

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

PUERARİN BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* ŞARTLARDA
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN VE BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS

Aslı İNAN ERGÜN

HAZİRAN-2022
GÜMÜŞHANE



**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**PUERARİN BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* ŞARTLARDA
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN VE BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY VE ACTIVITY ON SOME
METABOLIC ENZYMES OF PUERARIN COMPOUND *IN VITRO*
CONDITIONS**

YÜKSEK LİSANS

Aslı İNAN ERGÜN

**HAZİRAN-2022
GÜMÜŞHANE**



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

PUERARİN BİLEŞİĞİNİN *İN VİTRO* ŞARTLARDA
ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN VE BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNE AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY VE ACTIVITY ON SOME
METABOLIC ENZYMES OF PUERARIN COMPOUND *IN VITRO*
CONDITIONS

YÜKSEK LİSANS

Aslı İNAN ERGÜN

Danışman: Doç. Dr. Meryem TOPAL

HAZİRAN-2022
GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans olarak hazırlamış olduğum “**Puerarin Bileşiminin *In Vitro* Şartlarda Antioksidan Kapasitesinin ve Bazı Metabolik Enzimler Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesi**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğum intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

16/06/2022

.....

Aslı İNAN ERGÜN

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. 21.E0116.07.01 No'lu proje kapsamında çalışmaya maddi destek sağlayan Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Gümüşhane Üniversitesi, Gümüşhane Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımda her zaman yanımda olan, deneyim ve bilgileri ile beni aydınlatan, çalışmamın deneysel kısımlarında yol gösterici olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Meryem TOPAL'a,

Gümüşhane Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Duygu ÖZDEŞ'e, deneyimleri ile yol gösterici olup her konuda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Fevzi TOPAL'a, çalışmamıza fikirleriyle katkı sunan Sayın Öğr. Gör. Özgür PALANCI'ya, değerli jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KALIN'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü fedâkarlığı gösteren ve her zaman arkamda bir dağ gibi duran canım Annem ve Babama, desteklerini hep hissettiğim değerli kardeşlerim Emrah, Emine, Ayten ve Erman'a, yüksek lisans yapmam konusunda beni cesaretlendiren, teşvik eden, maddi ve manevi hep yanımda olan değerli eşim Bayram ERGÜN'e ve canım kızlarım Zeynep ve Elif'e bana çalışabileceğim imkanı verdiklerini için çok teşekkür ediyorum.

Aslı İNAN ERGÜN
GÜMÜŞHANE-2022

ÖZET

Tez çalışmasında fenolik mokekül yapısına sahip puerarin bileşiğinin asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelendi. AChE enzimi için elde edilen IC_{50} değeri 177.73 nM iken BChE için 315.07 nM olarak hesaplandı. Standart molekül olarak takrin kullanıldı. Takrin molekülünden daha etkili inhibisyon gösterdiği belirlendi. Tezin diğer kısmında ise aynı molekül için antioksidan aktivitesini değerlendirildi. Bu amaçla, Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi tayini, Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi, Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu), 2,2- 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi, DMPD radikali giderme aktivitesi yöntemleri kullanıldı. Referans antioksidanlar olarak BHT, BHA, askorbik asit (C vitamini), troloks ve α -tokoferol (E vitamini) kullanılarak karşılaştırmaları yapıldı. ABTS radikal giderme aktivitesi için Puerarin molekülünün 20 mg/mL konsantrasyonunda % inhibisyon miktarı %99.33 olarak hesaplandı. İndirgeme kapasitelerininde standartlarla paralel olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçların kozmetik, ilaç ve biyokimyasal yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Enzim, Fenolik bileşik, Puerarin, Radikal giderme

SUMMARY

In the thesis study, the inhibition effects of puerarin compound with a phenolic molecule structure on acetylcholinesterase (AChE) ve butyrylcholinesterase (BChE) enzymes were investigated. While the IC_{50} value obtained for AChE enzyme was 177.73 nM, it was calculated as 315.07 nM or BChE. Tacrine was used as the stveard molecule. It was determined that it showed more effective inhibition than the tacrine molecule. In the other part of the thesis, antioxidant activity was evaluated for the same molecule. For this purpose, determination of Fe^{3+} - Fe^{2+} reducing capacity, 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, Cu^{2+} - Cu^{+} reducing capacity (CUPRAC method), 1,1-Diphenyl 2-picryl hydrazil (DPPH) free radical scavenging activity and DMPD radical removal method were used. BHT, BHA, ascorbic acid (vitamin C), trolox ve α -tocopherol (vitamin E) were taken as reference antioxidants ve compared. For ABTS radical scavenging activity, the % inhibition amount of puerarin molecule at 20 mg/mL concentration was calculated as 99.33%. It was determined that the reduction capacities were in parallel with the stveards. It is thought that the results obtained will shed light on cosmetics, drugs, medical treatments ve applications, ve new biochemical studies.

Keywords: Antioxidant activity, Enzyme, Phenolic compound, Puerarin, Radical scavenging

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLOLAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Asetilkolinesteraz Enzimi	5
1.3. Butirilkolinesteraz enzimi	7
1.4. Antioksidan Kapasitesi ve Aktivitesi	8
1.5. Fenolik Bileşikler	11
1.6. Serbest Radikaller ve Etkileri.....	12
1.7. Çalışmada Kullanılan Puerarin Bileşiği	12
1.8. Çalışmanın Amacı.....	14
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar	16
2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	16
2.2.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kapasitesi Yöntemi.....	16
2.2.3. Cu^{2+} - Cu^{+} İndirgeme Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC Metodu)	16
2.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivite Yöntemi	17
2.2.5. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivite Yöntemi	17
2.2.6. DMPD Radikal Giderme Aktivite Yöntemi.....	17
2.2.7. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivite Yöntemi	18
2.2.8. Butirilkolinesteraz Enzim Aktivite Yöntemi	18
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	19
3.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kapasitesi Sonuçları	19
3.2. Cu^{2+} - Cu^{+} İndirgeme Kapasitesi Sonuçları	19
3.3. ABTS Radikal Giderme Aktivite Yöntemi	20
3.4. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivite Yöntemi	21

3.5. DMPD Radikal Giderme Aktivite Yöntemi	22
3.6. Asetilkolinesteraz Enzim Bulguları	22
3.7. Bütirikolinesteraz Enzim Bulguları	24
4. TARTIŞMA.....	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	33
KAYNAKÇA.....	35
ÖZGEÇMİŞ	44



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sentetik ve doğal antioksidanların bazı özellikleri	11
Tablo 2. DPPH [·] ve ABTS ^{·+} radikali giderme aktivitelerinin IC ₅₀ değerleri.....	22
Tablo 3. AChE Enzimi için takrin ve puerarin inhibisyon sonuçları	24
Tablo 4. BChE enzimi için takrin ve puerarin bileşiklerinin inhibisyon sonuçları.....	26
Tablo 5. İndirgeme kapasitelerinin karşılaştırılması	29
Tablo 6. Puerarin ve standartlara ait giderme aktivitelerinin % inhibisyonları	30
Tablo 7. AChE ve BChE enzimleri için puerarin ve takrinin karşılaştırılması.....	32



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Oksidoredüktaz enzim örneği	2
Şekil 2. Transferaz enzim örneği	2
Şekil 3. Hidrolaz enzim örneği.....	2
Şekil 4. Liyaz enzim örneği	3
Şekil 5. İzomeraz enzim örneği.....	3
Şekil 6. Ligaz enzim örneği	3
Şekil 7. AChE enziminin rol aldığı reaksiyon	6
Şekil 8. Takrinin yapısı	7
Şekil 9. Kudzu bitkisinden elde edilen puerarin tozu	13
Şekil 10. Puerarinin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 11. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kapasitesi	19
Şekil 12. Cu^{+2} - Cu^{+} İndirgeme Kapasitesi	20
Şekil 13. ABTS^{+} giderme aktivite grafiği	20
Şekil 14. DPPH serbest radikali giderme aktivite grafiği	21
Şekil 15. DMPD^{+} giderme aktivite grafiği.....	22
Şekil 16. AChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Puerarin] grafiği.....	23
Şekil 17. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	23
Şekil 18. AChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği.....	23
Şekil 19. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	24
Şekil 20. BChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Puerarin] grafiği.....	24
Şekil 21. BChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	25
Şekil 22. BChE enzim için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği.....	25
Şekil 23. BChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BChE	: Butirilkolinesteraz
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
ABTS	: 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonikası)
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GTP	: Guanozin trifosfat
ES	: Enzim substrat kompleksi
EÜ	: Enzim ünitesi
FAD	: Flavın adenin dinükleotit
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizma
LDL	: Lipoprotein
nCp-Cu	: Seruloplazmin
O ₂ ·	: Radikal
OH·	: Hidroksil radikali
RO	: Alkolsil
ROO	: Peroksil
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RS	: Tiyal radikaller
TBHQ	: Tert-bütil hidrokinon
TCA	: Trikloroasetik asit

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler büyük bir kısmı protein yapısında olan ve canlı metabolizmasında gerçekleşen reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin tamamı protein yapısındadır ancak bazı katalitik RNA molekülleri bunun dışında tutulur. Enzimler reaksiyonu hızlandır ve yan ürün oluşturmada da %100 verim sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimlerin sorumlu olduğu kısım spesifik katalizleme fonksiyonlarıdır. Bunu yaparken bir kısmı aktivite için bir metal iyonuna ihtiyaç duyarken, bir kısmı da katalizleme fonksiyonlarını sadece protein yapısıyla gerçekleştirirler (Sigman ve Boyer, 1990).

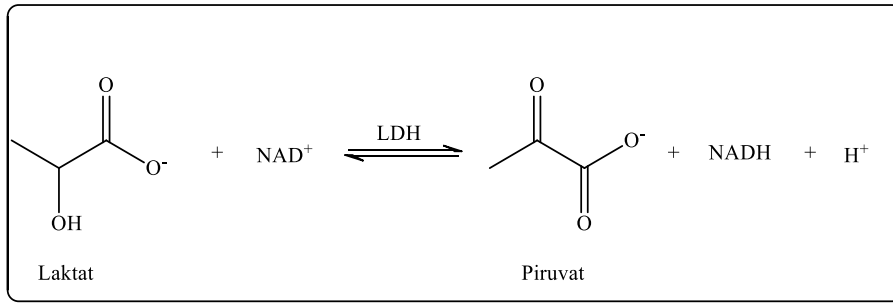
Enzimlerin yapısını proteinler oluşturmuştur ve bu yüzden sıcaklık değişiminden etkilenirler. Bir enzimin çalışabileceği en iyi sıcaklık optimum sıcaklık olarak ifade edilir. Enzimler aktivitelerini çok düşük ya da çok yüksek sıcaklıklar da kaybederler. Yapılarını ise yüksek sıcaklık tamamen bozarken, düşük sıcaklık bozamaz. Bundan sebep besin maddeleri dondurulup saklanabilir. Protein yapısında olan enzimler bu yapıyı aminoasitler sayesinde oluşturmaktadır, özetle enzimler aminoasitlerin polimeridir (Topal, 2014).

Hücrelerde enzimlerin katalitik etkisiyle mümkün olan reaksiyonlar vardır ve bu reaksiyonların başında sindirim, hücre solunumu, kas kasılması, hücre bileşenlerinin yapılması ve yıkılması gelmektedir. Polipeptit zincirleri enzimlerin katalitik etki gösteren kısımlarıdır (F.Topal, 2014).

