

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Tansu BABAYİĞİT

SIÇANLARDA ETANOL İLE OLUŞTURULAN MİDE HASARINDA
HÜNNAP (*ZİZİPHUS JUJUBA*) MEYVE EKSTRAKTININ
BİYOKİMYASAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI-2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ETANOL GAVAJI YAPILMIŞ SIÇANLARA UYGULANAN HÜNNAP (*ZIZIPHUS JUJUBA*) MEYVE EKSTRESİNİN BAZI KAN ENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tez Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayhan TANYELİ

2019, 46 Sayfa

Jüri: Doç. Dr. Veysel ÇOMAKLI

Dr. Öğr. Üyesi Selçuk ÇEKER

Dr. Öğr. Üyesi Namık KILINÇ

Bu çalışmanın amacı, %99 etanol gavajı uygulanmış sıçanlarda hünnap (*Ziziphus Jujuba*) bitkisi su ekstraktının sıçan kanındaki bazı enzimler (glutasyon redüktaz (GR), asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE)) üzerine etkisini araştırmaktır. Bu amaç için ortalama 250-300 gram ağırlığında toplam 32 adet Wistar albino erkek sıçandan aşağıdaki gibi: Kontrol (n=8), alkol (n=8), 4 ml/kg *Ziziphus Jujuba* düşük doz (DD, n=8) ve 8 ml/kg *Ziziphus Jujuba* yüksek doz (YD, n=8) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. *Ziziphus Jujuba* ekstraktı 10 gün boyunca oral gavaj ile sıçanlara uygulandı. 11. günde, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te gastrik ülser oluşturmak için etanol, oral gavaj ile uygulandı. Alkol uygulandıktan 90 dakika sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Çalışmanın ikinci kısmında sakrifiye edilen sıçanlardan alınan kan örneklerinde GR, AChE ve BChE enzimlerinin aktivite değerleri ölçüldü.

2019, 46 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hünnap, Enzim, Gastrik ülser, Alkol.

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF JUJUBE (*Ziziphus Jujuba*) FRUIT EXTRACT ON SOME BLOOD ENZYMES APPLIED TO ETHANOL GAVAGE RATS

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Co-Advisor: Asist. Prof. Dr. Ayhan TANYELİ

2019, 46 pages

Jury: Assoc. Prof. Dr. Veysel ÇOMAKLI

Asist. Prof. Dr. Selçuk ÇEKER

Asist. Prof. Dr. Namuk KILINÇ

The aim of this study was to investigate the effect of jujube (*Ziziphus Jujuba*) water extract on some enzymes (glutathione reductase (GR), acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) in rat blood in rats treated with 99% ethanol gavage. For this purpose, a total of 32 Wistar albino male rats weighing 250-300 grams on average were as follows: Control (n = 8), alcohol (n = 8), 4 ml / kg *Ziziphus Jujuba* low dose (DD, n = 8) and 8 ml / kg *Ziziphus Jujuba* high dose (HD, n = 8) was formed into 4 groups. *Ziziphus Jujuba* extract was administered to rats by oral gavage for 10 days. On the 11th day, ethanol was administered by oral gavage to create gastric ulcer in Group 2, Group 3 and Group 4. The rats were sacrificed 90 minutes after alcohol administration. In the second part of the study, the activity values of GR, AChE and BChE enzymes were measured in blood samples taken from sacrificed rats.

2019, 46 pages

Key words: Jujube, Enzyme, Gastric ulcer, Alcohol.

TEŞEKKÜR

Yükseklisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın ilk kısmı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Kontrol Laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Enzim ölçümleri ise Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana rehber olan, sabrını, maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e ve sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayhan TANYELİ'ne sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca Dr. Öğr. Üyesi Ersen ERASLAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Can GÜLER'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında maddi, manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli aileme de ayrıca teşekkür ederim.

Tansu BABAYİĞİT

Temmuz 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
TEŞEKKÜR	4
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Asetilkolinesteraz enzimi	6
1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması.....	6
1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu	8
1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri	9
1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları	10
1.2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları	10
1.2.6. Hünnap (Zizypus jujuba)	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	18
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	18
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	18
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Protein tayini	20
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	20
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	20
3.2.2. İnsan Eritrosit GR Enziminin Aktivitesinin Ölçümü	20
3.2.3. Ellman yöntemine göre AChE / BChE inhibitör etkisi ölçülmesi	21
3.2.4. Meyve Örneklerinin hazırlanması	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	23
4.1. Kantitatif Protein Tayini.....	23

4.2. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnap ekstresinin <i>in vivo</i> etkisinin incelenmesi.....	23
4.2.4. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnap ekstresinin <i>in vitro</i> etkilerinin incelenmesi	25
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	28
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GR	: Glutasyon redüktaz
AChE	: Asetilkolinesteraz
BChE	: Bütilkolinesteraz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
EI	: Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
S	: Substrat
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
V	: Hacim
λ	: Dalga boyu

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 1.1.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)	4
Şekil 1.1.b. Okside glutatyon yapısı, GSSG, 2(L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin)	4
Şekil 1.2. Asetilkolinesterazın üç boyutlu yapısı.....	7
Şekil.1.3. Asetilkolinin yapısı.....	7
Şekil 1.4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.....	7
Şekil 1.5. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.....	8
Şekil 1. 6. Hünnap meyvesi	11
Şekil 4.1. Bradford metoduyla kantitatif tayin için kullanılan standart protein grafiği..	23
Şekil 4.2. Hünnap ekstresinin sıçan kan AChE enzimi aktivitesi üzerine <i>in vivo</i> etkisi..	24
Şekil 4.3. Hünnap ekstresinin sıçan kan BChE enzimi aktivitesi üzerine <i>in vivo</i> etkisi..	25
Şekil 4.4. Hünnap ekstresinin sıçan kan GR enzimi aktivitesi üzerine <i>in vivo</i> etkisi....	25
Şekil 4.5. Hünnap ekstresinin sıçan GR enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite- [Hünnap] grafiği.....	26
Şekil 4.7. Hünnap ekstresinin sıçan AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite- [Hünnap] grafiği	27
Şekil 4.8. Hünnap ekstresinin sıçan BChE enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite- [Hünnap] grafiği.....	27
Çizelge 4.1. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimlerinin hünnap ekstresi ile <i>in vivo</i> inhibisyon sonuçları.....	24
Çizelge 4.2. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnapın <i>in vitro</i> inhibisyon etkileri.....	26

1. GİRİŞ

Laboratuvarlar birçok önemli kimyasal reaksiyonların kimyagerler tarafından gerçekleştirildiği ve buradan çıkan sonuçların insanlığa sunulduğu önemli merkezlerdir. Bunun gibi her canlı vücudunda da milyonlarca laboratuvarın varlığı dikkatlerden kaçmamalıdır. Hücre ve hücrelerden oluşmuş canlılar durup dinlenmeden reaksiyonlar gerçekleştiren kimyasal laboratuvarlardır. Bu laboratuvarlarda iş gören kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyo-makromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2013).

1.1. Enzimler

Enzimler, canlıların yapısındaki hücrelerde sentezlenen ve metabolizmada cereyan eden reaksiyonların hızlandırılmasını ve yan ürün oluşturmaksızın %100 ürüne dönüşümünü gerçekleştiren biyolojik katalizörlerdir. Katalitik aktiviteye sahip RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimler, proteinlerin en büyük ve özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle yok olur (Lehninger 2013).

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık 12 000'den 1 milyon Daltona kadar değişen molekül kütlesine sahiptir. Bazı enzimler aminoasit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymaz. Diğerleri **kofaktör** olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya **koenzim** olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinir. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal

iyonu bir **prostetik grup** olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimleriyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim **holoenzim** olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein kısmı **apoenzim** veya **apoprotein** olarak adlandırılır (Lehninger 2013).

Birçok enzim, aktivitesini tarif eden deyim veya kelimeye ya da substratın sonuna “-az” son eki ilavesiyle adlandırılır. Böylece üreaz; ürenin hidrolizini, DNA polimeraz; DNA oluşturmak üzere nükleotidlerin polimerleşmesini katalizler. Pepsin ve tripsin gibi diğer enzimler substratlarını veya tepkimelerini belirtmeksizin isimlendirilir. Zamanla, birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç duyuldu. Bunun üzerine enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmaya tabi tutuldu. Örneğin E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7 bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1 fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferini sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir.

Enzimler 6 gruba ayrılmışlardır;

1.Oksiredüktazlar: 2 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 (Lehninger 2013; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Kanın %42-45'ini eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücreleri oluşturur. Eritrositler ilk kez 1665 yılında Malphigi tarafından tanımlandı. 1673'te Leuwenhock kanın kırmızı renginin eritrositlere bağlı olduğunu buldu. Şekillerinin disk biçiminde olduğu 1765'te saptanan eritrositlerde, demirin varlığını Menghini, hemoglobini ise Funke bulmuştur (Özer 1985).

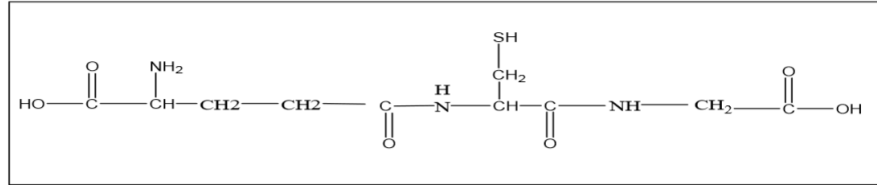
Eritrositlerin görevi, yapısındaki hemoglobinin gerçekleştirdiği, dokulara oksijen taşımaktır. Bu görevi yerine getirebilmeleri için şekillerini, içyapılarını ve membran aktivitelerini koruyacak enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerji eritrositlerin tek yakıtı olan glukozun anaerobik glikolizi ve pentoz fosfat yolu ile gerçekleşmektedir (Özer 1985).

İnsan eritrositlerinde, pentoz fosfat yolunun fonksiyonu, eritrositlerin canlılığının temini açısından önemlidir. Normal bir eritrosit yaklaşık 120 ile 135 gün arasında bir yaşam süresine sahiptir. Olgunlaştığında eritrosit proteinleri sentezleyemez ve mitokondriden yoksundur. Eritrositler, glutatyon, koenzimler ve ATP gibi önemli bileşiklerin sentezi için enerjiye ihtiyaç duyarlar ve bu enerji glukozun metabolize edilmesiyle sağlanır. ATP, laktik asit oluşumuyla beraber anaerobik glikolizden sağlanır, ancak solunum zinciri yoluyla oksidatif fosforilasyon mümkün değildir. Pentoz fosfat yoluyla NADPH'nin oluşumu, methemoglobinin indirgenmesini (oksijene bağlanmayan hemoglobinin Fe^{+3} formu devamlı olarak oluşur) ve redükte formda glutatyon eldesini sağlar. Glutatyon, örneğin aktif yüzünde gerekli bir -SH grubu içeren enzimler gibi moleküllerin redükte şekilde olmalarını temin etmek için bir indirgeyici

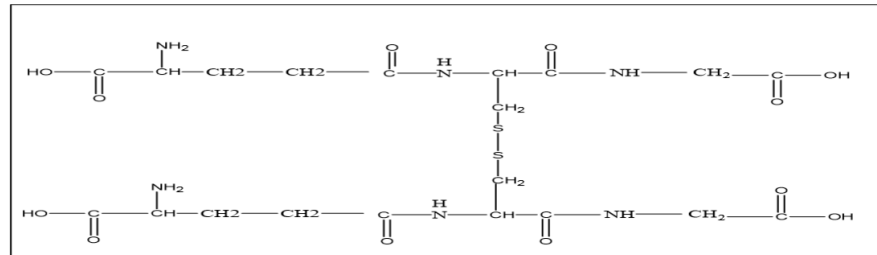
bileşik gibi fonksiyon görür. Sonuç olarak glutatyon redükte formu GSH'ın NADPH tarafından rejenere edildiği GS-SG'ye okside edilir. GSSG'nin NADPH kullanılarak GSH'a dönüştüğü reaksiyon glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir (Montgomery 1996).

