., Durdağı S., Supuran, C.T. Göksu, S., 2015. Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoylcarbammates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 3592-3602.
- Aksu, K., Nar, M., Tanc, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., Tümer, .F, Supuran, C. T., 2013. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of sulfamides structurally related to dopamine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 2925-2931.
- Alpaslan, P., 2013. *Xanthium strumarium* l. Bitkisinden biyolojik aktif bileşiklerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Alterio, V., Fiore D.A., Katia D'Ambrosio, Supuran C.T., and Simone G. D., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *American Chemical Society*, 112, 4421-4468.
- Altınışik, M., 2000. Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A. D. Aydın.
- Altun, D., 2007. *Usnea longissima* ach. likeninin *Drosophila melanogaster*' in çeşitli gelişim parametreleri ve ömür uzunluğu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ames, B., 1996. Dietary carcinogens and anticarcinogenes. *Grasas Aceites* 47,186-196.
- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Anonim,2017.Turkish.powder-steroid.com/quality-9205351d-usnea-extract antibacterial pharmaceutical-intermediate-cas-125-46-2-usnic-acid (Erişim tarihi Temmuz 2017).
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Erça, E.,, 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292-304.
- Aras-Hisar, Ş, Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Yanık, T., 2004. Effect of vitamin E on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes in vitro and in vivo. *Acta Veterinaria Hungarica* 52, 413-422.

- Amstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137-5149.
- Aslam, S., Zaib, S., Ahmad, M., Gardiner, J.M., Ahmad, A., Hameed, A., Furtmann, N., Gütschow, M., Bajorath, J., Iqbal, J., 2014. Novel structural hybrids of pyrazolobenzothiazines with benzimidazoles as cholinesterase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 78, 106-117.
- Atalay, F., Halici, M., Mavi, A., Cakir, A., Odabasoglu, F., Kazaz, C., Aslan, A., Kufrevioglu, O.I., 2011. Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* lichen species. *Turkish Journal of Chemistry*, 35, 647-661.
- Awika, J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- Backorova, M., Backor, M., Mikeš, J., Jendzelovsky, R., Fedorocko, P., 2010. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. *Toxicology in Vitro* 25, 37-44.
- Bayrak, Ç., Taslimi, P., Gülçin, İ., Menzek, A., 2017. The first synthesis of 4-phenylbutenone derivative bromophenols including natural products and their inhibition profiles for carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Bioorganic Chemistry*, 72, 359-366.
- Becker, L.B., Vanden Hoek, T.L., Shao Z.H., Li, C.Q., 1999. Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology*, 277, 2240- 2246.
- Beecher, G.R., 1999. In antioxidant food supplements in human health. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (eds) Academic Press, New York
- Behera, B, C., Mahadik, N., Morey, M., 2012. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharmaceutical Biology*, 50, 968-979.
- Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W., Wayner, D.D.M., 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radical Biology and Medicine* 2, 419-444.
- Benzie, I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. *Biochemistry*, 7. Baskıdan çeviri (Çeviri Editörü: Denizli A., Özden A.K.), Palme Yayıncılık.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Blekas, G., Boskou, D., 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid and α -tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. *Effect of Acidity. Grasas y Aceites*, 49, 34-37.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E : function and metabolism. The FASEB Journal, 13, 1145-1155.
- Brisdelli, F., Perilli, M., Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino, J. A., Nicoletti, M., Bozzi, A., Amicosante, G., Celenza, G., 2013. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. Phytotherapy Research, 27, 431-437.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., Verotta, L., 2009. Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. Planta Medica 75, 607-613.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Food Research International, 44, 1482-1489.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C., 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. Food Research International, 51, 66-74
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1981. The Antioxidant activity of vitamines E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. Journal of American Chemist's Society, 103, 6472-6477.
- Büyükokuroğlu, M.E., Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. Pharmacological Research, 44, 491-495.
- Cansaran, D., Kahya, D., Yurdakulol, E., Atakol, O., 2006. Identification and quantitation of usnic acid from the lichen usnea species of Anatolia and antimicrobial activity. Zeitschrift fur Naturforsch C, 773-776.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., Ferrier, D.R., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Chatonnet, A., Lockridge, O., 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochemical Journal, 260, 625-634.
- Chua, M.T., Tung, Y.T., Chang, S.T., 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. Bioresource Technology, 99, 1918-1925.
- Chuiko, G.M., Podgornoya, V.A., Zhelnin, Y.Y., 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. Comparative Biochemistry and Physiology, 135B, 55-61.
- Çakır, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yıldırım, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2006. Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium orientale* L. Var. Orientale. Turkish Journal of Chemistry, 30, 483-494
- Çoban, T.A., Blemas, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: in vivo and in vitro studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 266-270.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30, 2257-2261.