Canlılarda aynı reaksiyonu katalizleyen fakat kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı olan enzimler izoenzim olarak tanımlanmıştır. İzoenzimler kofaktörlerine, inhibitörlerine ve substratlarına karşı farklı özelliklere sahiptirler. İzoenzimlerin özelliklerini; izoelektrik noktalarının ayrı olması, aminoasit sıra ve sayılarının farklı olması, ayrı bir gene sahip olmaları, elektroforoteik hareketliliklerinin ayrı olması olarak sıralayabiliriz. İzoenzimler hücrenin değişik sübellüler fraksiyonlarında yerleşebilirler. Ayrıca farklı dokularda da lokalize olabilirler (Göçer, 2014).

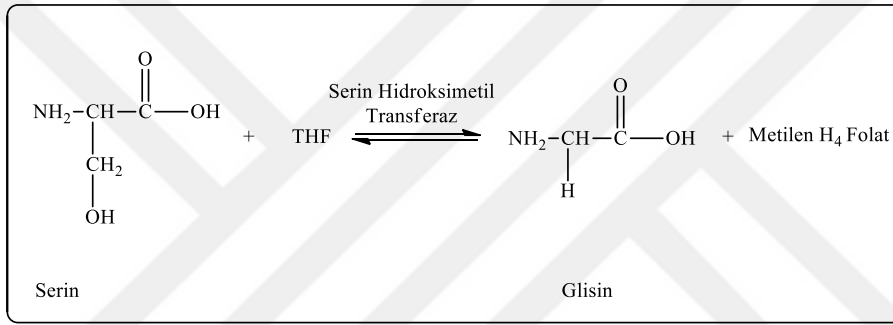
Enzimler reaksiyon mekanizmaları ve tiplerine göre altı büyük sınıfa ayrılmıştır.

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-indirgenme ya da oksidasyon-redüksiyon tepkimelerini katalize eden enzimlerdir. Oksidazlar, dehidrogenazlar, katalaz, monoksijenazlar, redüktazlar ve peroksidazlar bu gruba aittir.



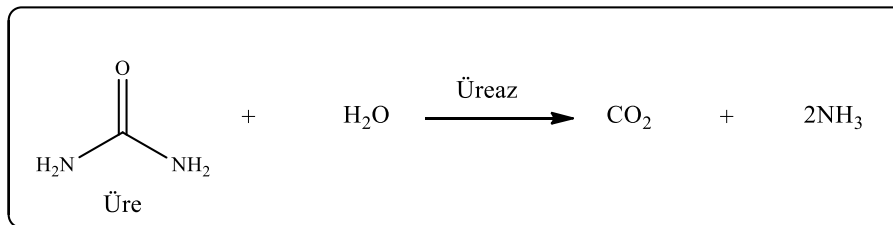
Şekil 1. Oksidoredüktaz enzim örneği

2. Transferazlar: Hidrojen hariç azot, fosfor ve karbon gruplarını transferini iki substrat arasında yapabilen enzimlerdir. Alanin transferaz, transketolazlar, transaldolazlar, kinazlar, glukokinaz ve heksokinaz bu gruba aittirler.



Şekil 2. Transferaz enzim örneği

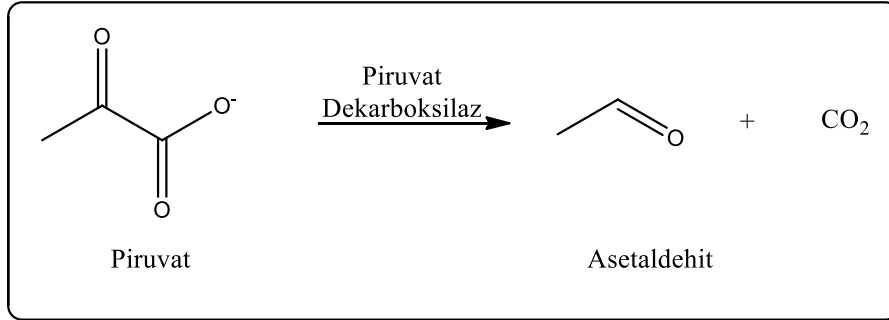
3. Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonlarını katalize eden bu enzimler su eklenmesiyle bağları koparır ve parçalar. Tez kapsamında çalıştığımız asetilkolinesteraz ve butilkolinesteraz bu gruba üyedir. Nükleazlar, esterazlar, lipazla, fosfatazlar bu gruba aittirler.



Şekil 3. Hidrolaz enzim örneği

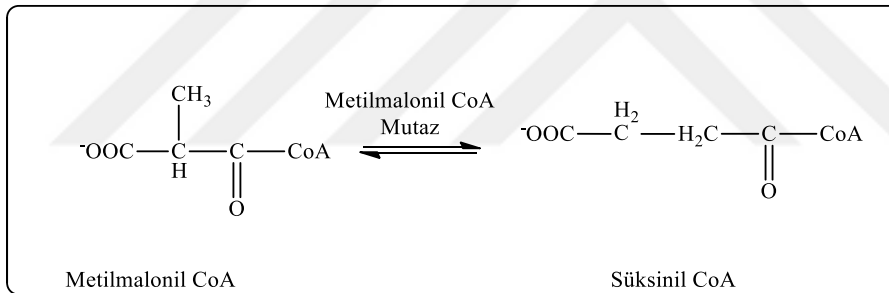
4. Liyazlar: Bu grup enzimler C-O, C-C, C-N arasındaki bağları oksidasyon ve hidrolizden ayrı bir mekanizma ile parçalarlar. Parçalama sırasında ATP kullanılmaz.

Hidratasyon ve dehidratasyon bu grubun üyeleridir (Pakiari vd., 2010; Van Outersterp, 2016).



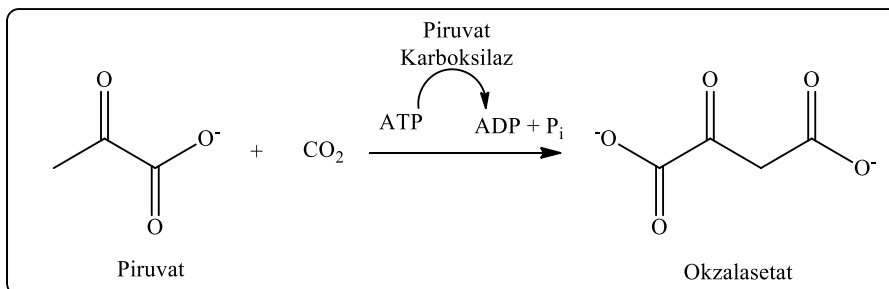
Şekil 4. Liyaz enzim örneği

5. İzomerazlar: Molekülde optik, geometrik ve yapısal izomerizasyon farklılıklarını katalizleyen aynı zamanda düzenlemeyide molekül içinde yapan enzimlerdir. Başlıca izomerazlar çeşitleri olarak epimerazları, rasemazları ve mutazları sıralayabiliriz.



Şekil 5. İzomeraz enzim örneği

6. Ligazlar: Enerjice zengin bir bağ olan ATP ve GTP'nin parçalanması ile meydana gelen enerji sayesinde iki molekülün birleşme tepkimelerini katalizlemektedir. Pirüvat karboksilaz, karboksilazlar ve sentetazlar bu gruptadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Kör, 2014).



Şekil 6. Ligaz enzim örneği

Enzim ünitesi (EÜ) bir doku ekstraktı ya da çözelti içinde ki enzimlerin miktarını gösteren bir birimdir. 25°C ve optimal şartlarda 1 dakikada 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına EÜ denir (F.Topal, 2014).

Aktivatörler enzim aktivitelerini olumlu yönde etkileyen bileşiklerdir. Enzim aktivatörleri çok büyük olmayan moleküller ya da küçük iyonlardır. Bunlar kataliz olayına kofaktörlerin aksine her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta inceleyebiliriz. Birincil gruptakiler aktivatör rolü oynar ve bunu sadece substratla birleşerek yapabilen, ikincil gruptakiler ise aktivatör rolünü serbest enzimle birleşerek yapabilen bileşiklerdir. (F. Topal, 2014).

Enzimlerin *in vitro* ve *in vivo* aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ya da tamamen yok edilmesi olayına inhibisyon denir. İnhibitör ise inhibisyona sebep olan bileşiklere denir. İnhibitörler küçük molekülü bileşik ya da iyon halinde olabilir. İlaçlar, zehirli bileşikler ve kimyasal maddelerin birçoğu fonksiyonlarını enzim inhibisyonu ile gerçekleştirir ve bu yüzden biyolojik sistemlerde enzim inhibisyonu bir kontrol mekanizması oluşturur (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzim inhibisyonu ikiye ayrılmaktadır. Bunlar geri dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyonudur. Geri dönüşümsüz inhibitörün enzimden ayrılması çok zordur çünkü enzime çok sıkı bağlanmıştır. Bu inhibitörler enzimlere kovalent ya da kovalent olmayan bağlarla bağlıdır. Geri dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşimleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon türünde enzim inhibitör kompleksinden hızlıca kopar (Kör, 2014).

Geri dönüşümlü inhibisyon üç çeşittir. Bunlar; yarışmalı tip inhibisyon, yarışmasız inhibisyon ve yarı yarışmalı inhibisyonudur.

Yarışmalı inhibisyonda inhibitör enzimin aktif bölgesini tutar ve yapı olarak substrata benzer. Enzim ve substrat arasında engel oluşur ve bağlanamazlar. İnhibisyon etkisi substrat konsantrasyonunu artırarak kaldırılabilir. Böylece V_{max} değeri değişmez ama K_m değeri artar. V_{max} tepkimedeki maximum hızdır. K_m ise maximum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonudur (Topal, 2009).

Yarı yarışmalı inhibisyon da serbest enzim ile inhibitör arasında bağlanma olmaz. Yalnızca enzim substrat (ES) kompleksine bağlanır. Sistem tek substratlı ise yarı yarışmalı inhibisyon nadiren görülür. Çünkü bu inhibisyon türü substrat enziminin fazla olduğu durumlarda geçerlidir Ortamda enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi olacağından V_{max} ve K_m azalır.

Yarışmasız inhibisyon da ise enzim, substrat ve inhibitör aynı anda bağlanabilir. İnhibisyonun etkisi substrat konsantrasyonunu artırmakla azalmaz. V_{max} azalırken ve K_m sabit kalır (Topal, 2009).

1.2. Asetilkolinesteraz Enzimi

Alzheimer hastalığı, beyin merkezi sinir sisteminde yer alan nöronlar ve sinapslar arasındaki sinir impuls kayıplarının neden olduğu nörodejeneratif yani nöronların ölmesi ya da yapı ve fonksiyonlarının kaybolması sonucu gerçekleşen ilerleyici ve geri döndürülemez bir hastalıktır (F. Topal, 2019). Alzheimer hastalığının karakteristik özellikleri bellek kaybı, bilişsel bozukluk ve unutkanlık olarak sıralanabilir aynı zamanda demansında en yaygın çeşididir (Bekris vd., 2010).