Glutatyon (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin) eritrositlerde ve diğer hücrelerde bulunan önemli bir tripeptiddir. Atipik bir tripeptiddir, çünkü sistein amino asitinin amino grubu ile peptid bağı oluşumunda L-glutamik asitin γ -karboksil grubu yer alır (Montgomery 1996).

Glutatyon okside ve redükte olmak üzere iki formda bulunur (Şekil 1.1.a ve 1.1.b). ilk olarak 1888 yılında Ray-Pailhade tarafından maya hücresinde bulunarak “filothion” olarak adlandırılmıştır. 1921’de Hopkins tarafından saflaştırılarak kristallendirilmiş ve bugünkü ismi verilmiştir (Zubay 1988; Açan 1990).



Şekil 1.1.a. İndirgenmiş glutatyon yapısı ,GSH, (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin)



Şekil 1.1.b. Okside glutatyonun yapısı ,GSSG, 2(L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin)

Glutatyon, hücrede ATP gerektiren iki ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Bu reaksiyonları, γ -glutamil sistein sentetaz (γ -GSS) ve glutatyon sentetaz (GS) enzimleri katalizler (Richman and Meister 1975; Toribio *et al.*, 1996; Misra and Griffith 1998).

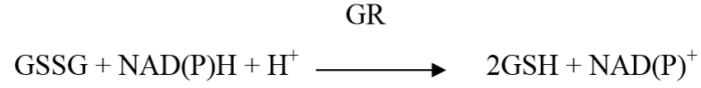
Normal şartlarda indirgenmiş glutatyon hücrelere göre değişmekle beraber 0,5 ile 10 mM düzeyinde bulunur. Eritrositlerde glutatyonun çoğu indirgenmiş halde bulunur. Eritrositlerde GSH yaklaşık 2 mM gibi yüksek konsantrasyonda bulunur. GSSG konsantrasyonu ise 4 µM civarındadır. İnsan eritrositlerinde GSH/GSSG oranı yaklaşık 500/1 dir ve yarı ömrü 4 gündür (Kondo *et al.*, 1980; Arrick and Nathan 1984; Shobet and Beutler 1986; Cooper 1997).

İndirgenmiş glutatyon enzimatik yada enzimatik olmayan yollarla okside glutatyon (GSSG) dönüşür. Bu dönüşüm özellikle peroksitlerin parçalanmasında ve enzimatik transhidrojenasyon sonucu gerçekleşmektedir.

Eritrositlerde glutatyonun yükseltgenmesi, ortamda oluşan H₂O₂ ve diğer organik peroksitlerin indirgenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu reaksiyonun enzimi, glutatyon peroksidazdır. Okside glutatyonu indirgenmiş forma ise glutatyon redüktaz dönüştürmekte ve yüksek GSH/GSSG oranı sağlamaktadır. Bu dönüşüm reaksiyonları glutatyon redoks çevrimi olarak adlandırılmaktadır (Fujiwara *et al.* 1989; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Glutatyon, yapısında bulunan –SH grupları ile oksitleyici ajanların bozucu etkilerine karşı hücreyi korumaktadır. Dolayısıyla glutatyonun düşük konsantrasyonunda bazı metabolik olumsuzluklar meydana gelebilir. Glutatyonun belirlenen görevlerinden bazıları şunlardır: Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonu, hemoglobin, spektrin gibi membran proteinlerini ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunması, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu, DNA ve protein sentezi, amino asit transportu, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin konformasyonunun değişmesi, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynamasıdır (Demir 1994; Knapen *et al.*, 1999).

Glutatyon redüktaz (GR) enzimi (Glutatyon; NADP+ oksidoredüktaz; EC 1.8.1.7) ilk defa 1951’de tanımlanmıştır. Bu enzim düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfid substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler.



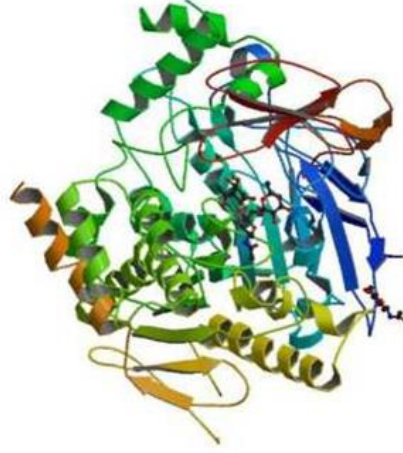
Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği bu reaksiyonun en önemli hedeflerinden biri hücre ortamındaki GSH/GSSG oranını korumaktır. Bu oran kan hücrelerinde yaklaşık olarak 500/1’dir. Eritrositlerde GSH eksikliği zorunlu metabolik işlemlerin ciddi bir şekilde bozulmasıyla sonuçlanır ve bu durum hemolize yol açar. Bu nedenle pentoz fosfat yolunun etkin olarak çalışabilmesi için 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimiyle beraber bu yolun enzim aktivitelerinin yeterli miktarda olması gerekir (Montgomery 1996; Keha ve Küfrevioğlu 2008).

1.2. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (E.C. 3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) (AChE), nörotransmitter asetilkolini hidrolizleyen hidrolaz grubundan bir enzimdir. AChE başlıca nöromuskular kavşakta ve sinaptik iletimi sonlandırdığı kolinerjik beyin sinapslarında bulunur. Enzimlerin karboksilesteraz ailesine aittir. AChE enzimi pestisitler ve sinir gazları gibi organofosfat türevi bileşiklerle inhibisyon için birincil hedeftir.

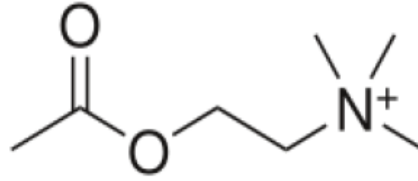
1.2.1. Asetilkolinesterazın yapısı ve mekanizması

Oldukça yüksek aktiviteye sahip olan AChE enzimi saniyede yaklaşık olarak 25.000 asetilkolin (ACh) molekülünü parçalar. Bu enzimin aktif bölgesi katyonik alt birim ve anyonik alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşur. AChE’nin yapısı ve reaksiyon mekanizması enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (Susman *et al.* 1991).



Şekil 1. 2. Asetilkolinesterazın üç boyutlu yapısı.

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



Şekil 1. 3. Asetilkolinin yapısı.

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



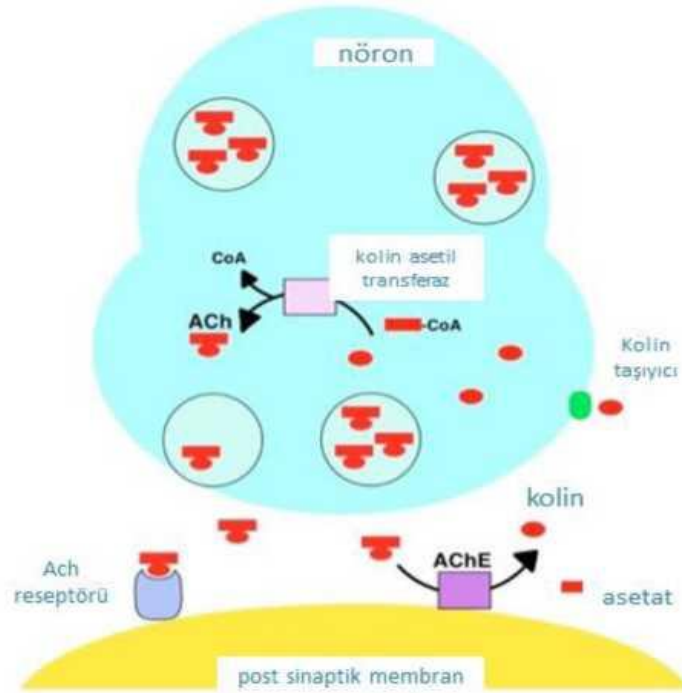
Şekil 1. 4. Asetilkolinesterazın kataliz reaksiyonu.

Enzimdeki anyonik alt birim asetilkolinin pozitif kuaterner amini ile bağlanır. Ayrıca bu bölgeye diğer katyonik substratlar ve inhibitörler de bağlanır. Katyonik substratlar, aktif bölgeye giden aralıkta sıralanan 14 aromatik amino asit ile etkileşimden

başka anyonik bölgede negatif yüklü amino asitlerle bağlanmazlar (Ariel *et al* 1995). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça yüksek bir korumaya sahiptir (Ordentlich *et al.* 1993). Aromatik asitler arasında triptofan 84 kritik öneme sahiptir ve bu amino asitin alaninle yer değiştirmesi enzimin reaktifliğini 300 kat azaltır (Tougu 2001). Aktif bölgeye giden bu aralık yaklaşık olarak 20 Å (angstron) uzunluğa sahiptir. Aktif bölge enzimin alt kısmından 4 Å yukarıda bir konuma sahiptir (Harel *et al.* 1993; Tripathi, 2008).

1.2.2. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu

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



Şekil 1. 5. Asetilkolinesterazın biyolojik fonksiyonu.

1.2.3. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

Bir asetilkolinesteraz inhibitörü AChE enzimini inhibe ederek asetilkolinin yıkımını engeller. Böylece nörotransmitter asetilkolinin konsantrasyonunu ve işlev süresini arttırır. AChE inhibitörleri geri dönüşümlü, yarı geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak etki ederler (Pohanka 2012; Zilbeyaz *et al.* 2018).

Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü AChE inhibitörleri çoğunlukla tedavi amaçlı kullanılır. Bu inhibitörlere karbamatlar, fizostigmin, neostigmin, pyridostigmine, ambenonium, demekaryum, rivastigmin, fenantren türevleri, galantamin, kafein (yarışmasız), piperidinler, donepezil, takrin (tetrahidroaminokridin, THA), edrofonyum, Huperzin A, ladostigil, ungeremine, lactucopicrin örnek olarak verilebilir (Pohanka 2012; Zilbeyaz *et al.* 2018; Cavdar *et al.* 2019; Ozil *et al.* 2019).

Yarı-geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silahlar ve pestisitlerin yapımında kullanılır. Bu inhibitörlere organofosfatlar, ekotiofat, sarin, diazinon, ethiofencarb, propamocarb, diizopropilfluorofosfat, malathion, soman, galantamin, cadusafos, klorprifos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, parathion, aldicarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb, pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbetamit, karbofuran, karbosulfan, chlorbufam, chlorpropham, formetanate, methiocarb, methomyl, propham, onchidal ve kumarinler örnek olarak verilebilir (Pohanka 2012).

1.2.4. AChE enziminin inhibitörlerinin kullanım alanları

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

- Doğal olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı zehirler AChE enzimini inhibe edebilirler.
- Sinir gazları kimyasal silah olarak kullanılabilir.

- İnsektisitlerde bulunurlar (Colovic *et al.* 2013).
- Tıbbi amaçlı olarak, glukom ve myasthenia gravis tedavisinde, antikolinerjik zehirlenmelere karşı antidot olarak, non-depolarlayıcı kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmek için, Alzheimer gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarının tedavisinde özellikle tepkisizliğe karşı, Lewy Body Dementia ve Parkinson Hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Taylor *et al.* 2012). Butirilkolinesteraz (BChE, E.C. 3.1.1.8, aşılkolin aşılhidrolaz) enzimi inhibitörleride son yıllarda AChE inhibitörleri gibi Alzheimer hastalığı tedavisinde önemli uygulama alanı bulmuştur (Taylor *et al.* 2012).