- Das, U.N., 2007. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitoring*, 13, 214-221.
- Dawes, H.W., Keene, J.B., 1999. Phenolic composition of kiwi fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2398-2403.
- Deraeve, C., Guo, Z., Bon, R.S., Blankenfeldt, W., DiLucrezia, R., Wolf, A., 2011. Psoromic acid is a selective and covalent rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *Journal of the American Chemical Society*, 134, 7384-7391.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J., 1998. Functional foodscience and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80, 77-112.
- Elliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technolgy*, 53, 46-48.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherston R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 88-95.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işıldak Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, H.Y., 2006a. Antioxidant capacity of bay (*Laurus nobilis* L.) leave extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3, 258-266.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Öztürk, L., Gökçe, İ., 2005. Investigation of antioxidant properties of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 17, 137-148.
- Elmastaş, M., Türkekul, İ., Öztürk, L., Gülçin, İ., Işıldak, Ö., Aboul-Enein, H.Y., 2006b. The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 6, 443-448.
- Ewald, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., Akesson, B., 1999. Effect of processing on major flavanoids in processed onions, green beans and peas. *Food Chemistry*, 64, 231-235.
- Farlow, M., Gracon, S.I., Hershey, L.A., 1992. A controlled trial of tacrine in Alzheimer's Disease. *JAMA*, 268, 2523-2529.
- Feldstein, J.B., Silverman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Foden, F.R., McCormick, J., O'Mant, D.M., 1975. Vulpinic acids as potential antiinflammatory agents. 1. Vulpinic acids with substituents in the aromatic rings. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18, 199-203.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritene, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.
- Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry and dietary role of potato polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1523-1540.
- Furukawa-Hibi, Y., Alkam, T., Nitta, A., Matsuyama, A., Mizoguchi, H., Suzuki, K., Moussaoui, S., Yu, Q.S., Greig, N.H., Nagai, T., Yamada, K., 2011. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. *Behavioural Brain Research*, 225, 222-229.

- Galanty, A., Koczurkiewicz, P., Wnuk, D., Paw, M., Karnas, E., Podolak, I., Węgrzyn, M., Borusiewicz, M., Madeja, Z., Czyż, J., Michalik, M., 2017. Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 40, 161-169.
- Garibov, E., Taslimi, P., Sujayev, A., Bingöl, Z., Çetinkaya, S., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Farzaliyev, V., H. Alwasel, S., Supuran, C.T., 2016. Synthesis of 4,5-disubstituted-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines and investigation of their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carbonic anhydrase I/II inhibitory and antioxidant activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 1475-6374
- Gil, M. I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F. A., 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2213-2217.
- Gilmour, K.M., 2010. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 157, 193-197
- Godbout, J.P., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2004. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*, 149, 101-109.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 821-825.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. *Archiv der Pharmazie*.346, 783-792.
- Göçer, H., 2014. Sinefrin ve fenilefrin:antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015a. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoylcarbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 316-320.
- Göçer, H., Topal, F., Topal, M., Küçük, M., Teke, D., Gülçin, İ., Alwasel, S.H., Supuran, C.T., 2015b. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 1475-6374.
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s114.
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.

- Gülçin, İ., 2006a. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, 78, 803-811.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. *Chemico-Biological Interaction*, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14, 975-985.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis decne*. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 287-293.
- Gülçin, İ., Beydemir, S., Topal, F., Gagua, N., Bakuridze, A., Bayram, R., Gepdiremen, A., 2012b. Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27, 587-594.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004a. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34, 193-202.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010a. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2227-2238.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003b. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34, 278-281.
- Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 22, 685-695.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Sciences and Technology*, 43, 195-212.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21, 354-361.