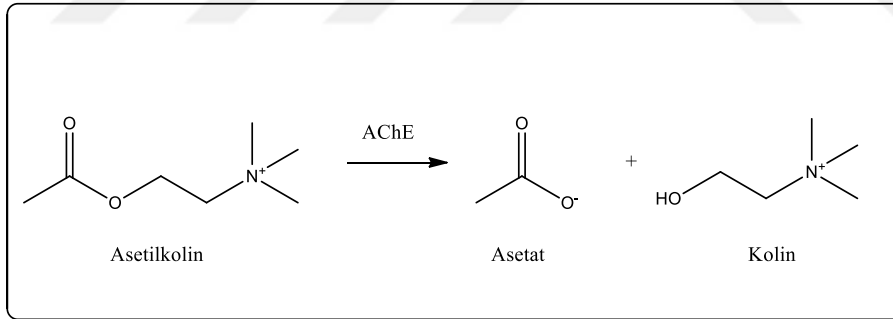
Alzheimer hastalığının biyokimyasal olarak en büyük değişikliği beyindeki asetilkolin düzeyinin azalmasıdır. Demans hastalığı bellekte öğrenme işlevlerinin azalması, algılama ve yargılama kapasitesinde azalma, konuşma yetisinde kayıp, sorunları çözümleme gibi durumlarda aksaklık meydana gelmesi ile ortaya çıkmaktadır (Şahin ve Yazıcı, 2017). Asetilkolin bellek ve dikkat ile yakından bağlantılıdır. Aynı zamanda Alzheimer hastalarında en çok azalan nörotransmitterdir. Nörotransmitterler, merkezi sinir sisteminde sinir hücrelerinde ya da sinir hücreleri ile kaslar arasında mesaj iletiminde görevlidirler. Nöronlar arasındaki iletim sinir implusları arasındaki boşlukta gerçekleşir. Buradaki işleyiş sinir lifleri boyunca hareket halinde olan elektrik sinyalleri, nörotransmitterleri serbest hale getirir ve kısa bir zaman dilimi içerisinde kimyasal sinyallere dönüşümünü gerçekleştirir. Böylece alıcı taraftaki nöronda bir tepki meydana gelir (Topal, 2014).

Asetilkolinin biyolojik olarak önemli bir nörotransmitter olduğu 1906 yılında yapılan farmakolojik çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Nacmansohn, 1952). Yapılan çalışmalarda asetilkolin'in sinir hücreleri arasında sinir impulsu taşıdığı ya da organları sinir uçlarından etkilediği bilinse de son zamanlarda yapılan çalışmalar bu görevlerin daha fazla olduğunu göstermiştir. Asetilkolinin kas lifleri ve sinir uçları boyunca biyoelektriksel bir akım oluşturduğu da bulunmuştur (Topal, 2014).

Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin saflaştırılması ilk olarak 1930'lu yıllarda latince adı *Torpedo marmoreta* olan elektrik balığının, elektrik çarpma etkisi gösteren organından gerçekleştirilmiştir. Asetilkolini hidroliz etmesinden dolayı da diğer esteraz moleküllerinden kolaylıkla ayırt edilip saf hale getirilmektedir (F.Topal, 2014). Katalizlenen tepkime asetilkolinesteraz tarafından gerçekleştirilir ve enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. Basamağın ilk adımında enzimin görevi güçlü bir nükleofil

olmaktır. İkinci basamakta ise, nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile enzim özgül bir serin kalıntısını mükemmel bir parçalayıcı grup işlevine dönüştürmektedir (Demir ve Turkoğlu, 2005). Asetilkolinesteraz enziminin asıl görevi ise kolinerjik nöron iletiminin sonlandırılmasıdır (Davit vd., 2004; Temel, 2008).

AChE beynin gri cevherinde, kasta, akciğer, dalak, plazma, eritrositler ve sinir hücrelerinde bulunan ve membrana bağlı bir enzimdir (Milatovic ve Schetimer, 2000). AChE bazı fiziksel olayların düzenlenmesinde önemli rol oynar ve bunu da kolinerjik sinapsisde nörotransmitter asetilkolini hidrolize ederek yapar. Hidrolize uğrayan asetilkolin biyolojik olarak büyük öneme sahip olan bir esterdir. Asetilkolinesteraz enziminin etkinliğini ise, beyindeki nörotransmitter asetilkolinin, sinapstaki varlığı oluşturur. Nörona sinir uyarısı geldiğinde oluşturulan asetilkolin presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve içeriğini sinaptik aralığa döker (Guyton ve Hall, 2000). Sinaptik aralığa bırakılan asetilkolin moleküllerinin çoğunluğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. AChE tarafından hidroliz edilenler ise reseptöre bağlanmayan asetilkolin molekülleridir. Asetilkolin molekülleri postsinaptik nörona bağlandıktan sonra, sinir uyarısını başka bir nörona iletir ve asetilkolinesteraz tarafından hidroliz edilmek için reseptörden ayrılır, böylece çıkan kolin tekrar kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Temel, 2008).



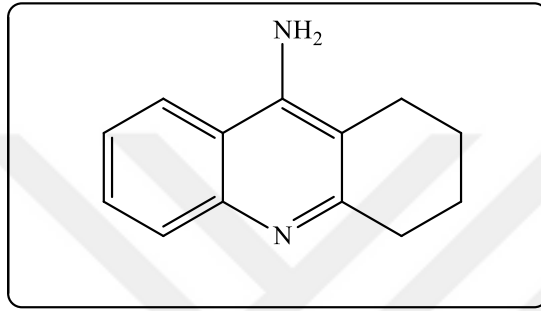
Şekil 7. AChE enziminin rol aldığı reaksiyon

Plazma ve vücut sıvılarında bulunan kolinesterazlar, kolinenerjik olan ya da olamayan dokularda yaygın bir dağılıma sahip enzimlerdir. Kolinesterazlar çeşitli etkenler sonucu oluşan strese yanıt vermede rol oynarlar aynı zamanda hücre yenilenmesi ve farklılaşmasında etkilidirler (Wilson ve Nachmansohn, 1954; Carlson, 1992).

Kolinesterazları iki grupta inceleriz. Bu gruplar inhibitörlere karşı gösterdikleri dirençler, substrat özgünlüğü ve doygun substrat varlığındaki davranışlara göre yapılmıştır. Bu gruplama AChE ve BChE (Butirilkolinesteraz) olarak yapılmıştır (Neşe, 2003). AChE enziminin kas, sinir hücrelerinde, eritrositler ve beyinde yüksek oranlarda bulunduğu, BChE enziminin ise; pankreas, serum, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunduğu

ayrıca bu enzimin hayvanlarda da oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir. Merkezi sinir sisteminin, sempatik ve parasempatik motor sinirlerinin çalışmasında aksaklık olmasından da asetilkolinesteraz enziminin aktivitesinin engellenmesi sorumludur (Lotti, 1995).

Kolinesteraz inhibitörleri alzheimer hastalığı, glukom ve myasteni gibi hastalık tedavilerinde kullanılmaktadır. Rivastigmin, galantamin, takrin ve donapezil alzheimer tedavisi için ilk kullanılan ilaçlardır. Rivastigmin ve takrin, AChE ve BChE'nin her ikisini de inhibe etmektedir. Fakat bu kullanıma karaciğer fonksiyonlarında hasar oluşturduğu için sınırlama getirilmiştir (Alaşehirli, 2005).



Şekil 8. Takrinin yapısı

1.3. Butirilkolinesteraz enzimi

BChE, karaciğerde sentezlenen tetramerik bir glikoproteindir). Sentezlendikten sonra kana verilir. BChE, beyin, akciğer, yağ doku ve ince bağırsak gibi farklı dokularda tespit edilmiştir. Butirilkolini, kolin ve bütirata hidroliz eder (Chatonnet ve Lockridge, 1989; Dave, Syal ve Katyare, 2000). Karaciğer tarafından sentezlenen butirilkolinesteraz enzimi seruma aktarılır ve sonrasında BChE butirilkolini bütirat ve koline hidrolize eder (Gu vd., 2018).

BChE'nin memelilerde bilindiği kadarıyla bir substratı yoktur. BChE, gliserol ve LDL kolesterol miktarlarında azalmaya sebep olur (Gülçin, 2009). Aslında BChE'nin aktivitesindeki değişiklikler, LDL ve total kolesterol arasındaki ilişkiyle birleştirilmiştir. İnsanlardaki yüksek butirilkolinesteraz etkisinin ilişkilendirilmesi anormal olan lipid mekanizmasıyla yapılmıştır (Cucuianu ve Popescu, 1968).

Alzheimer hastalığının son dönemlerde önemli oranda artmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda bu hastaların beyinlerinde BChE enziminin miktarının sağlıklı bireylerin beyinlerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple AChE enziminin etkisini inhibe eden ilaçlar, BChE enziminin inhibesinde doğrudan ilişkili olabileceği tahmin edilmiştir. Bu inhibisyona örnek olan ilaçlar ise galantamin, diklorvinildimetilfosfat, tetrahidroaminoakridin ve rivastigmin gibi inhibitörler verilebilir (Massoulié vd., 1993).

1.4. Antioksidan Kapasitesi ve Aktivitesi

İnsan vücudunu serbest radikallerin ve onların türevlerinin etkilerine karşı koruyan moleküller antioksidanlar olarak tanımlanır (Topal, 2014). Ayrıca besinlerin oksidatif bozulmalarına karşı da antioksidanlar koruma sağlarlar (Gülçin vd., 2005).

Antioksidanın ilk keşfi 19. yüzyıl zamanlarına dayanmaktadır. Bu yüzyıllarda araştırmacılar metal aşınmalarını ve paslanmalarını (oksidasyon) engellemek için çalışmalar yapmışlardır ve istedikleri özelliklere uyan maddeyi keşfetmişlerdir. Bu maddeleri de antioksidan olarak isimlendirmişlerdir.

Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı ile radikallerin oluşum hızı arasında bir dengeden söz edilebilir. Bu denge sayesinde serbest radikallerin olumsuz etkilerinden canlı hücre korunmuş olur. Eğer denge bozulur ise serbest radikal miktarı hücrede artışa geçer. Bu kontrolsüz artış hücre fonksiyonları üzerinde olumsuz etki oluşturur bu da oksidatif stresi meydana getirir (Halliwell, 1996; Çavdar vd., 1997). DNA ve hücre duvarları gibi biyolojik yapılarda oksidatif stresten kaynaklı aktif zincir reaksiyonları meydana gelerek oksidatif hasar oluşumu gerçekleşir. Oluşan bu hasarlarda; immun sistem hastalıkları, LDL oksidasyonu, hücre yaşlanması, koroner kalp rahatsızlığı, mutasyonel hastalıklar ve kanser gibi hastalıklara sebebiyet vermektedir. Kısacası bu hastalıkların nedeni olarak gösterilen serbest radikallerin etkisi, antioksidanlar sayesinde büyük ölçüde engellenebilmektedir (Halliwell vd., 1991; Özpınar, 2012).

Demir elementinin serbest formları, canlı organizmalarda ATP sentezi, oksijen taşınması, klorofil ve DNA üretiminde önemli göreve sahiptir ancak serbest formu canlı organizmasında zehirli etki yapabilmektedir. Bu etki sonucunda ise oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) DNA moleküllerine saldırır ya da lipid peroksidlerine neden olur (Miller, 1993). ROS dokularda oluşur ve lipidlere, proteinlere, karbonhidratlara ve DNA'lara zarar verebilirler. Organik maddeler aşırı sıcakta ROS oluşumuna sebep olabilir. Bu nedenle sigara dumanında serbest radikal çok fazladır (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Solunum için oksijene ihtiyaç duyan bütün canlılar antioksidan savunma mekanizmasına sahiptir. Zarar gören moleküllerini hem onarması hem de uzaklaştırması gerekir. Dolayısıyla bu antioksidan savunma sistemi hücrelerde oluşan oksidatif stresi, antioksidan enzim ağını koruyarak yapar (Davies, 1995; Gülçin, 2011). Bazı gıda uygulamalarında enzimler, hem ROS'ları hem de lipid peroksidlerini en aza indirmek için doğal antioksidan türleri olarak kullanılmaktadır (Frankel, 1998; Gülçin, 2012).