1. 2.5. Kolinesterazların Moleküler ve Protein Yapıları

Kolinesteraz enzimleri (AChE ve BChE) moleküler formlarının farklılığına, çözünürlük özelliklerine, kuartern yapıları ve kendilerini oluşturan alt birim sayısına göre sınıflandırılırlar. Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Kolinesteraz enzimleri substrat özgülüğüne, ortam substrat konsantrasyonundaki davranışlarına ve inhibitörl duyarlılıkları göz önünde tutularak iki sınıfta toplanmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8) ise psödokolinesteraz veya spesifik olmayan kolinesteraz olarakta adlandırılır. AChE eritrositler ve beyinde çok yüksek miktarda bulunurken, BChE enzimi ise serum, karaciğer, pankreas ve santral sinir sisteminde bulunur. AChE enzimi tarafından gerçekleştirilen reaksiyon enzimatik olarak iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada AChE enzimi güçlü bir nükleofil gibi davranır, ikinci aşamada ise enzimin aktif bölgesinde bulunan bir serin reidüsünün nükleofilik hidroksil grubunu kullanmak sureti ile mükemmel bir hidrolizleyici grup etkisi gösterir. AChE enziminin ana görevi kolinerjik nörotransmisyonun bitirilmesidir fakat ACh ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE enziminin gerçek fizyolojik görevi tam olarak bilinmemektedir (Massoulie *et al.*, 1993; Massoulie 2002).

1.2.6. Hünnap (Zizyphus jujuba)

Zizyphus türü bitkiler (Rhamanceae) Dünya’da yaygın şekilde özellikle de Asya  lkelerinde, idrar yolu enfeksiyonları, alerji, depresyon, kabızlık, kronik bron it, karaciğer hastalıkları ve uykusuzluk gibi birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Li *et al.*, 2005). Hünnap meyvesinin kanser hücrelerinin antiproliferasyonuda d hil olmak üzere çeşitli biyolojik etkinliklerden sorumlu olan polisakkaritler, fenolikler, flavonoidler ve saponinler gibi hayati önem taşıyan fonksiyonel bileşenlerin zengin bir kaynağıdır. Kafeik asit, phidroksibenzoik asit, ferrulik asit ve *p*-kumarik asit, Zizyphus'ta (Muchuweti *et al.*, 2005) bildirilen en önemli fenolik maddeler olup, serbest radikallerin aktivitelerini azaltır (Kamilo lu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Rhamnaceae ailesinin bir  yesi ve 40 t re sahip olan Zizyphus jujuba esas olarak Güneydoğu Asya,  in ve Akdeniz'in sıcak ve subtropik bölgelerinde ve Türkiye'de Marmara, Batı ve Güney Anadolu’da yetişen bir meyvedir (Singh and Arya, 2011).



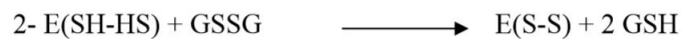
Şekil 1. 6. Hünnap meyvesi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Glutasyon redüktaz enzimi flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesindendir. GR enzimi okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş glutatona (γ -L-glutamil-L-sisteinil glisin; GSH)'a NADH veya NADPH'ı indirgeyici bir ajan olarak kullanarak indirgenme reaksiyonunu katalizler (Müller 1992; Gül *et al.* 2000).

GR'nin farklı kaynaklardaki mol kütlesi 70.000-140.000 dalton arasında değişir. Enzimin genellikle birbirinin aynı olan iki alt birimden oluştuğu ve her bir alt birimine bir FAD'nin bağlandığı tesbit edilmiştir. İnsan eritrosit glutasyon redüktaz enziminin yaklaşık 132.000 dalton olduğu belirlenmiştir (Douglas 1987).

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonu indirgenmiş hale dönüştürürken, NADPH'dan gelen elektronlar okside glutasyonun disülfür bağına direkt olarak aktarılmaz. Önce FAD'ye aktarılır daha sonra alt birimdeki 2 sistein arasında bulunan disülfür köprüsüne transfer etmek suretiyle okside glutatona aktarılmış olur. Her bir alt birim 3 tane yapısal alan içerir. Bunlar FAD bağlayıcı alan, NADPH bağlayıcı alan ve ara yüz alanıdır. FAD alanı, NADP⁺ alanı birbirine benzer ve diğer dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara da benzer. FAD ve NADP⁺ izoalloksazin ve nikotinamid halkaları birbirine geçecek şekilde aralarında bağlanırlar. Okside glutasyon için bağlayıcı alan, bir alt birimin FAD alanı ile diğer alt birimin ara yüz alanından meydana geldiği bilinmektedir. Reaksiyonun iki basamakta gerçekleştiği önerilmektedir (Siegel *et al.* 1998; Patel *et al.* 1998).



İlk yarı reaksiyonda, NADPH tarafından enzimin indirgenmesi sağlanır ve kararlı bir hal olan E(SH)₂ formu oluşur. İkinci yarı reaksiyonda ise GSSG, E(SH)₂ tarafından indirgenerek iki mol GSH oluşur (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin katalitik mekanizmasında amino asit kalıntıları da görev yapar. GSSG'nin bağlandığı bölgede Tyr114 ve NADPH bağlama bölgelerinde ise Tyr197 amino asitleri bulunmaktadır. İnsan glutatyon redüktazındaki bu bölgeler, diğer türlerden elde edilen enzimlerle karşılaştırıldığında oldukça spesifik bölgelerdir. Tyr197 yüksek ökaryotlardan elde edilen bütün glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktazlarda bulunur.

Tyr114 ve Tyr197 enzim-substrat kompleksinin x-ray difraksiyon analizlerinde substrat aktif bölgeye bağlandığı zaman değişikliğe uğradığı belirlenmiştir. Enzim üzerinde Tyr197 yan zinciri flavin halkasının üzerine dikey konumda bulunur. Bu düzenlenmenin çözücülerin girişini engelleyerek enzimi koruduğu düşünülmektedir. NADPH ile bağlanma Tyr197'nin ana zincire doğru hareket etmesine ve OH grubunun 6,4 Å hareketinden dolayı C α -C β bağlarının çevresinde dönmeye sebep olur. Enzim-NADPH kompleksinde flavin, nikotinamid ve Tyr197 halkalarının hemen hemen paralel olduğu belirlenmiştir.

İnsan GR'sinin spektroskopik, kinetik ve katalitik nitelikleriyle ilgili yapılan bir çalışmada aktif bölgelerdeki Tyr114 ve Tyr197 amino asitleri LEÜ ve Ser amino asitleriyle yerleri değiştirildiğinde enzimin kinetik özelliklerinin büyük ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak aktif bölgedeki amino asitlerin aromatikliğinin enzimin kinetik özelliklerini etkilediği belirlenmiştir (Siegel *et al.* 1998).

Enzimin kendi substratı olan NADPH'a ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. GR'nin katalizlediği reaksiyon dönüşümlüdür. Fakat reaksiyonun ters yönde ilerlemesi için ortamda yüksek konsantrasyonda GSH ve NADP⁺ olmalıdır. İn vitro şartlarda NADH az bir afinite ile elektron ve proton sağlayıcı olarak kullanılabilirse de NADPH fizyolojik şartlarda aktiviteyi sağlayan tek koenzimdir. Fizyolojik şartlarda reaksiyon esas olarak

tek yönlüdür ve GR bu yolla hücre içerisinde GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlar (Douglas 1987; Açıan 1990).

GR enziminin aktivite ölçümü ya karışımdaki NADPH'nin azalması yada GSH'nin oluşması esasına dayanarak yapılmaktadır. NADPH'nin oranının azalmasına dayanan ölçüm 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilerek aktivite belirlenir. GSH oluşumuna dayanan yöntemlerde ise 5,5'-ditiyo-bis-[2-nitrobenzoik asit] (DTNB) kullanılır ve 412 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilir (Carlberg and Mannervik 1985; Toribio et al. 1996).

Enzimin aktivitesi ölçülürken GSSG, NADPH, uygun pH'daki uygun tampon ve genelde 1/20 oranında hemolizat veya homojenat kullanılmaktadır. NADH'nin K_M 'si NADPH'nin K_M 'sinden 17 kat daha büyük olduğundan NADPH'ı kullanmak tercih edilmektedir. Substrat olarak GSSG dışında CoASSG, CySSCy ve GSSO₃H molekülleride kullanılabilir. Bazı yayınlarda ölçüm ortamına EDTA ve FAD'de katılmaktadır. Aktivite ölçüm ortamına son eklenen madde bazı yayınlarda NADPH, bazılarında ise enzim örneğidir. Enzim için aktivite birimi 1µmol NADPH'nin yükseltgenmesine sebep olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Le Trang *et al.* 1983; McCallum and Barrett 1995; Lamotte *et al.* 2000).

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enziminin aktif formunun bir dimer olduğu belirlenmiştir. Tetramer yapıda enzim olduğu da bilinmektedir, fakat bu yapı aktif olmayan yada daha az aktif formdur. İnsan eritrosit GR enziminin yüksek NADPH konsantrasyonunda inhibe olduğu belirlenmiştir. Bu durum dimer yapıdaki enzimin tetramer yapıya dönüşmesiyle açıklanmaktadır (Rendon et al. 1986).

Eritrositlerde bulunan GR enziminin aktivitesindeki düşüş ve yükselişlerin bir çok klinik bozuklukla ilgili olduğu tesbit edilmiştir. İn vitro çalışmalarda FAD'nin aktive ettiği, ATP'nin inhibe ettiği, ADP ve AMP'nin ise ATP'ye oranla daha az inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun sebebinin adenin nükleotidinin glutatyon redüktazın yapısında bulunan FAD'ye bağlanması olduğu düşünülmüştür (Beutler 1969).

Enzimler üzerine yapılan çalışmaların büyük bir kısmını ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi ve bu çalışmalardan yararlanılarak yeni ilaçların geliştirilmesi gibi çalışmalar oluşturmaktadır. İlaçlar enzim sistemleri ile inhibitör veya aktivatör olarak bir şekilde etkileşirler. Yapılan araştırmalarda ilaçların çoğunun hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak benzer etkiyi gösterdiği belirlenmiştir, fakat bazı ilaçlarda *in vivo* ve *in vitro* çalışmaları farklılık göstermektedir (Beydemir *et al.* 2000; Erat *et al.* 2005).

Kolinesteraz enzimleri, birçok dokuda, vücut sıvılarında ve plazmada bulunan enzimlerdir. İnhibitöre hassasiyet seviyelerine ve substrat özgüllüklerine göre AChE ve BChE diğer iki gruba ayrılırlar (Radic *et al.* 1993). AChE enzimi kas, beyin ve eritrosit zarında bulunan asıl kolinesteraz enzimidir (Grisaru *et al.* 1999). Kolinerjik sinapslardan asetilkolinin salınmasından sonra kolinesterazlar yardımıyla parçalanması sonucu sinir iletileri sonlanır (Massoulie *et al.* 1993). BChE enzimi ise kolin esterlerini ve bu bileşiklerin tiyol analoglarını, nitroasetanilidleri, ksenobiyotikleri, amitriptilin, aspirin, drofenin ve benaktizin gibi ilaçları; pestisitler, süksinildikolin, insektisitler gibi karbamat türevlerini ve birçok organofosfat yapısındaki maddeleri parçalayabilen, serumda bulunan ana detoksifiye edici enzimlerdendir (Massoulie *et al.* 1993; Masson *et al.* 2010). Birçok tür kimyasal bileşiği hidrolizleyebilmesine rağmen, BChE enziminin doğal substratı bilinmemektedir (Masson *et al.* 2010). Ancak, en uygun substratı bütirilkolindir (Augustinsson *et al.* 1971). Bütirilkolin ise sığır kornea epitelinde ve beyinde tespit edilmiştir, görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, nörotransmitter özellikte bir madde olduğu düşünülmektedir (Duysen *et al.* 2012).