- Gülçin, İ., Elmastaş, M., Aboul-Enein H.Y., 2012a. Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 5, 489-499.
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H., 2010b. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 43-53.
- Gülçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2010c. Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Biology*, 34, 175-188.
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. KOCH var. joannis. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2004a. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Medica*, 2004; 70, 561-563.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-hederagenin. *Phytotherapy Research*, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003a. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu M.E., 2004e. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 613-616.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Akincioğlu, H., Köksal, Z., Türkan, F., Alwasel, S., 2016, The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glutathione S-transferase, lactoperoxidase, and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 1095-1101.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004b. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004c. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), *Italian Journal of Food Sciences*, 16, 17-30.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel M., Erdoğan, U., 2011a. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, 76, C585-C593.
- Gülçin, İ., Topal, F., Oztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel M. 2011b. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 5, 158-175.
- Hale, M.E., 1974. *The Biology of Lichens* In: *Contemporary Biology*, Editors, E.J.W., Bornington, F.R.S. and Wills, Clowe Sons, London.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition. Oxford University Press, New York.
- Harborne, J.B., Cody, V., Middleton, E., 1986. *Plant flavonoids in biology and medicine*. Liss, New York, pp 15-24

- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P., 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*, 2nd edn. Taylor and Francis, London.
- Harrison, P.M., Arosio, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica Biophysica Acta*, 1275, 161-203.
- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 147-162.
- Hollander, C.F., Mos, J., 1986. The old animal as a model in research on brain aging and Alzheimer's disease/senile dementia of the Alzheimer type. *Progress in Brain Research*, 70, 337-343.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Innocenti, A., Öztürk Sarıkaya S.B., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 2159-2164.
- Jin, J., Rao, Y., Bian, X., Zeng, A., Yang, G., 2013. Solubility of (+)-usnic acid in water, ethanol, acetone, ethyl acetate and n-hexane. *Journal of Solution Chemistry*, 42, 1018-1027.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*.
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., 1994. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*, 271, 985-991.
- Koçer, S., 2012. Liken metaboliti usnik asitin bazı aril-aminofenoller ile schiff bazları türevleri ve metal komplekslerinin sentezi, antitümör ve antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- Koçyiğit, U.M., Budak, Y., Gürdere, M.B., Ertürk, F., Yencilek, B., Taslimi, P., Gülçin, İ., Ceylan, M., 2017. Synthesis of chalcone-imide derivatives and investigation of their anticancer and antimicrobial activities, carbonic anhydrase and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2017; 1381-3455.
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., Truscott, T.G., 2010. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation-Studies on human cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 101, 197-102.
- Kosanić, M., Ranković, B., Vukojević, J., 2010. Antioxidant properties of some lichen species. *J Food Sciences and Technology* 48, 584-590.
- Köksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoğlu, F., Gülçin, İ., 2011. Antioxidant activity of melissa officinalis leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 217-222.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 65-78.
- Krungkrai, S.R., Suraveratun, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer AEMF, Rietjens IMCM, 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the

- mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 869–881.
- Lloyd, R.V., Hanna, P.M., Mason, R.P., 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 885–888.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of Sciences Food and Agriculture*, 86, 2046–2056.
- Macheix, J.J., Fleurient, A., Billiot, J., 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Maciazg-Dorszynska, M., Wezgrzyn, G., Guzow-Krzeminska, B., 2014. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 353, 57–62.
- Magalhaes, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2009. Flow injection based method for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta* 77, 1559–1566.
- Manojlovic, N., Rankovi, B., Kosani, M., Vasiljevi, P., Stanojkovi, T., 2012. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19, 1166–1172.
- Maqpool, M., Manral, A., Jameel, E., Kumar, J., Saini, V., Shandilya, A., Tiwari, M., Hoda, N., Jayaram, B., 2016. Development of cyanopyridine-triazine hybrids as lead multitarget anti-Alzheimer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24, 2777–2778.
- Maren, T.H., 1960. A simplifield micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126–130.
- Marnay, A., Nachmansohn, D., 1938. Choline esterase in voluntary muscle. *The Journal of Physiology*, 92, 37–47.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*; 41, 31–91.
- Miller, D.D., 1996. Mineral. *Food Chemistry*, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, pp. 618–649.
- Mukherjee, S., Samanta, S., Roy, B. C., Bhaumik, A., 2006. Efficient allylic oxidation of cyclohexene catalyzed by immobilized Schiff base complex using peroxides as oxidants. *Applied Catalysis A: General* 301, 79–88.
- Mutahir, S., Jonczyk, J., Bajda, M., Khan, I.U., Khan, M.A., Ullah, N., Ashraf, M., Ain, Q., Riaz, S., Hussain, S., Yar, M., 2016. Novel biphenyl *bis*-sulfonamides as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis biological evaluation and molecular modeling studies. *Bioorganic Chemistry*, 64, 13–20.
- Nash, III., Thomas, H., 1996. *Lichen Biology*. Cambridge University Press 304p, UK.
- Niki, E., Kawakami, A., Yamamoto, Y., Kamiya, Y., 1985. Oxidation of lipids: VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bulletin of Chemical Society of Japanese*, 58, 1971–1975.

- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., Kamiya, Y., 1982. Regeneration of vitamin E from a-chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chemistry Letters*, 27, 789-792.
- Nunes, P.S., Albuquerque-Junior, R.L., Cavalcante, D.R.R., Dantas, M.D.M., Cardoso, J.C., Bezerra, M.S., Souza, J.C.C., Serafini, M.R., Quitans-Jr, L.J., Bonjardim, L.R., Araujo, A. A. S., 2010. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 761593.
- Odabaşoğlu, F., Çakır, A., Süleyman, H., Aslan, A., Bayır, Y., Halıcı, M., Kazaz, C., 2006. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 59-65.
- Oktay, M., Gülçin, İ., 2002. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 36, 263-271
- Oktay, M., Yıldırım, A., Bilaloğlu, V., Gülçin, İ., 2007. Antioxidant activity of different parts of ısgın (*Rheum ribes* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 3047- 3055.
- Oliveira, I., Valentao, P., Lopes, R., Andrade, P.A., Bento, A., Pereira, J.A., 2009. Phytochemical characterization and radical scavenging activity of *Portulaca oleraceae* L. leaves and stems. *Microchemical Journal*, 92, 129-134.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122–3128.
- Ou, B., Prior, R.L., Huang, D., 2005. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,1841-1856.
- Özçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Sciences*, 68, 487-490.
- Özgeriş, B., Göksu, S., Polat Köse, L., Gülçin, İ., Salmas, R.E., Durdağı, S., Tümer, F., Supuran, C.T., 2016. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel urea and sulfamide derivatives incorporating dopaminergic 2-aminotetralin scaffolds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24, 2318-2329.
- Öztaşkın, N., Çetinkaya, Y., Taslimi, P., Göksu, S., Gülçin, İ., 2015. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of novel bromophenol derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 60, 49-57.
- Özturan Özer, H, E, 2012. Alzheimer hastalığında oluşan β -amiloid fibrillerin yeni sentezlenen kolinesteraz İnhibitörleri ile destabilizasyonu. Yüksek Lisan Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı Fenolik Asitlerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a series of Phenolic Acids. *Chemical Biology and Drugs Design*. 75, 515-520.