Önemli antioksidan enzimler ise;

Glutasyon redüktaz: Flavoprotein içeren bir enzimdir aynı zamanda flavin adenin dinükleotit (FAD) içerir. Serbest haldeki radikal etkisini engellemek için gereklidir. Serbest haldeki glutasyon molekülünü indirgenmiş glutasyon molekülüne dönüştürür (Goulart vd., 2005).

Glutasyon peroksidaz: Hücre içinde sitoplazmada bulunur. Hidrojen peroksitin sebep olduğu oksidatif strese karşı hücreleri korumayı amaçlar. Bu şekilde hidrojen peroksitten hidroksit iyon oluşumunu engeller. Organik olan peroksitleri de temizleme görevindedir (Arosio vd., 2000).

Süperoksit dismutaz: Anyon olan süperoksiti hidrojen peroksite çevirir. Ortamda bulunan hidrojen peroksit, glutasyon peroksidaz enzimlerinin reaksiyonuyla etkisiz hale getirilmektedir (Mates vd, 1999). Metal grubu taşıyan ve organizmanın oluşumundaki her hücre için özel olan süperoksit dismutaz, endojen olarak üretilebilmektedir (Çaylak, 2011).

Peroksidaz: Organik ve inorganik maddeleri hidrojen peroksit bileşiği ile katalizlemektedir (Arosio vd., 2000).

Katalaz: Hücre içi organellerde daha az olarak ise endoplazmik retikulum ve mitokondri içerisinde bulunur. Asıl görevi hidrojen peroksit molekülünü su molekülüne indirgemektir. Aynı zamanda demir ve bakır iyonlarının etkinliğinde fenton reaksiyonlarında reaktif bir bileşik olan hidroksil radikal oluşumunda etkilidir (Çaylak, 2011).

Antioksidanların söndürme, süpürme, zincir ve tamir etme aktiviteleri ile oksidanları etkisiz hale getirmektedir. Süpürme etkisinde, oksidanların etkisi azalmış ve daha az aktif olan başka bir molekül haline geldiğinde antioksidan enzim ve mikro moleküller işlev gösterir. Söndürme etkisinde, Flavonoidler; mannitol reaktif oksijen türleri ve vitaminler ile etkileşime girip onlara bir hidrojen vererek sistemi inaktif hale getirirler. Tamir etme etkisinde deforme olmuş hücreleri onarırlar. Zincir kırma etkisinde ise, hemoglobinin, seruloplazmin ve mineraller gibi maddeler başka maddeleri kendisine bağlamak için zincirleme ve radikal reaksiyonlarını başlatır. Böylece kopararak inaktif hale getirir (Gökpınar, 2006).

Antioksidan aktivitelerini belirleyebilen değişkenler şunlardır; radikalın antioksidan etkisiyle oluşan son hali, B grubu metallerini şelatlama yetenekleri, çoğunlukla indirgeme potansiyeline bağlı olan elektron ve hidrojen verici aktiviteleri, farklı antioksidan maddelerle olan etkileşimleridir (Rice Evans vd., 1997).

Antioksidanların insan sağlığı üzerine en önemli etkileri doğal kaynaklardan elde edilmeleri, çözünürlükleri, kimyasal yapıları, yapı-aktivite bağlantıları gibi durumları gösterebiliriz.

Sentetik antioksidanlar: Gıdaların uzun ömürlü olmalarını ve dayanıklılığını artırmak için gıda teknolojisinde kullanılmaktadır. Bu antioksidanların gıdalar üzerinde koruyuculuğunun çok yüksek olduğu belirlenmiş ancak insan sağlığı açısından ise ortaya çıkaracağı olumsuz durumların araştırılması ve tartışılması halen devam etmektedir (Pokorny, 2007). Kullanımı en çok tercih edilen yapay antioksidanlar ise bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tert-bütil hidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), ve propylgallate (PG) sıralanabilir (Gülçin vd., 2007a). TBHQ, BHT, BHA, PG gibi sentetik olan antioksidanlar oksidatif bozulmayı önlemek için gıda endüstrisinde çok fazla kullanılmaktadır. Ancak bu antioksidanların stabil, ucuz ve etkin olmalarından dolayı ciddi yan etkileri olabileceğinden kullanımına dikkat etmek gerekmektedir (Topal, 2014). Kullanım alanları gittikçe genişleyen bu antioksidanların kullanımına kısıtlamalar getirilmiştir (Haigh, 1986; Gülçin vd., 2005a).

Doğal antioksidanlar: Bitkiler tarafından çokça üretilen bu antioksidanlar bitkinin organik bileşikleridir. Fenolik bileşik grubunda yer alan bu organik moleküller insanlar tarafından diyetle alındığında vücutta etkilerini gösterebilir (Chaudiere ve Iliou, 1999). Önemli özellikleri olması sebebiyle insanlara doğal antioksidan alınımı özendirilmektedir. Bitki ekstraktlarının kullanımı ise gıda endüstrisinde son yıllarda gittikçe artış göstermektedir (Karagözler vd., 2008; Yavaşer, 2011).

Doğal antioksidanlar olarak fenolik bileşikler, C vitamini, E vitamini, karotenoidler ve klorofiller örnek verilebilir. Bitkisel olarak bulunan askorbik asit diğer adıyla C vitamini suda çözünbilme özelliği olan bir vitamindir. Birçok hayvan ve bitki türü askorbik asit sentezi yapabilirken insanlar bu sentezi gerçekleştiremezler. Doğada birçok sebze ve meyve içerisinde bulunmaktadır. C vitamini antioksidan özelliğinden dolayı serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonun giderilmesinde görev alır (Güçlü vd., 2005).

E vitamini ise α , β , γ , ve δ -tokoferol ile α , β , γ , ve δ tokotrienol olarak 8 çeşit E vitamini vardır. Bitkisel organizmalar tokoferol sentezi yapabilmektedir (Rizvi vd., 2014).

Fenolik bileşikler birçok sebze ve meyve de yaygın olarak bulunmaktadır. Sahip oldukları antioksidan etkisinden dolayı kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve şeker hastalığına karşı koruyucu rol oynarlar (D' Archivio vd., 2007).

Karotenoidler, fotosentetik bakteriler, algler ve bitkiler tarafından sentezlenen pigmentlerdir. Ayrıca sebze ve meyvelerde kırmızı, turuncu ve sarı renkleri oluşturur. Karotenoidler çok sayıda konjuge çift bağdan oluşmuşlardır. Mavi-yeşil alg ve bitkilerin klorofillerinde bir pigmenttir. Klorofilin bazı türevleri fotosentez için kullanılmaktadır (Namitha ve Nagi, 2010).

Tablo 1. Sentetik ve doğal antioksidanların bazı özellikleri

Doğal Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Tedarik edilmesi maliyetlidir.	Uygulama alanları geniştir.
Bazı ürünlerin kullanımına sınırlama getirilmiştir.	Maliyet olarak ucuzdur.
Güvenilir ve zararsızdır.	Güvenirliliği gün geçtikçe azalmaktadır.
Uygulama alanı artmıştır.	Çözünürlükleri düşüktür.
Çözünürlükleri fazladır.	Bazılarının kullanımına yasaklama getirilmiştir.
Duyulan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.	Gösterilen ilgi azalmaktadır.
Tamamı metabolizmada sindirilmektedir.	Adipoz dokuda depolanmaları mümkündür.

1.5. Fenolik Bileşikler

Primer ve sekonder olmak üzere iki çeşit mikrobiyal metabolit vardır. Primer metabolitler, aktif hücre çoğalması esnasında üretilirler. Aminoasitler, vitaminler tipik bir primer metabolit örnekleridir. Bazı ürünler aktif üreme fazında değil de duraklama fazında oluşur. Bu metabolitlere sekonder metabolit denir. Sekonder metabolit olarak adlandırılan fenolik bileşikler bitkilerde fazla bulunur. Bu bileşikler kanser, akciğer hastalıkları ve kalp hastalığı gibi birçok hastalığın oluşumunu engeller. Bunu da serbest radikallerin sebep olduğu aktiviteleri engelleyerek gerçekleştirir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

Fenolik bileşiklerin yapısı benzen halkalarından oluşmuştur. Fenolik bileşikler sekonder metabolit olarak bitki yapısında bulunur aynı zamanda bitkinin kendini birtakım tehlikelere karşı korumasında görev alır (Göçer, 2014).

Biyolojik olarak faydalı olan ve olumlu etkileri olan fenolik bileşiklerin gıda işleme sürecinde stabiliteleri yoktur. Işık, oksijen ve sıcaklık gibi etmenler üzerinde bozucu etki oluştururlar. Bu etkilerle beraber diğer besin bileşikleri gibi gastrointestinal bölge koşullarında ortam pH'sından fenolik bileşikler de etkilenir (Leonard, 2000; Rodriguez-Amaya, 2016).

Fenolik bileşiklerin etkisi beslenme üzerinde çok önemlidir ve bu sebeple biyoflavonoid olarak da adlandırılmaktadır. Aynı zamanda P vitamini olarak da isimlendirilmektedir (Göçer, 2014).

Bitkiler aleminde rozmarinik, klorjenik, sinapik, ferulik, kafeik, *p*-kumarik, sirinjik, vanilik, 3,4-dihidroksibenzoik ve *p*-hidroksibenzoik asit gibi fenolik asitlere çok sık rastlanır. Ancak yapılan çalışmalarda fenolik bileşikler vücuda fazla miktarda alındığında toksik etki oluşturabileceği ve gırtlak kanseri başta olmak üzere birçok kanser türüne neden olabileceği ortaya konmuştur (Göçer, 2014).

1.6. Serbest Radikaller ve Etkileri

Serbest radikal, moleküler ya da atomik yapılarda ortaklaşmamış elektron bulunduran yapılara denir. Basit bir şekilde farklı molekül gruplarıyla elektron alış veriş yapabilen bu moleküllere oksidanlar ya da reaktif oksijen türleri (ROS) diye ifade edilmektedir. Serbest radikalın oluşum işlemi ise karbohidratlar, yağlar ve proteinlerin oksijen ile reaksiyona girip parçalanarak ve sonunda ATP molekülünün üretilmesi esasına dayanır (Göçer, 2014).

Serbest radikallerin son yörüngelerindeki ortaklaşmamış elektronları nedeniyle çok fazla reaktiftirler (Gülçin, 2012). Bunun yanı sıra düşük molekül ağırlığına sahip, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkin moleküllerdir. Serbest radikaller nötral, anyon veya katyon formunda bulunabilirler (Topal, 2014).

Antioksidan savunma sistemleri zayıf olduğu durumlarda hücre ölümleri meydana gelir. Bu şekilde ROS hücreye zarar verir (Davies, 2000). Ortaklaşmamış elektron çiftleri serbest radikale reaktivite kazandırarak koenzim, nükleotid, protein, lipid ve DNA gibi yapıların üzerinde biyolojik hasar oluşturmaktadır. Bu hasarlar ise birçok hastalığa sebep olmaktadır. Örnek olarak; diyabet, kalp-damar hastalıkları, felç ve immün yetmezliği verilebilir (Diplock, 1998; Gülçin, 2012; Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

Serbest radikaller diğer maddelerden elektron alırlar çünkü kendilerini nötralize etmeleri gerekir. Eğer nötralize edilmezse hücre içi lipid ve proteinleri yok edip hücrenin çalışmasını engelleyebilir. Nötralize olayı azot veya oksijen kaynaklı olabilir. Kaynağı oksijen olanların oksijenli solunum yapan canlılar için önemi çok büyüktür. ROS olarak tanımlanan oksijen kaynaklı serbest radikallere; hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), süper oksit anyon radikali (O_2^-) dahil edilebilirken, radikal olmayan reaksiyon türlerine ise; ozon (O_3), hipoklorikasit (HOCl), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) sayılabilir (Topal vd., 2021).