Dekametonyum, edrofonyum ve propidyum BW284C51'e benzer şekilde etki gösterebilen ligandlar olarak görev yaparlar (Masson *et al.* 1994; Saxane *et al.* 1997). Dekametonyum BChE enziminin yarışmalı inhibitörü olarak davranırken, AChE enzimi için ise karışık tip inhibisyon görülmektedir (Saxane *et al.* 1997). Propidyum bileşiği AChE enziminin periferik anyonik bölgesine bağlanarak inhibisyon etkisini gösterirken AChE enziminin aktif bölgesiyle etkileşemeyen bir ligand olmakla birlikte BChE enziminin aktif bölgesi ile etkileşebilmektedir (Saxane *et al.* 1997; Bourne *et al.* 2010).

Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan takrin, serum BChE ve AChE enzimlerini çok etkili bir şekilde inhibe edebildiği için bu hastalıkta ilaç olarak kullanılmaktadır (Saxane *et al.* 1997). Takrin molekülü kolinesteraz enzimlerinin aril açıl amidaz (AAA) ve esteraz aktivitelerini etkileyerek inhibisyon etkisini göstermektedir (Rajesh *et al.* 2009a).

Kaslardaki sinir iletimini engellemek amacı ile kullanılan bir ligand olan süksinilkolin, nikotinik asetilkolin reseptörlerini yarışmalı inhibe ederek kas gevşemesini sağladığı için tıbbi müdahalelerde anestezi ilaç olarak kullanılmaktadır (Monaharan *et al.* 2007; Lockridge 1982). Süksinilkolinin inhibe edemediği atipik BChE türleri, süksinilkolin apnesi diye adlandırılan klinik durumu ortaya çıkarmaktadır (Lockridge 1982).

Terpenlerin seskuiterpen sınıfından olan huperzin A molekülü, doğal bir alkaloid türevidir ve kolinesteraz enzimlerini inhibe edebildiği için Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (Rajesh *et al.* 2009a). Kolinesterazların AAA aktivitesini inhibe edici özelliği bulunmaktadır (Rajesh *et al.* 2009a; Rajesh *et al.* 2009b).

Karaciğerde sentezlenip plazmaya aktarılan BChE enzimi insanlarda serumdaki proteinlerin yaklaşık % 0.01'ini teşkil etmektedir (Massoulie *et al.* 2008). Ayriyeten BChE enzimini bir görevi de toksik bileşiklerin AChE enzimine ulaşmadan detoksifiye edilmesinin sağlanmasıdır (Soreq and Seidman 2001; Malfitano *et al.* 2014). BChE enzimi kalp, damar, beyin, ince bağırsak, plazma, akciğer, kas, karaciğer, dalak, tükürük ve deri olmak üzere birçok dokuda bulunmaktadır (Soreq and Seidman 2001).

Gastrik ülser, gastrik koruyucu faktörler ile mukozal epiteldeki agresif fiziksel, kimyasal veya psikolojik faktörler arasındaki dengesizlik ile ilişkili, çoklu etiyolojiye sahip iyi huylu bir lezyondur (Li *et al.*, 2014). Bu agresif faktörler arasında fiziksel stres, belirgin tütün tüketimi, alkol veya kafein, bazı ilaçlar, özellikle steroidal olmayan anti-enflamatuar ilaçlar ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonu bulunmaktadır (Heibashy *et al.*, 2014). Bu faktörler arasında yüksek alkol tüketimi gastrik mukozal hasarın en büyük nedenidir (Franke *et al.*, 2005). Bu nedenle, anti-ülser bileşiklerini taramak için sıklıkla

kullanılan etanol kaynaklı mide ülseri deneysel modeli (Liu *et al.*, 2012). Gastrik ülser dahil olmak üzere insan hastalıklarının çoğunun yönetiminde sentetik ilaçların hakimiyetine rağmen, şu anda dünya çapında geniş bir oran geleneksel tıbbı yöneliktir (WHO, 2014). Bu, kısmen, önemli yan etki insidansı, ilaç etkileşimleri, mikrobiyal direnç ve kimyasal tedavi sırasında yüksek maliyet nedeniyle olabilir (Saheed *et al.*, 2015). Bu nedenle, kimyasal ilaçların yerini almak için geniş biyolojik aktiviteleri, daha iyi etkinliği ve güvenli profilleri olan doğal ürünler gereklidir (Padma 2005; Agarwal *et al.*, 2014). Sonuç olarak, alternatif biyoaktif fito bileşiklerin keşfedilmesi için farmakolojik etkileri olan bitkisel ürünlerin bilimsel analizine yönelik geniş bir ihtiyaç vardır (Bigoniya and Singh 2014).

Serbest oksijen radikalleri (SAR); hücre yapısında bulunan DNA, RNA, proteinler, lipidler ve karbonhidratlar gibi bütün hayati fonksiyonları gerçekleştiren bileşikler etkilerler. Bu etkileşimlerin sonucunda insan vücudunda geri dönüşümü olmayan hasarlar meydana gelir. Doğal antioksidan maddeler SAR'dan dolayı oluşabilecek hasarları önlemede çok önemli rol oynarlar. Hünnap bitkisinin antioksidan potansiyelinin, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit ve protoksekuik asit başta olmak üzere, içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin çok yüksek seviyede olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Zhang *et al.*, 2010). Yapılan başka literatür çalışmalarında ise hünnapın bazı genotiplerinin sağlığa yararlı bileşenler içerdiği ve bol fenolik içeriğinin olduğu bildirilmiştir (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Akbolat *et al.*, 2008; San and Yıldırım 2010). Hünnapın meyve ve meyvesinden elde edilen ürünlerin inme, kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi bazı hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğunu bazı çalışmalarda belirlenmiştir (Kalt *et al.*, 1999). Ayrıca, hünnap meyvesinin genotiplerinin sağlığa faydalı bileşenleri için daha çok bilgi verilmesi, hünnapın nutrasötik, farmasötik ve tıbbi değerinin çok daha iyi anlaşılmasını ve bu meyvenin daha fazla tüketilmesini sağlayacaktır (Yaşa 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan NADPH, NaCl, GSH, NaH_2PO_4 , GSSG Sigma-Aldrich'ten. Diğer gerekli kimyasalları Merck AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Ultra santrifüj	: Beckman Coulter
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Shimatzu (UV-1800)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Buzdolapları	: Arçelik
Peristaltik pompa	: Ismatec
Derin dondurucu	: Beko (-20°C'ye kadar)
Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-85°C'ye kadar)

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltilerin hazırlanmaları

1. 50 mM Tris-HCl (1 mM EDTA içeren) (pH= 8.0): 0,303 g (5mmol) Tris ve 0,0146 g (0,1 mmol) EDTA alınarak 45 ml destile suda çözüldü. 1 M'lık HCl çözeltisi kullanılarak pH'sı 8,0'e ayarlandı. Sonrasında toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı (GR enzimi aktivite ölçüm tamponu).

2. 1 M KH_2PO_4 (pH=7,3): 3,4 g KH_2PO_4 (0,05 mol) tartılarak 40 ml suda çözüldü, pH=7,3'e ayarlandı ve toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

3. 20 mM GSSG çözeltisi: 123,76 mg okside glutatyon (GSSG) (0,1 mmol) alındı 10 mL su içerisinde çözülerek hazırlandı.
4. 2 mM NADPH çözeltisi: 3,32 mg NADPH ($9,9 \times 10^{-3}$ mmol) alındı 2 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.
5. 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,0 (AChE enzimi aktivite ölçümü için): 12,11 g Tris 950 ml distile suda çözülerek, 1 N'lik HCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlandı.
6. 0,1 M KH_2PO_4 (pH=7,8) (BChE enzimi aktivite ölçümü için): 0,68 g KH_2PO_4 tartılarak 85 ml distile suda çözüldü, 1 N'lik HCl ile pH=7,8'e ayarlandı ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.
7. 2 mM asetiltiyokolin iyodat çözeltisi: 5,96 mg asetiltiyokolin iyodat alınarak 10 ml saf suda çözülerek hazırlanır.
8. 2 mM S-butiriltiyokolin iyodat çözeltisi: 6,34 mg S-butiriltiyokolin iyodat alınarak 10 ml saf suda çözülerek hazırlanır.
9. 2 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi: 7,73 mg DTNB alınarak 10 ml 0,1 M KH_2PO_4 (pH=7,8) tamponunda çözülerek hazırlanır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Protein Tayini

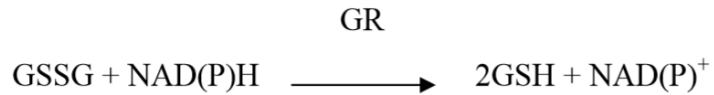
3.2.1.a. Kalitatif Olarak Protein Tayini

Proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metodla hemolizat ve serum numunelerindeki kalitatif olarak protein tayinleri yapıldı.

3.2.1.b. Bradford Yöntemine Göre Protein Tayini

Numunelerdeki protein miktarları bu yöntem kullanılarak tespit edildi. Bu metodun temel prensibi, protein ile coomassie brillant blue G-250 boyasının kompleks oluşturmasıdır. Oluşan protein-boya kompleksinin maksimum absorbandsı 595 nm’de görülür. 15 dakika içerisinde protein-boya kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks çözeltilerde uzun süre kararlı şekilde kalır. Bradford yöntemi olarak bilinen bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

3.2.2. İnsan Eritrosit GR Enziminin Aktivitesinin Ölçümü



GR aktivitesinin belirlenmesi için yukarıdaki reaksiyona giren NAD(P)H 340 nm’de maksimum absorbands vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan GR enzimi NAD(P)H’ın azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm’de takip edilmektedir (Carlberg and Mannervik 1985).