- Öztürk Sarıkaya, S.B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2011. In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 4259-4262.
- Plsikova, J., Stepankova, J., Kasparkova, J., Brabec, V., Backor, M., Kozurkova, M., 2014. Lichen secondary metabolites as DNA-interacting agents. *Toxicology in Vitro*, 28, 182–186.
- Pokorny, J., 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan H (ed) Academic Press, London, p 141.
- Polat Köse, L., Gülçin, İ., Gören, A.C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A.L., Gorinstein, S., 2015. LC–MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. *Industrial Crops and Products*, 74, 712-721.
- Prior, R.L., Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1173-1181.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rabelo, T. K., Zeidán-Chuliá, F., Vasques, L. M., Santos, J. P. A., Rocha, R. F., Bittencourt Pasquali, M. A., Rybarczyk-Filho, J. L., Araújo, A. A. S., Moreira, J. C. F., Gelain, D. P., 2012. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26, 304-314.
- Rankovic, B., Kosanic, M., Stanojkovic, T., Vasiljevic, P., Manojlovic, N., 2012. Biological activities of *toninia candida* and *usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14707-14722.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-795.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933-956.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J. T. 1964. Carbonic anhydrase, from human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 1065-1078.
- Rock, C.L., Jacob, R.A., Bowen, P.E., 1996. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 693–702.
- Saleh, M., Hashem, F.A. and Glombitza, K.W. 1998. Study of *Citrus taitensis* and radical scavenger activity of the flavonoids isolated. *Food Chemistry*, 63, 397-400.
- Sartor, V., Henderson, P.T., Schuster, G.B., 1999. Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *Journal of The American Chemical Society* 121, 11027–11033.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzyme kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.
- Sekutor, M., Mlinaric-Majerski, K., Hrenar, T., Tomic, S., Primozic, I., 2012. Adamantane-substituted guanylhyazones: Novel inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Bioorganic Chemistry*, 41-42, 28–34.

- Selen İşbilir, Ş., 2008. Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, S-5.
- Sepulveda, B., Chamy, M.C., Piovano, M., Areche, C., 2013. Lichens: Might be considered as a source of gastroprotective molecules. Journal of the Chilean Chemical Society, 58, 1750-1752.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Food Phenolics Sources Chemistry Effects Applications. Technomic Publication, pp. 235-277 USA.
- Shrestha, G., Clair, L., 2013. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. Phytochemistry Reviews, 12, 229-244.
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food and Chemical Toxicology, 46, 3295-3302.
- Sisodia, R., Geol, M., Verma, S., Rani, A., Dureja, P., 2013. Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. Division of Agricultural Chemicals, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
- Souza, L. G., Renna, M.N., Figueroa-Villar, J. D., 2016. Coumarins as cholinesterase inhibitors: A review, Chemico-Biological Interactions, 254, 11-23.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S., 2007. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). Food Chemistry, 102, 764-770.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Cassini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13, 4336-4350.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran C.T., 2011. *In Vitro* inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. Chemical Biology and Drugs Design. 77, 494-499.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan A., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 3207-3211.
- Şerbetçi, Tohma, H., Gülçin, İ., 2009. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). International Journal of Food Properties 13, 657-671.
- Topal, F., Gülçin, İ., Daştan, A., Güney, M., 2017. Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. International Journal of Biological Macromolecules, 94, 845-851.
- Turan, G. T., 2012. 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin (2,4-D) Kılıçkuyruk (*Xiphophorus Herrerii*) balıklarının bazı dokularında asetiklorinesteraz (AChE) aktivitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

- Uçar, E.Ö., Karagöz, A., Arda, N., 2006. Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. album. *Fitoterapia*, 77, 556-560.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- Weber, P., Bendich, A., Schalch, W., 1996. Vitamin C and human health a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal For Vitamin and Nutrition Research*, 66, 19-30.
- Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia officinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2959-2962.
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T., DeLong, M.R., 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Annals of Neurology*, 10.1002/ana.410100203.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A., 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of American Chemistry Society* 123, 1173-1183.
- Wright, A., Bubbs, W.A., Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2002. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76, 35-46.
- Yang, Z., Song, Z., Xue, W., Sheng, J., Shu, Z., Shi, Y., Liang, J., Yao, X., 2014. Synthesis and structure-activity relationship of nuciferine derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 3178-3186.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A.A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
- Yuan, Y.V., Bone, D.E., Carrington, M.F., 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem* 91, 485-494.
- Zhu, J., Wu, C.F., Li, X., Wu, G.S., Xie, S., Hu, Q.N., Deng, Z., Zhu, M.X., Luo, H.R., Hong, X., 2013. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 4218-4224.
- Zi-Chen, Xu., Xiao-Bing, Wang., Wen-Ying, Yu., Sai-Sai, Xie., Su-Yi, Li., Ling-Yi, Kong., 2014. Design, synthesis and biological evaluation of benzylisoquinoline derivatives as multifunctional agents against Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24, 2368-2373.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Kars’ ta doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kars’ ta tamamladı. 2000 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği Bölümü’nden 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalında Doktora öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.