Hücre içerisinde önemli radikaller de oluşmaktadır. Bunlara tiyal radikaller (RS), alkoksil (RO), peroksil (ROO) ve karbon merkezli radikalleri örnek olarak verebiliriz (Gülçin, 2012). Bunların oluşumu ise üç temel sisteme dayanır. Tek bir molekülün normal bir moleküle eklenmesi durumu, bir molekülün heterotik bölünmesi ya da normal molekülden tek bir elektron kaybının olması ve kovalent bağlı olan bir molekülün ortak elektronları alıp kullanarak homotik bölünmesi olarak ifade edebiliriz (Meral vd., 2012).

1.7. Çalışmada Kullanılan Puerarin Bileşiği

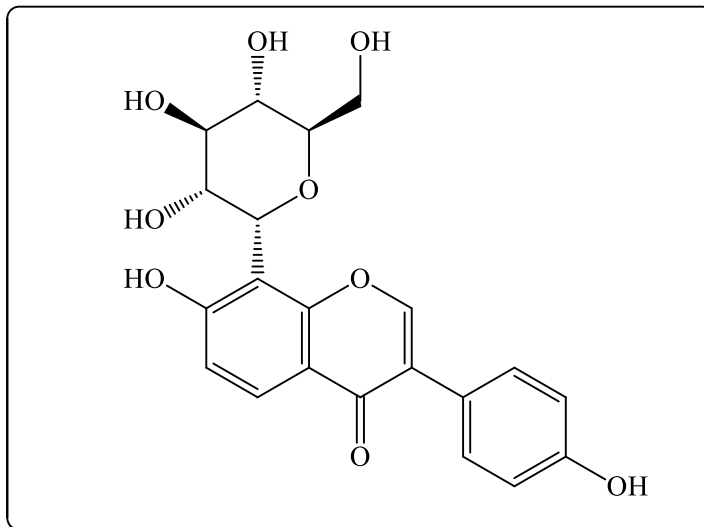
Latince adı Pueraria Lobata olan kudzu bitkisinde bulunan puerarin kökü puerarin olarak adlandırılmıştır. 1950 yıllarında kudzu bitkisinin kökünden puerarin elde edilmesine

yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çin'in geleneksel bitkisel tıbbında doğal bir izoflavon olarak kullanılan puerarin yararlı etkilere sahiptir. Puerarin diyabet ve diyabetik komplikasyonlarda, kardiyovasküler hastalıklarda, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, endometriozis ve kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 9. Kudzu bitkisinden elde edilen puerarin tozu

Puerarinin çeşitli tıbbi yöntemler üzerinde olumlu etkileri söz konusudur. Bunlar vazodilatasyon, kardiyoproteksiyon, nöroproteksiyon, antioksidan, ağrıyı hafifletme, kemik oluşumunu teşvik etme ve insülin direncini azaltma gibi çok geniş bir kullanımı söz konusudur. Çalışmalar sonucunda puerarin maddesinin bir takım özellikleri ortaya çıkarılmıştır. Kırmızı hücre zarı düzensizliğinin hemoliz mekanizmasının puerarin kaynaklı olduğu belirlenmiş ve bunun amfipat bileşikleri ve biyolojik membran açısından yüksek konsantrasyona sahip olduğu ifade edilmiştir (Yılmaz, 1991).



Şekil 10. Puerarinin kimyasal yapısı

Bacanlı ve arkadaşları serbest oksijen radikallerinin kronik hastalıkların tedavisinde önemli etkiye sahip olduğunu düşünmüşlerdir. Bitki fenoliklerine ilginin artmasıyla kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığını ve olumlu etki ettiğini gözlemlemişlerdir (Bacanlı vd., 2014).

1.8. Çalışmanın Amacı

Canlılarda oksidatif stresin kaynağı canlıda bulunan ve beslenmeyle alınan antioksidanlarla dengelenemeyen ROS olduğunu biliyoruz. Yapılan çalışmalarda ROS'ların miyokart enfarktüsü, kanser, enflamatuvar hastalıklar gibi birçok önemli hastalığın kaynağı olduğu ortaya çıkarılmıştır (Prieto vd., 1999; Gülçin vd., 2009).

Bu tez kapsamında kullanılan puerarinin ateş, migren, ishal, anjin, kalp krizi gibi birçok hastalığın tedavisinde tıbbi yöntem olarak kullanımında olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde de bitki fenoliklerinin birçok hastalığın tedavisinde antioksidan etki olarak iyileştirici özelliğinin bulunmasıyla beraber bu çalışmada puerarin bileşiğinin *in vitro* şartlarda antioksidan etkisini araştırmayı hedefledik.

Canlının antioksidan savunma sistemi zayıf ise canlıda var olan hücreler yıkılmaya başlar. Bunun sonucunda da serbest radikaller hücreyi ele geçirmeye çalışır ve hızlı bir şekilde çoğalmaya başlarlar. ROS'ların bu etkisi antioksidanlar sayesinde önlenmeye ya da azaltılmaya çalışılır. Antioksidanların çalışma prensibi serbest radikalleri nötralize ederek hücrelere gerçekleştirilen saldırıları azaltmaya veya önlemeye yöneliktir. Bu sebeple de yukarıda belirtildiği gibi doğal antioksidanların önemi çok artmış ve bununla ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. (Gülçin vd., 2010).

ROS'ların sebep olduğu hastalıklardan olan Alzheimer hastalığının günümüzde kesin bir tedavisi bulunmamaktadır sadece hastalığın seyrini azaltmaya yönelik ilaç tedavisi uygulanmaktadır. Ancak uygulanan tedavide kullanılan etken maddelerden olan takrinin canlı vücudunda karaciğer hasarına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu sebeplede kullanımına sınırlamalar getirilmiştir. Araştırmamızda fenolik madde olan puerarinin antioksidan kapasitesini araştırıp sonrasında AChE ve BChE enzimleri etkisinde inhibisyon bulgularına göre takrin ile sonuçlarını kıyaslamayı hedefledik.

Çalışmamızda kullanılan puerarin bileşiğinin beş farklı yöntem kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlemeyi hedefledik. Bu amaç için demir indirgeme kapasitesi yöntemi, CUPRAC yöntemi, ABTS, DPPH ve DMPD radikali giderme aktivitesi yöntemleri kullanıldı. Puerarin bileşiğinin antioksidan kapasitesi belirlenmesini amaçladık. Enzim olarak AChE ve BChE kullanarak elde ettiğimiz verilere göre IC₅₀ ve K_i grafiklerinin oluşturulmasını ve grafiklerden elde edilen sonuçlara göre inhibisyon türleri

belirlenmesini hedefledik. Yapılan alışmalar sonucunda ise elde ettiğimiz verilerden yola çıkılarak puerarinin antioksidan bir madde olduğunu, özellikle hücre hasarı ile başlayan Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanılabilecek ilaç için n *in vitro* alışma literatüre sunulması hedeflenmiştir.



2. MATERİYAL VE METOT

2.1. Kullanılan Kimyasallar ve Ekipmanlar

DPPH, DMPD, linoleik asit, ABTS, α - tokoferol, ferrozin, askorbik asit, BHA, BHT, troloks, bakır (II) klorür (CuCl_2), $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}$, hidroklorikasit (HCl), kurşun (II) tiyosiyanat (SCN), demir (III) klorür (FeCl_3), tris, asetilkolin iyodat, butirilkolin iyodat, trikloroasetik asit (TCA), tris, takrin, puerarin, neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) kimyasalları Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

Hassas terazi	(OHAUS)
Vortex	(WiseStir)
Manyetik Karıştırıcı	(Velp)
Etüv	(Nükleon)
pH metre	(Edge pH)
Otomatik pipetler	(Eppendorf)
Spektrofotometre	(Genesys 180)

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.2.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kapasitesi Yöntemi

Bu metot için bazı çözeltiler hazırlandı. Bunlar; %10'luk TCA, %1'lik $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve %0.1'lik FeCl_3 çözeltileri sırasıyla saf su içerisinde çözülerek hazırlandılar. 300 mL, 0.2 M'lık pH: 6.6 olan fosfat tamponu hazırlandı. Puerarin çözeltisi ve standart antioksidan çözeltileri 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. Daha sonra gerçekleşen tepkime karışımına 1 mL %10'luk TCA ilave edildi. Son olarak da 0.25 mL %0.1'lik FeCl_3 ilavesi yapılarak 700 nm'lik dalga boyunda saf suya karşı absorbans değerleri okundu.

2.2.3. Cu^{2+} - Cu^+ İndirgeme Kapasitesi Yöntemi (CUPRAC Metodu)

Öncelikle 0.01 M CuCl_2 çözeltisinin hazırlanması için 0.033 g CuCl_2 alınıp 50 mL saf suda çözdürüldü. Daha sonra 5×10^{-3} M'lık etil alkol içeren neokuprin çözeltisinin hazırlanması için Neokuprinden 0.035 g alınarak 50 mL etil alkolde manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldü. Son olarak 1 M'lık CH_3COONa pH: 6.5 tamponunun hazırlanması için 4 g CH_3COONa alınıp 40 mL destile suda çözülerek, pH'sı 6.5 olacak şekilde düzenlemesi yapıldıktan sonra çözeltinin hacmi 50 mL olacak ölçüde saf su eklenerek tamamlandı. Tez kapsamında hazırlanan çözeltiler sırasıyla $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tampon çözeltisinden 0.125 mL,

CuCl₂ çözeltisinden 0.01 M, 0.125 mL, neokuprin çözeltisinden 7.5x10⁻³ M, 0.125 mL alınarak numunelere ilave edilerek son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Yarım saatlik beklemenin ardından absorbans değerleri 450 nm'de saf suya karşı ölçüldü.

2.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

İlk olarak 0.02 g K₂O₈S; 2.50 mL'lik ABTS içerisine dikkatlice yavaş yavaş eklenerek yarım saat manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak çözülerek homojen karışım elde edildi. Daha sonra ise ABTS^{•+} çözeltisinin hazırlanması için 0.075 g ABTS^{•+} alınarak 50 mL saf su içerisinde çözüldü. Standartlar ve puerarin çözeltisinden deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda ilave edilirken içerisine 0.5 mL ABTS radikal çözeltisinde eklenilerek son hacim 2 L olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Her bir deney tüpü vorteks ile karıştırılarak 30 dakika karanlık ortamda inkübasyon gerçekleşti. Etanoldan oluşan köre karşı absorbans 734 nm'de ölçüm yapıldı.

2.2.5. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

0.001 M'lık DPPH[•] çözeltisi için 0.050 g DPPH[•] 50 mL etil alkol içerisinde çözülerek radikal oluşmaya bırakıldı (Blois, 1958; Gülçin, 2012). Bu sayede serbest radikalın oluşturulması hedeflendi. Stok çözeltinin doğruluğunu tespit etmek için kontrol çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla deney tüpüne 2 mL etanol, 0.5 mL DPPH[•] çözeltisi eklenerek absorbans değeri kaydedildi. Deney tüpleri içerisine sırasıyla hazırlanan puerarin ve standartlar farklı konsantrasyonlarda aktararak son hacimleri etil alkol ile 2 mL'ye tamamlandı. Sonrasında deney tüpleri içerisine hazırlanan DPPH[•] çözeltisinden 500 µL eklenerek 30 dakika karanlık ortamda beklemeye bırakıldı. Daha sonra kör olarak kullanılan etanole karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü.