GR enzimi için enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı; EÜ/ml: 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi 6,22: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

VT: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

VE: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.3. Ellman yöntemine göre AChE / BChE inhibitör etkisi ölçülmesi

AChE ve BChE enzimleri spektrofotometrik olarak Ellman yöntemine göre tayin edilmiştir. Ellman yönteminde, substrat olarak oksii ester olan asetilkolin yerine tiyol ester olan asetiltiyokolin kullanılır. Ellman metodunun prensibine göre asetiltiyokolin, asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilir ve hidroliz sonucu açığa çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olan DTNB [5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)] ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucunda sarı renkli kromofor TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) oluşur. Reaksiyon sonunda oluşan bu sarı renkli bileşiğin oluşum hızı (rengin şiddeti), 412 nm de absorbans ölçümü yapılarak belirlenir (Ellman *et al.* 1961). Bu sarı rengin şiddeti, AChE/BChE enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

AChE / BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

$$EU / ml = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_T}{V_E} \times \frac{1}{13,6}$$

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki simgeler aşağıdaki gibidir;

EU / ml	: 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri
ΔOD	: Zamana göre absorbans farkı değişimi
T	: Zaman (Dk)
13,6	: DTNB için ekstinksiyon katsayısı
V_T	: Toplam hacim (ml)
V_E	: Küvete katılan enzim miktarı (ml)

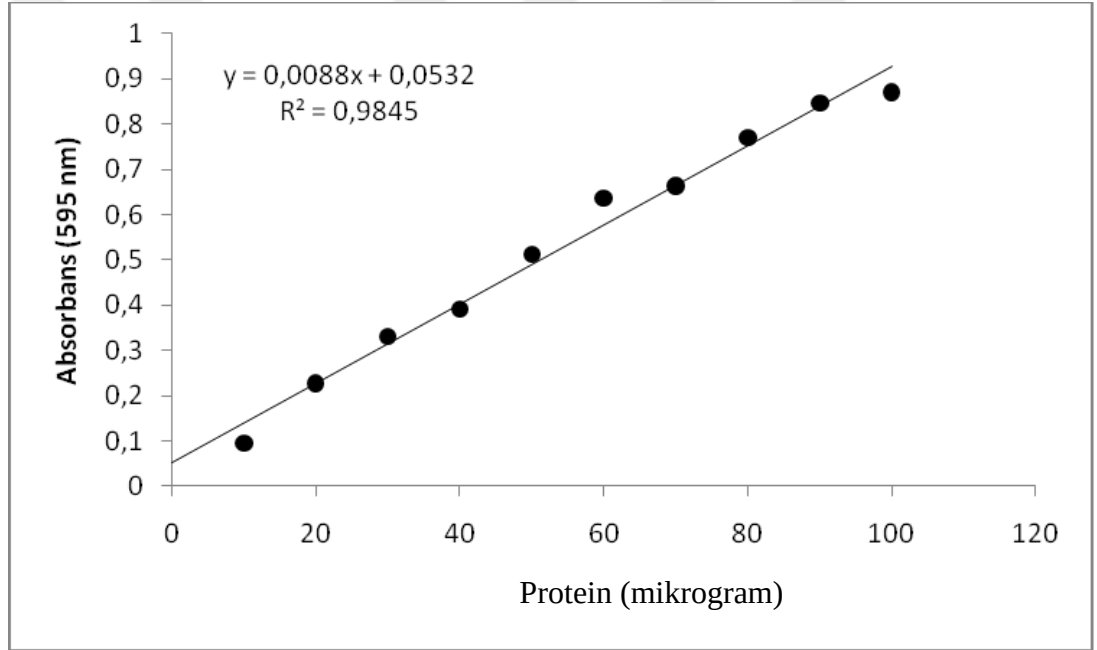
3.2.4. Meyve Örneklerinin hazırlanması

Hünnap (Zizyphus Jujuba) meyveleri 2012 yılında aktardan temin edildi. Şekillerine göre tek tip olarak seçildi önce çeşme suyu daha sonra saf su ile yıkandı. 1 kilogram meyve, bir hafta gölgede oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu ve öğütüldü. Ekstreği hazırlamak için, 50 gram öğütülmüş meyveden alınarak 30 dakika yarım litre destile su ile karıştırılarak hazırlandı. Ekstre süzildükten sonra çalışmada kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini

Çalışmada kullanılan ve işlemlerdeki protein çözeltileri Bradford yöntemi kullanılarak kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten (Şekil 4.1) faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla kantitatif tayin için kullanılan standart protein grafiği.

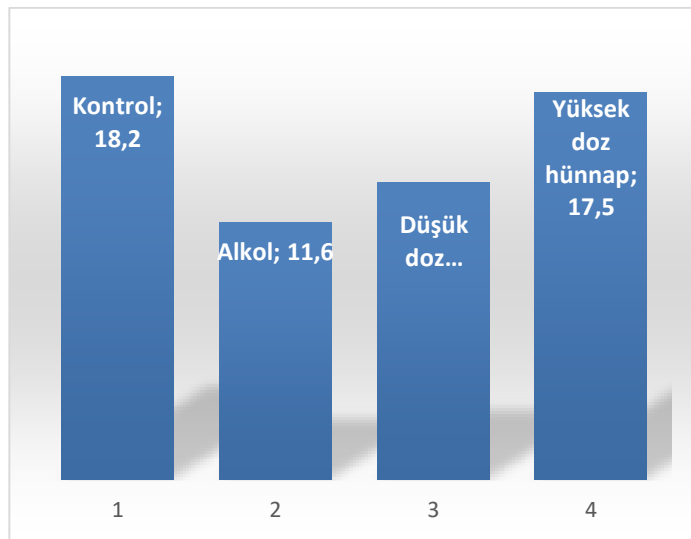
4.2. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnap ekstresinin *in vivo* etkisinin incelenmesi

Bu çalışma için 250-300 gram ağırlığında sağlıklı 32 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu: Kontrol (n=8), alkol (n=8), 4 ml/kg *Ziziphus Jujuba* düşük doz (DD, n=8) ve 8 ml/kg *Ziziphus Jujuba* yüksek doz (YD, n=8) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. *Ziziphus Jujuba* ekstraktı 10 gün boyunca oral gavaj ile

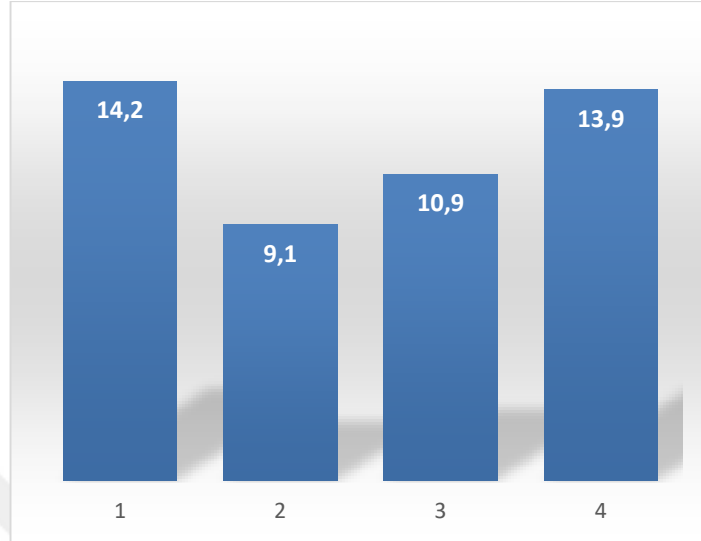
sıçanlara uygulandı. 11. günde, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te gastrik ülser oluşturmak için etanol, oral gavaj ile uygulandı. Alkol uygulandıktan 90 dakika sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Deneyler sonunda alınan kan numuneleri santrifüj edilerek serum ve süpernatant kısmı ayrıldı. Daha sonraki çalışmalarda BChE aktivitesi için serum, AChE ve GR aktivitesi için ise eritrositlerden elde edilen hemolizat kullanıldı.

Çizelge 4.1. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimlerinin hünnap ekstresi ile *in vivo* inhibisyon sonuçları.

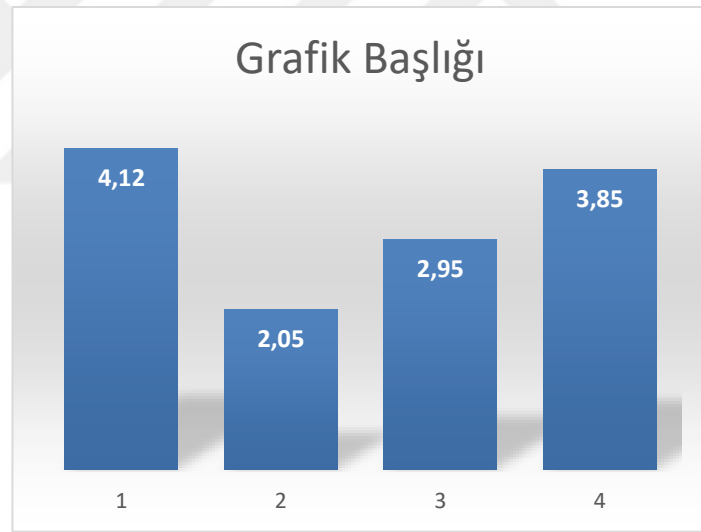
Numune	AChE (EÜ/mg prt)	BChE (EÜ/mg prt)	GR (EÜ/mg prt)
Kontrol	18,2 ± 0,5	14,2 ± 0,4	4,12 ± 0,4
Alkol	11,6 ± 0,4	9,1 ± 0,3	2,05 ± 0,4
Düşük doz hünnap	13,4 ± 0,4	10,9 ± 0,3	2,95 ± 0,3
Yüksek doz hünnap	17,5 ± 0,6	13,9 ± 0,5	3,85 ± 0,4



Şekil 4.2. Hünnap ekstresinin sıçan kan AChE enzimi aktivitesi üzerine *in vivo* etkisi.



Şekil 4.3. Hünnap ekstresinin sıçan kan BChE enzimi aktivitesi üzerine *in vivo* etkisi.



Şekil 4.4. Hünnap ekstresinin sıçan kan GR enzimi aktivitesi üzerine *in vivo* etkisi.

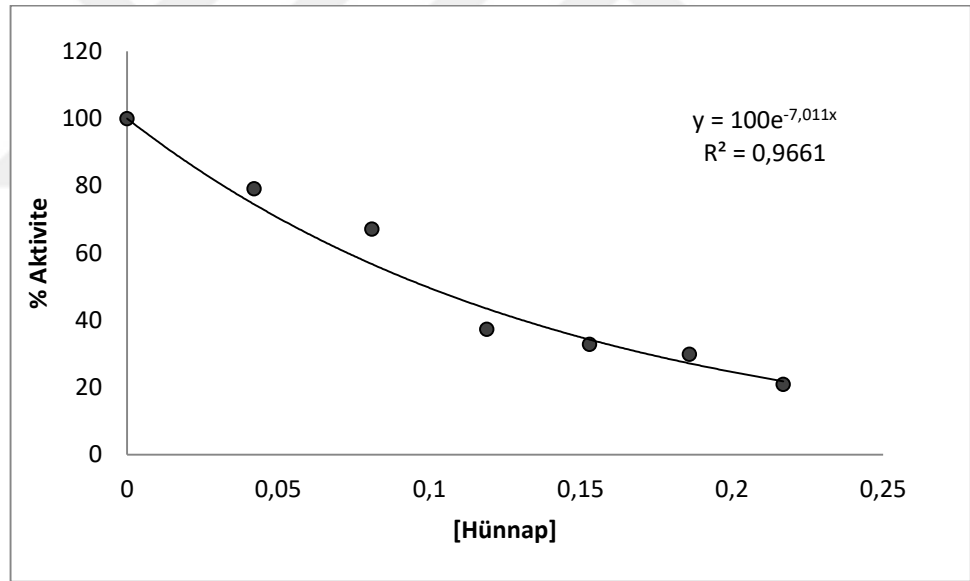
4.2.4. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnap ekstresinin *in vitro* etkisinin incelenmesi

Çalışmamızda kullanılan hünnap 4ml/10 ml stok çözeltileri hazırlandı. Sıçan kan dokusundan glutatyon redüktaz, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri için aktivite değerleri incelendi. İnhibisyon etkisi gösteren ekstrakt için % Aktivite-[I] grafiği

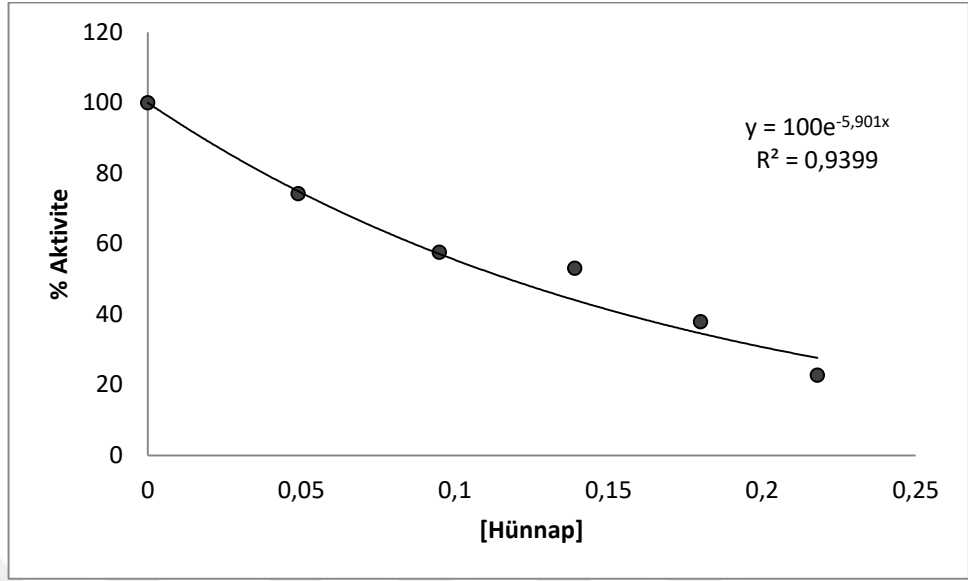
izildi (ekil 4.2-4.4). Daha sonra bu grafiklerden % 50 inhibisyona sebep olan madde miktarı (IC₅₀ değerleri) hesaplandı (izelge 4.2).

Çizelge 4.2. Sıçan kan GR, AChE ve BChE enzimleri üzerine hünnapın *in vitro* inhibisyon etkileri.

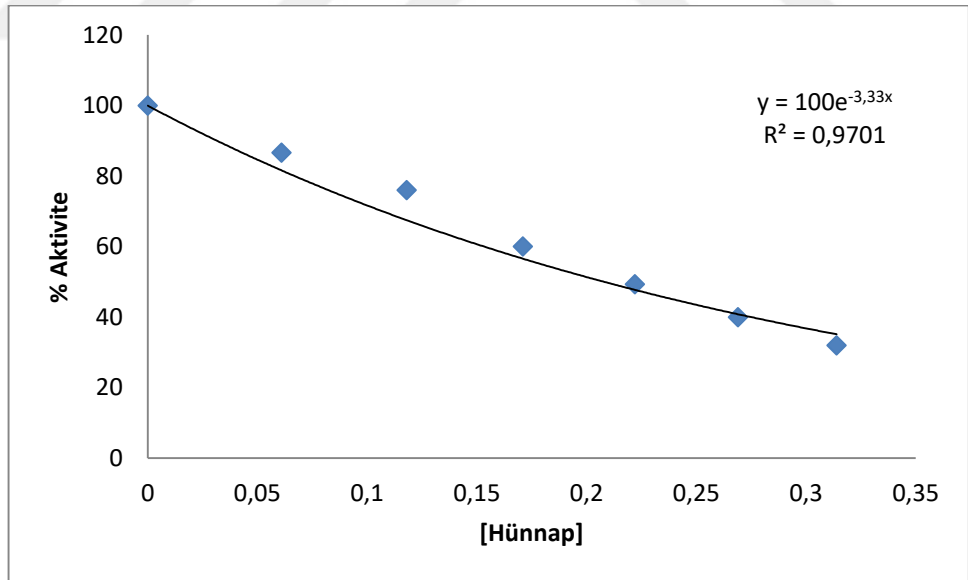
İnhibitör Cinsi	Enzim Aktiviteleri zerine Etkileri	IC ₅₀ (mM)
GR	İnhibe etti	0,098
AChE	İnhibe etti	0,117
BChE	İnhibe etti	0,208



Şekil 4.5. Hünnap ekstresinin sıçan GR enzimi aktivitesi üzerine etkisinin % Aktivite-[Hünnap] grafiği.



Şekil 4.6. Hünnap ekstresinin sıçan AChE enzimi aktivitesi üzerine etkisinin % Aktivite-[Hünnap] grafiği.



Şekil 4.7. Hünnap ekstresinin sıçan BChE enzimi aktivitesi üzerine etkisinin % Aktivite-[Hünnap] grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Antioksidant enzim glutatyon redüktaz, çoğu organizmanın hücrel redoks metabolizmasında GSH indirgenmesinin düzenlenmesini katalizleyerek hayati bir rol oynar. GSH redoks homeostasisinde, deoksiribonükleotidlerin şekillendirilmesinde ayrıca peroksitlerin, 2-oksoaldehitlerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Oksidatif strese karşı dayanıksız hücreler ve ek olarak hızlı poliferasyon hücrelerinin canlılığı nisbeten GSH'ın rejenerasyonuna bağlıdır. Bu sebepten, potansiyel GR inhibitörleri antitümör ve antiparaziter ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynar (Karplus *et al.* 1988; Irmiler *et al.* 2002; Savvides *et al.* 2002; Becker *et al.* 2003).

Bu öneminden dolayı glutatyon redüktaz enzimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmış, bir çok kaynaktan saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bazı kaynaklardan elde edilen enzimin amino asit dizilimi ve aktif bölgeleri belirlenmiştir (Krauth-Siegel *et al.* 1998; Becker *et al.* 2001). İnsan eritrositi, fare karaciğeri, bazı bitki ve bakteri hücrelerinden GR cDNA'ları elde edilmiş ve bazı biyokimyasal çalışmalar yapılmıştır (Tamura *et al.* 1997; Kelner and Montoya 2000).

İnsan eritrosit GR enziminin amino asit analizi ve x-ray kristalografisi çalışmaları yapılarak enzimin yapısı belirlenmiştir. Her alt biriminin 478 amino asitten oluştuğu ve Cys-90 amino asitinin oluşturduğu disülfid bağıyla birleştiği belirlenmiştir. Enzimin aktif bölgesini arginin, tirozin ve histidin amino asitlerinin oluşturduğu belirlenmiştir (Douglas 1987).

Farklı kaynaklardan elde edilen GR enzimini 2-(5'-nitrofurilvinil)-quinolin bileşiği türevlerinin, arilzoalloksazin bileşiklerinin, arsenik grubu ve nitro grubu ihtiva eden bileşiklerin de inhibe ettiği belirlenmiştir (McCallum and Barrett 1995; Janes and Schulz 1990; Grellier *et al.* 2001).

İnsan eritrosit GR enzimi üzerine yapılan ilaç çalışmaların da antikanserojen ve antistoma ilacı olarak kullanılan quinolan halkası içeren nitro aromatik bileşiklerin az veya çok enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Grallier et al. 2001).

İnsan eritrosit GR enzimi üzerine bazı antibiyotik ilaçlarla yapılan çalışmalarda sefotaksim,sefodizim ve metronidazol ilaçlarının inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemiştir. Netromisin, gentamisin, streptomisin, dobutamin,teikoplanin, sefoperazon, penisilin G ve ampisilin ilaçlarının az veya çok aktive ettiğini belirlemiştir (Erat 2002).

Enzimler, metabolizmadaki biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve yüzde yüzlük bir ürün oluşumunu sağlayan, hiç bir yan ürün oluşumuna meydan vermeyen biyokatalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2008). Enzimatik reaksiyonlarda substratlar farklı moleküllere yani ürünlere dönüşürler. Canlı metabolizmadaki tepkimelerin neredeyse tamamının gerçekleşmesi için enzimlere ihtiyaç duyulur. Enzimler kendi substratlarına karşı son derece seçici olan biyolojik katalizörlerdi. Birçok muhtemel tepkimeden yalnızca birkaçını hızlandırdıkları için, bir hücrede bulunan enzimlerin kümesi o hücrede bulunan metabolik yolların belirlenmesini sağlar. Enzimler genellikle ileri ve geri tepkimelerin eşit oranda katalizlenmelerini sağlar. Bir tepkimede dengeyi değil, ona ulaşma hızını etkilerler. Örneğin, karbonik anhidraz (CA), substratların ortam konsantrasyonlarına göre tepkimesini her iki yönde de katalizleyebilir (Senturk 2017).

Bunun yanında, genel olarak bahsedildiği gibi asetilkolin gibi nörotransmitter madde miktarındaki azalma yada artmalar çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin asetilkolin'nin çok fazla hidrolizlenmesiyle Alzheimer hastalığı meydana gelmekte ve bu hastalığın tedavisi için AChE'nin inhibisyonuna sebep olan ilaçlar aranmakta ve çalışılmaktadır. AChE inhibitörleri olarak kumarin türevleri üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalarda AChE inhibisyonu, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinin normal nörotransmisyonu ile etki edebilen kimyasalların nörotoksik etkilerini belirlemede kullanılır. Organofosfatların, karbamat pestisitlerin (Duysen *et al.* 2012), enantiyomerik inhibitörlerin (Lin *et al.* 1998), metallerin ve çeşitli kimyasalların AChE aktivitesini inhibe ettikleri bildirilmiştir (Bocquene *et al.* 1995; Zilbeyaz *et al.* 2018;

Cavdar *et al.* 2019). Ayrıca AChE'nin alifatik bileşikler ile özellikle de aromatik bileşikler tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Lin *et al.* 1998).

AChE enziminde esterik ve anyonik olmak üzere iki etkin kısım bulunur. Negatif yüklü anyonik kısım, iki tane karboksil grubu içeren bir aminoasitin iyonize olmuş karboksil grubundan oluşur. Asetilkolin molekülünün katyonik grubunda bulunan azot buraya elektrostatik olarak bağlıdır. Esterik bölge ise pozitif yüklü olup, serinin hidroksil grubu ile histidin bazik imidazol halkasından oluşur. Bazik imidazol halkası, serinin amino asitinin hidroksil grubuna hidrojen bağları oluşturarak onun etkinliğini artırır (Vale 1998).

- a. Öncelikle bir oksianyon bölgesi tetrahedral ara ürünü stabilize eder.
- b. Daha sonra aktif bölgeyi oluşturan bir esteraktik site esteraktik karbonil grubuna (C-O) saldırır.
- c. Az sayıda negatif yük ve çok sayıda aromatik rezidü içeren bir anyonik substrat bağlama bölgesinde ACh'nin kuarterner amonyum kutbunu içermektedir. Bu grup aromatik grupların elektronları tarafından farklı aktif bölge ligantları ile tercihi etkileşim içerisinde olur.
- d. Esteraktik ve anyonik bir bölgeye bitişik olan ve aynı zamanda aktif bölge-selektif aromatik bağlanma bölgesi olan bu kısım aril substratları ve aktif bölge ligantlarını bağlamada oldukça önemlidir.
- e. Son olarak periferik bir anyonik bağlama bölgesi hidrofobik bölgeye bağlanır ve aktif bölgeden grupların ayrılmasını sağlar.

Bütün yapılan bu çalışmalar açık bir şekilde mekanizma temelli inhibitörlerin dizayn ve araştırılmasına ve ayrıca AChE enziminin de etki mekanizmaları ile ilgili araştırmaları göstermektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için farklı yapılara sahip AChE inhibitörleri üzerinde çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bu inhibitörler de metabolizmaya, etki mekanizmasına ve beyin selektivitesine göre değişmektedir.

Mide ülserleri, en sık görülen gastrointestinal bozukluklardan biridir, dünyadaki her yaştan insanı etkiler. Normal şartlar altında, mide mukozal bariyerinin bütünlüğü, tahriş ve savunma faktörleri arasındaki bir denge ile korunur (Dimoline and Varro 2007).