2.2.6. DMPD Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

0.1 M'lık DMPD çözeltisi hazırlanarak bu stok çözeltiden 1 mL alındı. pH: 5.3, 0.1 M alınarak asetat tamponu içerisine ilave edildi. Kontrollü olarak 0.05 M'lık FeCl₃ çözeltisinden, tampon ve DMPD çözeltisi içerisine eklendi. Hazırlanan bu çözelti ile optik dansite kontrolü yapıldı. Bu değerin 0.900±0.100 nm olana kadar çözelti miktarı ayarlandı.

Puerarin ve kullanılan antioksidanların farklı oranlarda ki çözeltileri (10 ve 20 µg/mL) deney tüplerine aktarımı yapılarak toplam hacim 0.5 mL olana kadar saf su ile tamamlandı. Deney tüpleri içerisinde karışıma, 1 mL DMPD^{•+} çözeltisi ilave edildi. Ortalama 45-50 dakikalık inkübasyon sonrası 505 nm'de absorbanslar ölçüldü.

2.2.7. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivite Yöntemi

1 M'lık ve pH'ı 8 olan Tris/HCl çözeltisi hazırlandı. Sonraki basamakta 10 mM'lık DTNB çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 10 mM'lık asetilkolin iyodat çözeltisi hazırlanarak suda çözüldü. Daha sonra puerarinin bileşiğinin AChE enzimi üzerine etkisini araştırıldı.

2.2.8. Butirilkolinesteraz Enzim Aktivite Yöntemi

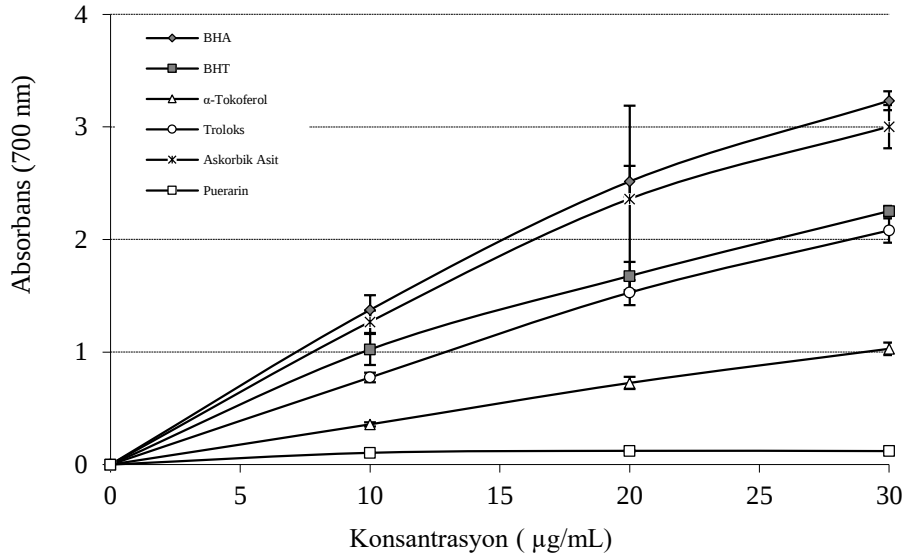
1 M'lık Tris-HCl tamponu için pH değeri 8'e ayarlandı. Daha sonra 10 mM'lık DTNB çözeltisi hazırlandı ve 10mM'lık butirilkolin iyodat çözeltisi oluşturuldu. BChE için kullanılan çalışma basamakları öncesinde çalıştığımız AChE için aynıdır. Farklı olarak AChE yönteminde kullandığımız substrat asetilkolin iyodat iken, BChE yönteminde substrat olarak butirilkolin iyodat kullanıldı.



3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi Sonuçları

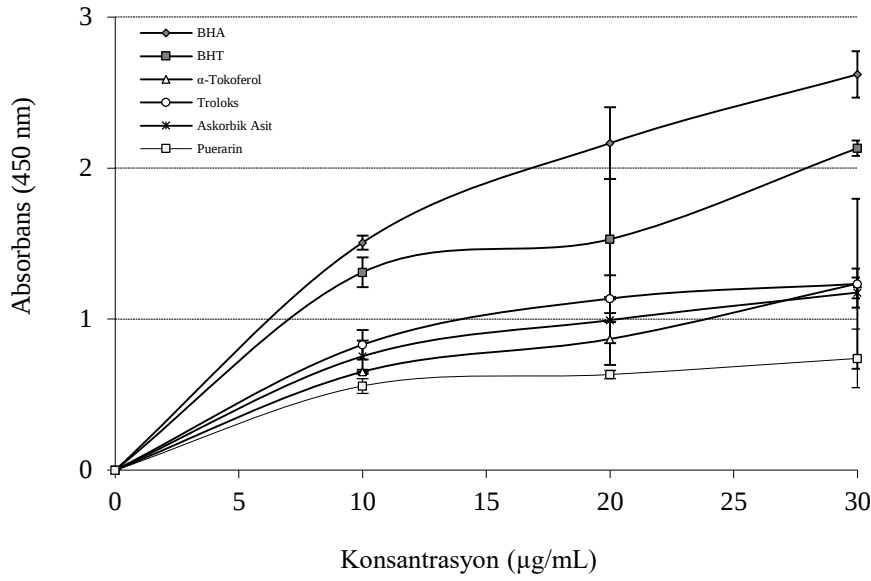
Demir indirgeme metodundan elde edilen sonuçlara göre standart antioksidanlar güçlü indirgeme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Öte yandan tez kapsamında kullanılan puerarin bileşiği de standartlara paralel sonuçlar göstermiş olup yüksek Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Puerarin ve kullandığımız standart antioksidanlarla konstrasyona denk gelen absorbans grafiği çizildikten sonra puerarin maddesinin bu indirgeme yönteminde absorbans değerinin 0.122±0.010 olarak hesaplanmış olduk.



Şekil 11. Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi

3.2. Cu²⁺-Cu⁺ İndirgeme Kapasitesi Sonuçları

Puerarinin kuprik iyonlarını indirgeme kapasitesi, konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi. Puerarin ve kullandığımız standart antioksidanların konsantrasyona denk gelen absorbans grafiği çizildikten sonra puerarin için 20 µg/mL'ye denk gelen absorbans değeri 0.633±0.026 olarak bulundu.

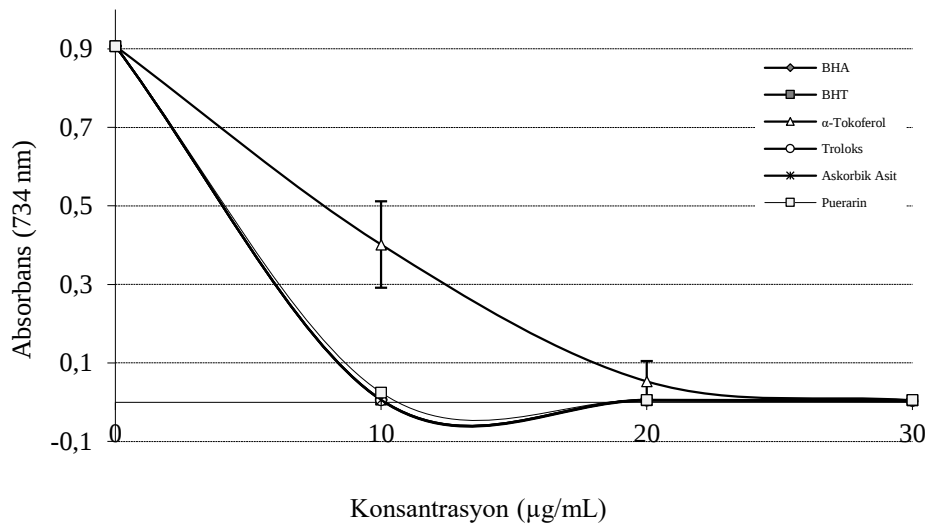


Şekil 12. Cu⁺²-Cu⁺ İndirgeme Kapasitesi

3.3. ABTS Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

Puerarin ve çalışmada kullandığımız troloks, α-tokoferol, BHT ve BHA gibi antioksidanların ABTS⁺ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle konsantrasyon değerlerine denk olan absorbans grafiği oluşturuldu. Puerarin çözeltisi için ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi grafiği çizimi yapıldıktan sonra her bir standart ve Puerarin çözeltisi için tek tek IC₅₀ değer hesaplamaları yapıldı. Puerarinin IC₅₀ değeri 3.381 µg/mL olarak belirlendi.

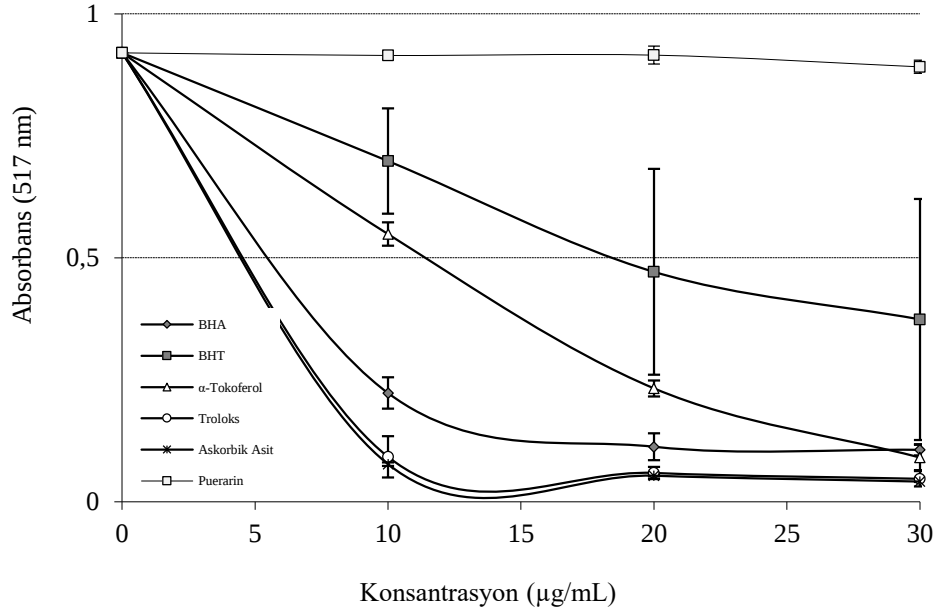
Puerarin ve çalışmada kullanılan standart antioksidanların ABTS⁺ giderme aktivitelerinin sırasıyla α-Tokoferol < Puerarin < BHT < Askorbik asit < BHA < Troloks olarak belirlendi.



Şekil 13. ABTS⁺ giderme aktivite grafiği

3.4. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

Puerarin ve çalışmamızda kullandığımız troloks, α -tokoferol, BHT ve BHA gibi antioksidanların DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tespiti için öncelikle konsantrasyon değerlerine denk olan absorbans grafiği oluşturuldu. Puerarin çözeltisinin DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin konsantrasyon ile paralel olarak arttığı görüldü.