Mide mukozası sürekli steroid olmayan anti-inamatuar ilaçlar (NSAID'ler), beslenme bozuklukları, sigara içme, stres ve aşırı etanol alımı gibi aşırı agresif ajanlara maruz kaldığında, bu denge tehlikeye girebilir ve bir midede ülser geliştirme riski artar (Guslandi 1987; Maity *et al.*, 2003). Gastrointestinal sistemde alkole maruz kalmak yemek borusu, mide ve bağırsak hareketliliğinin yanı sıra bağırsak emilim kapasitesine zarar verebilir. Mukozal hasar ve hatta karsinogenez oluşturabilmektedir (Bujanda 2000). Etanol, çoklu patolojilerle ilişkili zararlı bir ajandır ve deneysel hayvanlarda akut gastrik lezyonlara ve ülserlere neden olmak için oral olarak uygulanır (Cadirci *et al.*, 2007). Etanol kaynaklı hasar mekanizması karmaşıktır ve tam olarak anlaşılamamıştır. Etanol, hücrelerin pul pul dökülmesi yoluyla gastrik mukozal bariyerin bütünlüğünde bir bozulmaya yol açar, böylece mukozal geçirgenliği artırır ve bazı durumlarda kanamaya neden olur (Guslandi 1987; Melchiorri *et al.*, 1997). Nötrofillerin yaralanma bölgesine ekstrasvazasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve diğer inamasyonun daha yüksek konsantrasyonlarını tetikleyerek, hücreler üzerinde zararlı etkileri olan oksidatif hasara neden olur. Oksidatif stresin alkole bağlı gastrik mukozal hasarda rol oynadığı gösterilmiştir (Melchiorri *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 2008).

Bu çalışmamızda etanol gavajı uygulaması yapılmış sıçanlarda hünnap ekstresinin iki farklı dozu denenerek *in vivo* olarak GR, AChE ve BChE enzimlerinin nasıl etkilendikleri değerlendirildi. Beutler metoduna göre GR enzimi incelendi. Ellman metoduna göre ise inhibisyon türü, IC₅₀ değerleri belirlendi (Ellman 1961). Ayrıca *in vitro* çalışmada kullanılan hünnap ekstresinin üç enzimi birden inhibe ettiği gözlemlendi. Bu metotta AChE enzimi öncelikle tiyokolin ve asetata parçalamaktadır. Açığa çıkan tiyokolin reaksiyonun ikinci basamağında ilave edilen DTNB ile hidrolisi sonucu 2-Nitro-5((2-trimetilamino)etil)disülfanilbenzoata ve 5-Tiyo-2-nitro-benzoik aside dönüşmektedir. 5-Tiyo-2-nitro-benzoik asit sarı renkli ve 412 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir (Ellman *et al.* 1961).

AChE inhibitörleri geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir (Colovic *et al.* 2013). Zehirler doğal olarak oluşur ve AChE'ı kuvvetli şekilde inhibe ederler. AChE inhibitörleri sinir gazları şeklinde silah olarak kullanılabilirler, insektisit olarak, ilaç olarak ağır kas zaafı anlamına gelen, çabuk yorulma şeklinde ortaya çıkan ve

nöromusküler bir hastalık olan Myastenia gravis tedavisinde, glukoma tedavisinde, postural taşikardi sendromu tedavisinde, antikolinerjik zehirlenmelere karşı panzehir olarak, non-depolarizan kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmede, apati gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarını tedavisinde kullanılırlar. Ayrıca Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde, dementiada (bunamada), hafıza ve öğrenme defektleri gibi nörodejeneratif bozuklukların simptomal tedavilerinde, görsel halusinasyon gibi psikotik belirtilerde (Singh *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2012), şizofreni hastalarında bilişsel bozuklukların tedavisinde (Ribeiz *et al.* 2010; Choi *et al.* 2013), otizm tedavisinde (Buckley *et al.* 2011), uykuyu hızlı bir şekilde teşvik eder ve uyuma yüzdesini arttırmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Handen *et al.* 2011).

Mousa ve arkadaşlarının (2019) *Cuphea ignea* bitki ekstresinin etanol ile sıçanlarda oluşturulan gastik ülser modelini 30 mg/kg dozda iyileştirdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada ülser oluşumunu ve ekstre nin olumlu etkisinin olup olmadığı serum TNF-alfa, katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ve glutatyon (GSH) seviyelerindeki değişim incelenmiştir (Mousa *et al.*, 2019).

- Çeşitli bitki ekstrelerinin son yıllarda farmakolojik kullanımının artmasının ana nedeni sitotoksisite değerlerinin düşük çıkması, doğal ve ekonomik olmasıdır.
- Bu çalışmamızda sıçanlarda etanol gavajı uygulamasının sonucu elde edilen kan örneklerinde GR, AChE ve BChE enzimleri üzerindeki hem etanol hemde düşük ve yüksek doz hünnap ekstresinin etkileri incelenmiştir.
- Yaptığımız çalışma sonunda GR, AChE ve BChE enzimleri üzerinde *in vitro* olarak denenen bu ekstre için IC₅₀ değerleri sırası ile 0,098, 0,117 ve 0,208 mM olarak belirlendi.
- Ayrıca *in vivo* çalışmalar sonucu elde edilen verilere göre de iki farklı dozda uygulanan (4 ml/kg ve 8 ml/kg) hünnap ekstresinin olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Açan, L., 1990. Koyun beyni glutatyon redüktazının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara.
- Agarwal, P., Alok, S., Verma, A. 2014. An update on ayurvedic herb henna (*Lawsonia inermis* L.): A review. *Int J Pharm Sci Res.* 5(2), 330-339.
- Akbolat D, Ertekin C, Menges HO, Ekin K, Erdal I, 2008. Physical and nutritional properties of jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) growing in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 20: 757-766.
- Ariel, N., Ordentlich A., Barak D., Bino T., Velan B., Shafferman A. (1995). The Aromatic Patch of Three Proximal Residues in the Human Acetylcholinesterase Active Centre Allows for Versatile Interaction Modes with Inhibitors. *Biochemical Journal*, 335(7), 95-102.
- Arrick, B.A. and Nathan, C.F., 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficiency. A review, *Cancer Research*, vol.44, 4224-4232.
- Augustinsson, K.B. (1971) Comparative aspects of the purification and properties of cholinesterases. *Bull World Health Organ*, 44 (1-3), 81-89.
- Becker, K., Herold-Mende, C., Park, J. J., Lowe, G. and Schirmer, R. H., 2001. Human Thioredoxin Reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2''Terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy *J. Med. Chem.* 44, 2784-2792.
- Becker K., Rahlfs S., Nickel C. and Schirmer R. H., 2003. Glutathione-function and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol. Chem.* 384, 551-566.
- Beutler E., 1969. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity; *In vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Invest.* 48(10): 1957-1966.
- Beydemir Ş., Çiftçi M., Özmen İ., Büyükkuroğlu M.E., Özdemir H., Küfrevioğlu Ö.İ., 2000 "Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*". *Pharmacol. Res.* 42, 187-191.

- Bigoniya, P., Singh, K. 2014. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from *Citrus sinensis*. *Rev Bras.* 24(3), 330-340.
- Blong, R., Bedows, E., Lockridge, O. (1997) Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem. J.* 327, 747-757.
- Bocquene G., Bellanger C., Cadiou Y., Galgani F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology*, 4, 266-279.
- 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.
- Bujanda, L. 2000. The Effects of Alcohol Consumption upon the Gastrointestinal Tract. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3374-3382.
- Bourne, Y., Radic, Z., Taylor, P., Marchot, P. (2010) Conformational remodeling of femtomolar inhibitor-acetylcholinesterase complexes in the crystalline state. *J Am Chem Soc*, 132 (51), 18292-18300.
- Buckley, A.W., Sassower, K., Rodriguez, A.J., Jennison, K., Wingert, K., Buckley, J., Thurm, A., Sato, S., Swedo, S. (2011). An open label trial of Donepezil for enhancement of rapid eye movement sleep in young children with Autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 21, 353-357.
- Cadirci, E., Suleyman, H., Aksoy, H., Halici, Z., Ozgen, U., Koc, A., Ozturk, N. 2007. Effects of *Onosma Armeniacum* Root Extract on Ethanol-Induced Oxidative Stress in Stomach Tissue of Rats. *Chem. Biol. Interact.* 170, 40-48.
- Carlberg, C. And Mannervik B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Pres, Orlando, FL.
- Cavdar, H., Senturk, M., Guney, M., Durdagi, S., Kayik, G., Supuran, C.T., Ekinci, D. 2019. Kinetic and In Silico Studies of Some Uracil Derivatives on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Enzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 34 (1) 429-437.
- Chatonnet, A., Lockridge, O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*, 260 (3), 625-634.

- Chang, M.S., Strichartz, G.R., 2005. Cholinergic pharmacology (Golan, D.E and Tashjian, A.H. editörler). Principles of Pharmacology, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93.
- Choi, KH; Wykes, T; Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. The British Journal of Psychiatry 203,172-178.
- Chuiko, G.M., 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 233-242.
- Colovic, MB., Krstic D.Z., Lazarevic P., Tamara D., Bondzic A.M., Vasic V.M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. Current Neuropharmacology, 11 (3), 315-335.
- Cooper, A.J.L.,1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., Dimauro, S.,Barchi, R.L., Kunk, L.M. (Eds), The Molecular and Genetic Basis of NEÜrological Disease. BurtterworthHeinemann, Boston, pp.1195-1230.
- Dembélé, K., Haubruge, E., Gaspar, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (Cyprinus carpio L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 49-54.
- Demir, E., 1994. Diabetlerde eritrosit glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz aktivitelerinin glikolize hemoglobin ve lipid peroksidasyonu ile değışimlerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Erzurum.
- Dimaline, R., Varro, A. 2007. Attack and Defence in the Gastric Epithelium-A Delicate Balance. Exp. Physiol. 92, 591-601.
- Douglas, K.T.,1987. Mechanizm of glutathione-dependent enzymes., Meister, A.,(ed). Avdan. Enzymol., Johm Wiley and Sons inc., New York. 59, 103-167.
- Durmaz, L. 2015. Bazı Kumarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Duysen, E.G., Cashman, J.R., Schopfer, L.M., Nachon, F., Masson, P.,Lockridge, O. (2012) Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion,

- chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. *Chem Biol Interact*, 195 (3), 189-198.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., et al. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7,88-95.
- Erat, M., 2002. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Erzurum.
- Erat M., Sakıroğlu H., Ciftçi M. 2005. Effect of some antibiotic on glutathione reductase from bovine erythrocytes. *Vet. Med. Czech.* 48, 305-312.
- Fujiwara, Y., Kondo, T., Murakami K. and Kavakami, Y., 1989. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathion-dependent system in erythrocytes of non insulin dependent diabetes. *Clin. Wochenschr.*, 67, 336-341.
- Franke, A., Teyssen, S., Singer, M. V. 2005. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Dig Dis.* 23(3-4), 204-213.
- Geula, C., Mesulam, M.M., 1999. Cholinergic systems in Alzheimer's disease, *Alzheimer Disease*. RD Terry, R Katzman ve ark. (Ed), 2nd Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 269-292.
- Guslandi, M. 1987. Effects of Ethanol on the Gastric Mucosa. *Dig. Dis.* 5, 21-32.
- Gül M., Kutay F.Z., Temocin S. and Hanninen O., 2000. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp.Biol.* 38, 625-634.
- Grellier, P., Sarlauskas, J., Anusevicius, Z., Marozienne, A., Houee-Levin, C., Schrevel, J. and Cenas N., 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 393, 199-206.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264 (3), 672-686.
- Harel, M., Schalk I., Ehret, L., Bouet F., Goeldner M., Hirth C., Axelsen PH., Silman I. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (19), 9031-5.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J.; Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism:

- neuropsychological measures. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 21, 43-50.
- Heibashy, M. I., Mazen, G. M., Ibrahim, M. A. 2014. Efficacy and safety of some medical herbs on gastric ulcer induced by aspirin in rats. *J Pharm Biol Sci.* 9(3), 19-27.
- Irlor, A., Bechthold, E., Davioud-Charvet, E., Hofman, V., Reau, R., Gromer, S., Schirmer, R. H., and Becker, K. (2002) in *Flavins and Flavoproteins* (Chapman, S., Perham, R., and Scrutton, N., eds) pp. 803-815, Agency for Scientific Publications, Berlin.
- Janes, W. And Schulz, G.E. 1990. The binding of the retro-analogue of glutathione disulfide to glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 265, 10443-10445.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L. 1999. Antioxidant activity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47, 4638-4644.
- Karplus, P. A., Krauth-Siegel, R. L., Schirmer, R. H. and Schulz, G. E., 1988. Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2- chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea. A crystallographic analysis. *Eur. J. Biochem.* 171, 193-198.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., (2008) *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Sirkeci / İstanbul.*
- Kelner J. M. and Montoya M. A. 2000. Structural Organization of the Human Glutathione Reductase Gene: Determination of Correct cDNA Sequence and Identification of a Mitochondrial Leader Sequence *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 366–368.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S.J., Neall, P., Tylor, T., Fagg, A., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flexus*) muscle as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 780-791.
- Küçükkılınç, T., 2014. Potential use of acetylcholinesterase as a bioscavenger in organophosphate poisoning. *Turk J Biochem*, 39, 126-131.
- Knapen, M. F.C.M., Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M. and Steegers, E.A.P., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184.

- Kondo, T., Dale, O.L. and BEÜtler, E., 1980. Glutathione tranport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad.Sci. Biochemistry*, Vol. 77,11,6359-6362.
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R.and Jürgen, W., 2003. *Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper.*, Nobel.
- Krauth-Siegel, R.L., Arscott, L.D., Schönleben-Janass, A., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., 1998. Role of active site tyrosine residues by human glutathione reductase. *Biochemistry*, 37, 13968-13977.
- Lamotte, F., Vianey-Liuaud, N., Duviau, M. P. and Kobrehel, K., 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4978-4983.
- Lang, G., Kufcsak, O., Szegletes, T., Nemcsok, J., 1997. Quantitative distributions of different cholinesterases and inhibition of acetylcholinesterase by mediation and paraquat in alimentary canal of common carp. *Genetic Pharmacology*, 55-59.
- Le Trang, N., Bhargava, K. K. and Cerami, A., 1983. Purification of glutathione reductase from gerbil liver in two steps. *Analitical Biochemistry*. 133, 94-99.
- Lehninger Biyokimyanın İlkeleri David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Y. Murat Elçin) Palme yayıncılık, Ankara 2013.
- Li, J. W., Ding, S. D., Ding, X. L. 2005. Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40, 3607-3613.
- Li, J. W., Fan, L. P., Ding, S. D., Ding, S. L. 2007. Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry*, 103, 454460.
- Li, W.F., Hao, D.J., Fan, T., Huang, H.M., Yao, H., Niu, X.F. 2014. Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chem Biol Interact.* 208:18-27.
- Lin G., Tsai Y. C., Liu H. C., Liao W. C., Chang C. H. (1998). Enantiomeric inhibitors of cholesterol esterase and acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1388, 161-174.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.

- Liu, Y., Tian, X., Gou, L., Fu, X., Li, S., Lan, N., Yin, X. 2012. Protective effect of l-citrulline against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 34(2), 280-207.
- Lockridge, O. (1982) Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J Neurochem*, 39 (1), 106-110.
- Lockridge, O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9 (4), 125-128.
- Lockridge, O. (1990) Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol Ther*, 47 (1), 35-60.
- Maity, P., Biswas, K., Roy, S., Banerjee, R. K., Bandyopadhyay, U. 2003. Smoking and the Pathogenesis of Gastroduodenal Ulcer-Recent Mechanistic Update. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 329-338.
- Malfitano, A.M., Marasco, G., Proto, M.C., Laezza, C., Gazzero, P., Bifulco, M. (2014) Statins in neurological disorders: An overview and update. *Pharmacological Research*, 88 (0), 74-83.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41 (1), 31-91.
- Massoulié, J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11 (3), 130-143.
- Massoulie, J., Perrier, N., Noureddine, H., Liang, D., Bon, S. (2008) Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*, 175 (1-3), 30-44.
- Masson, P., Lockridge, O. (2010) Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys*, 494 (2), 107-120.
- Masson, P., Froment, M.T., Sorenson, R.C., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1994) Mutation His322 Asn in human acetylcholinesterase does not alter electrophoretic and catalytic properties of the erythrocyte enzyme. *Blood*, 83 (10), 3003-3005.
- Manoharan, I., Boopathy, R., Darvesh, S., Lockridge, O. (2007) A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin Chim Acta*, 378 (1-2), 128-135.

- McCallum, M. J. and Barrett, J., 1995. Purification and properties of glutathione reductase from the cestode *Moniezia expansa*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27,393-401.
- Melchiorri, D., Sewerynek, E., Reiter, R. J., Ortiz, G. G., Poeggeler, B., Nisticò, G. 1997. Suppressive Effect of Melatonin Administration on Ethanol-Induced Gastroduodenal Injury in Rats in Vivo. *Br. J. Pharmacol.* 121, 264-270.
- Misra, I. and Griffith, O.W., 1998. Expression and purification of human γ glutamylcysteine synthetase. *Prot. Expr. Purific.* 13, 268-276.
- Montgomery Rex, Conway Tomas W., Spector Arthur A.,Chappell David., 1996. *Biochemistry A Case-oriented Approach*, Sixth edition. Mosby-Year Book, Inc.
- Mousa, A. M., El-Sammad, N. M., Hassan, S. K., Madboli, A. El-N. A., Hashim, A. N., Moustafa, E. S., Bakry, S. M., Elsayed, E. A. 2019. Antiulcerogenic effect of *Cuphea ignea* extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 19, 345-358.
- Müller F. *Chemistry & Biochemistry of Flavoenzymes*; Williams C.H., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 1992; 121-211.
- Nath, B.S., Kumar, P.S., 1999. Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157-162.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Ordentlich, A., Barak D., Kronman C., Flashner Y., Leitner M., Segall Y., Ariel N., Cohen S., Velan B., Shafferman A. (1993). Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *The Journal of Biological.*
- Ozil, M., Balaydin, H.T., Senturk, M. 2019. Synthesis of 5-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry.* 86, 705-713.
- Özer, A., 1985. *Pratik hematoloji: Klinik, laboratuvar ve tedavi.*, Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir.

- Padma, T. V. 2005. Ayurveda. *Nature*. 436(7050), 486-486.
- Pan, J.-S., He, S.-Z., Xu, H.-Z., Zhan, X.-J., Yang, X.-N., Xiao, H.-M., Shi, H.-X., Ren, J.-L. 2008. Oxidative Stress Disturbs Energy Metabolism of Mitochondria in Ethanol-Induced Gastric Mucosa Injury. *World J. Gastroenterol.* 14, 5857-5867.
- Patel, M. P., Marcinkeviciene, J. and Blanchard, J. S., 1998. Enterococcus faecalis glutathione reductase: Purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 155-163.
- Perry, E.K., Perry, R.H., Blessed, G. et al. 1978. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 273-277.
- Pohanka (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers Olomouc*, 155 (3), 219-229.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.
- Rajesh, R.V., Chitra, L., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009a) The aryl acylamidase activity is much more sensitive to Alzheimer drugs than the esterase activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic brain. *Biochimie*, 91 (9), 1087-1094.
- Rajesh, R.V., Layer, P.G., Boopathy, R. (2009b) High aryl acylamidase activity associated with cobra venom acetylcholinesterase: biological significance. *Biochimie*, 91 (11-12), 1450-1456.
- Rendon, J. L., Calcagno, M., Mendoza-Hernandez, G. and Ondarza, R. N., 1986. Purification, properties and oligomeric structure of glutathione reductase from the cyanobacterium *spirulina maxima*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 248(1), 215-223.
- Ribeiz, S.R., Bassitt, D.P., Arrais, J.A., Avila, R., Steffens, D.C., Bottino, C.M. (2010). Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.
- Richman, P.G. and Meister, A., 1975. Regulation of γ - glutamylcysteine synthetase by nonallosteric feed back inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250, 14221-14226.

- Saheed, S., Olarewaju, S. A., Taofeeq, G., Olatunde, S. T., Alanamu, A. A. 2015. Combined administration of *Spondias mombin* and *Ficus exasperata* leaf extracts stall indomethacin-mediated gastric mucosal onslaught in rats. *Afr J Trad Complement Altern Med.* 12(1), 45-51.
- San, B., Yıldırım, A. N. 2010. Phenolic, aliphatic tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 706-710.
- Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B.P. (1997) Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (48), 14642-14651.
- Savvides S.N., Scheiwein M., Böhme C.C., Arteel G.E., Karplus P.A., Becker K. and Schirmer, R. H. (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 277, 2779-2784.
- Segel I.H., 1968. *Biochemical calculations*. Inc., New York, 403.
- Senturk, M., *Enzyme Inhibitors and Activators*, 2017. Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1.
- Shohet, S.B. and Beutler, E., 1986. Glutathione metabolism of the erythrocyte. *Williams Hematology. The Erythrocyte, Part Four*.
- Siegel, R.L.K., Arscott, L.D., Janas, A.S., Schirmer, R.H. and Williams, C.H., 1998. Role of active site tyrosine residues in catalysis by human glutathione reductase. *Biochemistry*. 37, 13968-13977.
- 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.
- Soreq, H., Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (4), 294-302.
- Sussman, J.L., Harel M., Frolova F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I. (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo Californica*: A Prototypic Asetylcholine-Binding Protein. *Science*, 253(5022), 872-879.

- Tamura T., McMicken H.W. Smith C.V. and Hansen T.N. 1997. Gene structure for mouse glutathione reductase, including a functional mitochondrial targeting signal. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 237, 419-422.
- Taylor, D., Paton C., Shitij K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*, 11. Bs., Wiley-Blackwell, West Sussex.
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*. 684, 77-97.
- Tougu, V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents*, 1 (2), 155–170.
- Tripathi. A. (2008). Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neuroscience* 15 (4).
- Vale, J. A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 649-652.
- Whittaker, V.(1990).The Contribution of Drugsand Toxins to Understanding of Cholinergic Function. *Trends in Physiological Sciences*, 11 (1), 8-13.
- World Health Organization. Traditional medicine strategy. 2014. http://www.searo.who.int/entity/health_situation_trends/who_trm_strategy_2014-2023.pdf?ua=1.
- Yaşa, H. 2019. Türkiye Çanakkale’den Hünnap Meyvesinin (*Zizyphus Jujuba*.) Sulu Ekstresinin Toplam Fenolik Miktarı ve Antioksidan Aktivitesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(1): 158-168.
- Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y., Ren, F. 2010. Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) from China. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1461-1465.

Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A., Senturk, M. 2018. Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. J. Biochem. Mol. Toxicol. 32:e22210.

Zubay, G., 1988. Biochemistry, Second Edition, Macmillan Publishing Company.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	
Doğum Yeri ve Tarihi	
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	
Yüksek Lisans Öğrenimi	
Bildiği Yabancı Diller	
Bilimsel Faaliyetler	
İş Deneyimi	
Stajlar	
Projeler	
Çalıştığı Kurumlar	
İletişim	
E-posta Adresi	
Mezuniyet Tarihi	