Şekil 14. DPPH serbest radikali giderme aktivite grafiği

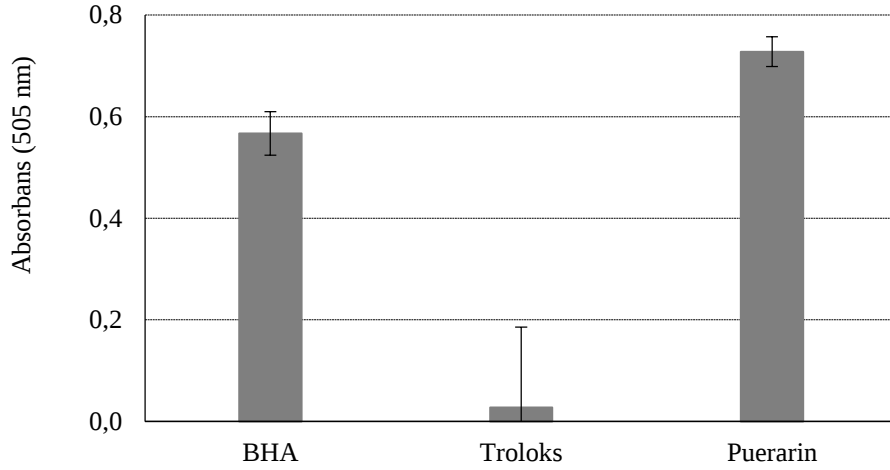
Puerarin ve kullanılan standart antioksidanların DPPH radikali giderme aktivitesi bulgularının sıralaması: Askorbik asit > Troloks > BHA > α -Tokoferol > BHT > Puerarin olarak bulundu. Daha sonra ise DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin kullanılan her bir standart ve puerarin için ayrı ayrı IC_{50} hesaplamaları yapıldı. Puerarin bileşiği için IC_{50} değeri 877.22 μ g/mL olarak bulundu Tablo 2’de gösterildi.

Tablo 2. DPPH[•] ve ABTS^{•+} radikali giderme aktivitelerinin IC₅₀ değerleri

Antioksidanlar	DPPH [•] Giderme (μg/mL)	ABTS ^{•+} Giderme (μg/mL)
BHA	8.035	2.960
BHT	22.355	3.151
α-Tokoferol	9.505	4.150
Troloks	5.824	2.924
Askorbik asit	5.562	3.126
Puerarin	877.22	3.381

3.5. DMPD^{•+} Radikal Giderme Aktivite Yöntemi

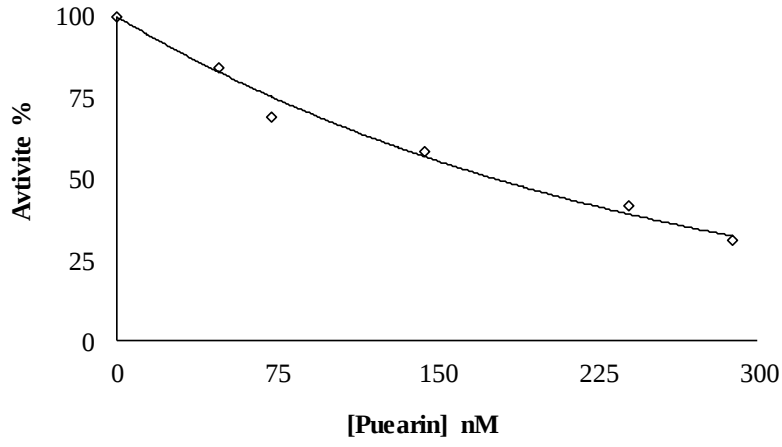
Puerarin, troloks ve BHA bileşiklerin DMPD^{•+} giderme aktivite bulguları için absorbans grafiği çizildi. Kullanılan standart antioksidan molekülleri ile puerarin çözeltisinin DMPD^{•+} giderme aktivitesi sırasıyla Troloks > BHA > Puerarin şeklinde olduğu bulundu.



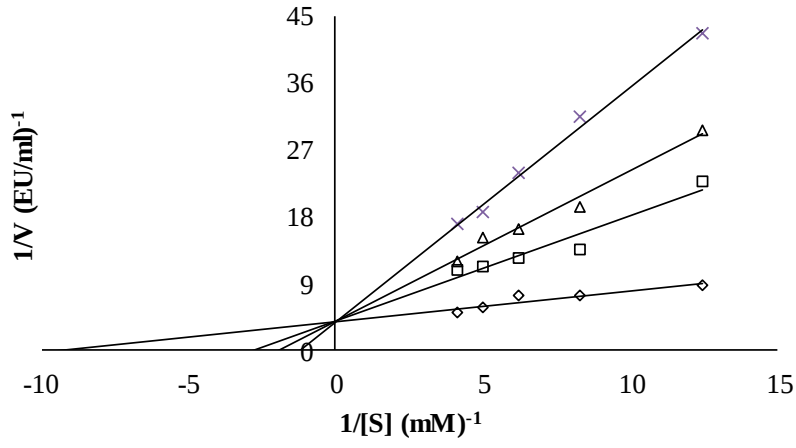
Şekil 15. DMPD^{•+} giderme aktivite grafiği

3.6. Asetilkolinesteraz Enzim Bulguları

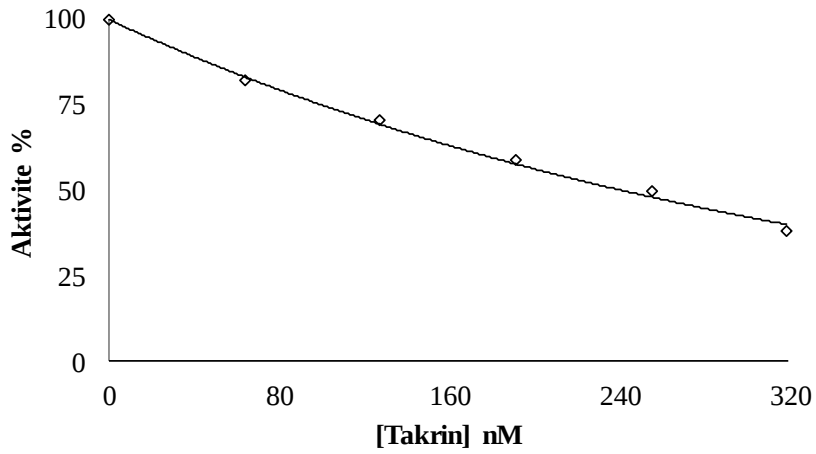
Puerarin ve takrin bileşiklerinin asetilkolinesteraz enzimi etkisindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Bulgularımızı asetilkolinesteraz yöntemini kullanarak belirledik. İnhibisyon etkisi gösteren puerarin ve takrin için ayrı ayrı aktivite-IC₅₀ ve K_i grafikleri çizildi.



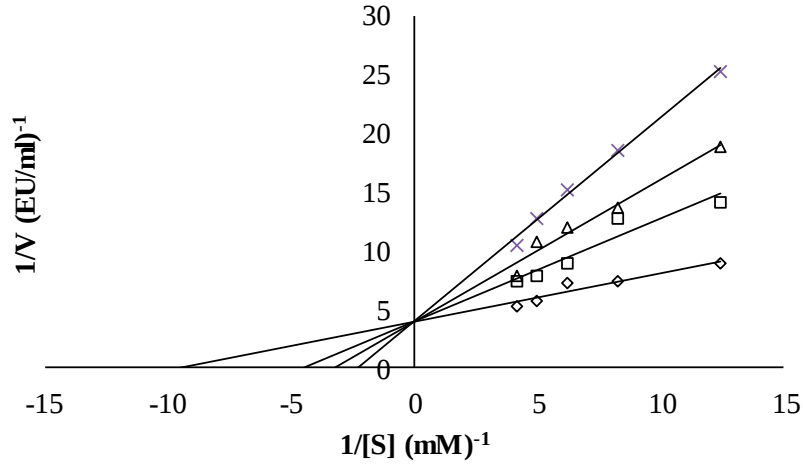
Şekil 16. AChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Puerarin] grafiği



Şekil 17. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 18. AChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği



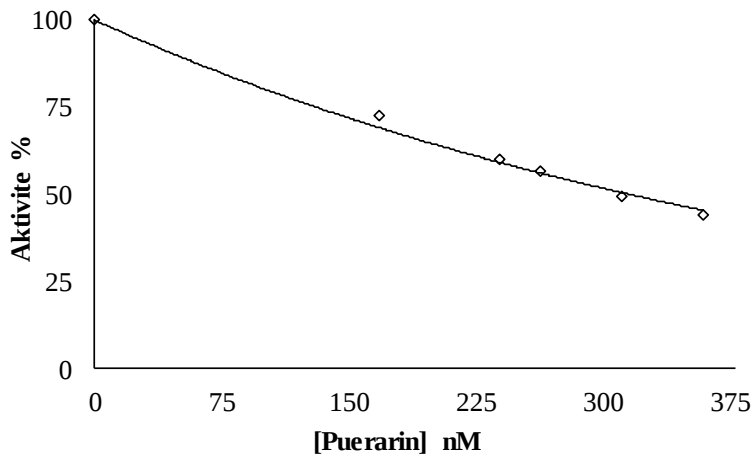
Şekil 19. AChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 3. AChE Enzimi için takrin ve puerarin inhibisyon sonuçları

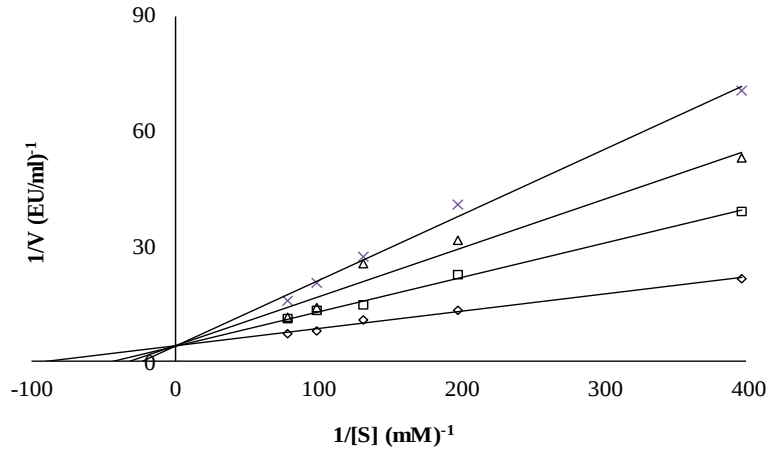
Molekül	AChE (nM)			İnhibisyon tipi
	IC ₅₀	R ²	K _i	
Puerarin	177.73	0.9850	60.87±5.29	Yarışmalı
Takrin	239.02	0.9960	133.91 ± 18.98	Yarışmalı

3.7. Bütirilkolinesteraz Enzim Bulguları

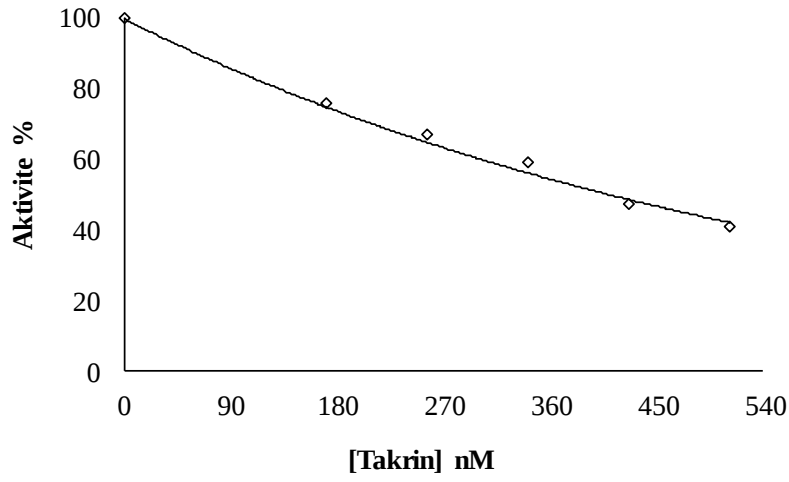
Puerarin ve Takrin için bileşiklerinin butirilkolinesteraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerine bakıldı. Sonrasında her madde için IC₅₀ ve K_i grafikleri çizildi.



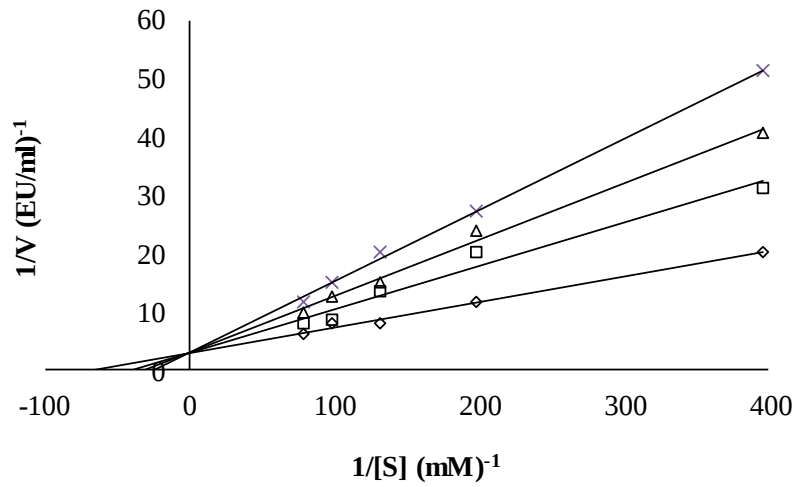
Şekil 20. BChE enzimi için çizilen Aktivite (%)-[Puerarin] grafiği



Şekil 21. BChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 22. BChE enzim için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği



Şekil 23. BChE enzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Aşağıdaki verilen Tablo 4’te BChE enzimi için takrin ve puerarin bileşiklerinin karşılaştırılması yapılarak inhibisyon türleri belirlendi.

Tablo 4. BChE enzimi için takrin ve puerarin bileşiklerinin inhibisyon sonuçları

Molekül	BChE (nM)			İnhibisyon tipi
	IC ₅₀	R ²	K _i	
Puerarin	315.07	0.9938	183.82±19.75	Yarışmalı
Takrin	407.73	0.9941	369.58±25.48	Yarışmalı

4. TARTIŞMA

Yaşam üzerinde her şey denge halindedir. Bu dengelerden biri de insan metabolizması olarak belirtilebilir. Eğer denge bozulursa metabolizmada birçok olumsuz etki ortaya çıkabilir. Bu olumsuz etki proteinlere, lipitlere ve DNA'lara zarar verebilir. Bütün bu etkilerin sonucu olarak kardiyovasküler hastalıklar, beyin fonksiyonunun bozukluğu, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve kanser gibi hastalıkların ortaya çıkması için gerekli zemin hazırlanmış olur. Metabolizmada meydana gelen bu olumsuzluklarla antioksidanlar ile savaşmak mümkündür. Antioksidan yapılar sebzeler ve meyveler içerisinde fazlaca bulunan karoteneoidler, askorbat ve tokoferoller başta olmak üzere birçok fenolik veya flavonoid halde bulunmaktadır (Ames vd., 1993).

Son yıllardaki oksidatif stres etkisi antioksidanların önemini daha da artırmıştır. Bu durum farmakoloji, gıda, beslenme ve fizyoloji ile ilgili yapılan çalışmalarla desteklenmiş hem de bu çalışmaların artması sağlanmıştır (Topal, 2019).

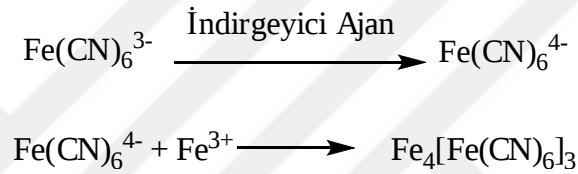
Gelişen teknoloji ve genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) ürünlerinin artması buna bağlı olarak da hastalık yapıcı etmenlerin çoğalması ile birlikte insanlar artık doğal ürünlere yönelmiştir. Dolayısıyla hem tıpta koruyucu ürün olarak hem de gıda teknolojisi alanlarında doğal olan gıda katkılarına yönelim gerçekleşmiştir. Bu sebeple de sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanlarla ilgili çalışmalar çok ilgi görmeye başlamıştır (Topal vd., 2021).

Vücutta antioksidan metabolitleri önemli olduğu kadar son yıllarda yapılan çalışmalar içerisinde görülen tablo demir metabolizmasında önemli olmasıdır. Demir, pek çok canlı için yaşamsal öneme sahip olan özel bir elementtir. Metaller içinde en yaygın kullanılan element demir elementidir. Oksijen taşınması, elektron alıp-verme, ATP sentezi, DNA, RNA ve protein sentezinde görev alır. Demir, plazma içerisinde glikoprotein yapısında olan transferrin tarafından sentezlenir. Hücre içinde demirin moleküler kontrolünde demirin depolanması, kullanımı ve taşınması ile ilgili bütün proteinlerin sentezi hücre içi demirle düzenlenir (M. Topal, 2019; Gülçin, 2020). Demir elementi çeşitli enzimlerin üretiminden sorumlu olduğu gibi oksijen taşıyan alyuvar hücrelerinin üretiminden de sorumludur. Aynı zamanda kalsiyum ve bakır emilimini de etkiler. Dolayısıyla da bağışıklık sisteminin güçlendiricisidir. Ferröz iyonları halinde de ferritin ve hemosiderin proteinlerinde depolanması gerçekleşir. Demirin bağırsaklar tarafından emilimi gerçekleştiğinde, transferrin proteinleri aracılığıyla ferrik iyonları halinde demir

ihtiyacı olan hücrelere taşınır. Kısacası bu yolla bir ferritin proteinin 4500 adet ferröz iyonlarını bağladığı bilinmektedir (Hallwell,1996; Topal, 2014; Topal vd., 2021).

Tez çalışması kapsamında puerarin molekülünün çözeltisi hazırlanarak; Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, CUPRAC metoduna göre Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi, DPPH, ABTS ve DMPD radikali giderme aktivitesi olmak üzere farklı yöntemler tercih edildi. BHT, BHA, troloks, askorbik asit ve α -tokoferol antioksidanları, standart olarak tüm yöntemler için kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre grafikler çizilerek karşılaştırmalar yapıldı.

$\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3+}$ 'nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{2+}$ 'ye indirgenmesiyle Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne ferrik iyonları (Fe^{3+}) ilavesi ile 700 nm'de etkili absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir karışım olan $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ oluşumuna yol açar (Gülçin 2012).



Bu tez kapsamında kapsamlı olarak, puerarin ile kullandığımız diğer antioksidanların indirgeme kapasitelerini karşılaştırıldı ve elde ettiğimiz sonuçlara göre puerarinin indirgeme kapasitesinin diğerlerinden daha düşük olduğunu belirlendi. Sonuçlar karşılaştırılarak için Tablo 4'te verildi. Buna göre araştırmamızda puerarin ve standart antioksidanların indirgeme kuvvetleri birbirleriyle karşılaştırılmaları yapıldı ve puerarin < α -tokoferol < troloks < BHT < askorbik asit < BHA olarak sıralandı.

Bir bileşiğin antioksidan kapasitesi belirlenirken önemli değişkenler vardır. İndirgeme kapasitesi de bu değişkenlerden biridir (Meir vd. 1995). İndirgeme olayı kimyasal reaksiyonlarda elektron kazancı olarak ifade edilirken oksidasyon ise tam tersi elektronun kaybedilmesi olarak tanımlanır. Antioksidan bir molekülün indirgenebilir olabileceği çalışmalar sonucu ortaya koyulabilir. Ancak indirgenmiş olan her molekülün ise antioksidan madde olmak zorunda değildir (Gülçin, 2012).

ABTS ve DPPH radikali giderme aktiviteleri sürekli kullanılan spektrofotometrik yöntemlerdir. Koyu mor renkli DPPH radikali antioksidan maddeyle etkileşime geçmesiyle oluşur. Ortaya çıkan yöntem ise hızlı, tekrarlanabilen ve seçici olabilir (Gülçin, 2020). Etilalkol içerisinde DPPH radikali çözünerek, radikallerin antioksidanların gücüyle indirgenmesi gerçekleşir (Gülçin, 2012).

CUPRAC metodu önemli ve etkili bir yöntemdir (Apak vd., 2006; Gülçin vd., 2010a; 2010b). Bu yöntem aslında antioksidanlar ve indirgeyicilerin neokuprin varlığında kuprik

iyonlarını (Cu^{2+}), küpröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme mantığıyla çalışır. Neokuprin, indirgeyici bir ajandır aynı zamanda organik bir bileşiktir (Annakkaya, 2012; Gülçin, 2012). Kuprak yöntemi indirgeyici maddenin hidrofikliğine ya da türüne dikkat etmeden düşük maliyetli, basit, hızlı, kararlı ve çeşitli antioksidanlara da uygulanabilen bir yöntemdir (Lee vd., 2005; Gülçin, 2008; 2012). Kuprik iyonlarının indirgeme ölçümlerinden *in vitro* koşullarda elde edilen sonuçlarının *in vivo* koşullarda da indirgemenin etkili olacağını desteklemektedir (Topal, 2014). Elde edilen karışımın absorbans değeri 450 nm’de ölçülerek belirlendi.

Araştırmamızda puerarin ve standart antioksidanların indirgeme kuvvetleri birbirleriyle karşılaştırılmaları yapıldı ve puerarin < α -tokoferol < askorbik asit < troloks < BHT < BHA olarak bulundu. Puerarin bileşiği standart antioksidanlardan düşük bakır indirgeme kapasitesine sahip olsa da yüksek bakır indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada tüylü gündüzsefası (*Convolvulus betonicifolia* Mil. Subs.) liyofilize su özütünün bakır indirgeme absorbans değerinin 0.441 olduğunun ve etkili bir antioksidan kapasitesine sahip olduğu belirtilmiş (Bingöl vd., 2021). Puerarin bileşiğinin bakır indirgeme absorbans değeri ise 0.633 olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5. İndirgeme kapasitelerinin karşılaştırılması

Antioksidanlar	Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme	Cu^{+2} - Cu^+ İndirgeme
BHA	2.515±0.138	2.165±0.238
BHT	1.675±0.123	1.529±0.398
α -Tokoferol	0.725±0.055	0.868±0.171
Troloks	1.527±0.109	1.136±0.154
Askorbik asit	2.360±0.827	0.993±0.153
Puerarin	0.122±0.010	0.633±0.026

Antioksidanların vücut tarafından sentezlenenleri olduğu gibi dışarıdan beslenme yolu ile de vücuda alınması mümkündür. Antioksidanlar, canlı yaşamının kalitesini artırır. Bu etkiyi ya hücre yıkımını ya da tümör oluşumunu azaltarak gerçekleştirir. Meyveler, sebzeler, baharatlar, çaylar, şifalı bitkiler, yağlar, tahıllar, tohumlar, proteinler ve enzimler doğal antioksidanlar olarak görülmektedir. Doğal antioksidanlar her geçen gün daha da önem arz ettiği için, bitkisel antioksidanlara olan ilgide gün geçtikçe artmaktadır (Gülçin, 2012).

$\text{ABTS}^{+\cdot}$, $\text{DPPH}^{\cdot}$ ve $\text{DMPD}^{+\cdot}$ radikal giderme yöntemleri bitkilerin, yiyecek ve içeceklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yaygın yöntemlerdir (Köksal vd., 2017). $\text{DPPH}^{\cdot}$ radikali giderme yöntemi 1950 yıllarında ilk defa doğal maddelerdeki H-donörlerinin keşfini yapabilmek için kullanılan bir yöntemdir (Roginsky

ve Lissi, 2005). DPPH'yi DPPH₂'ye indirgenmesi bu radikal gidermede gerçekleşir (Oyaizu, 1986). Bitki ekstraktları ile antioksidan moleküller DPPH radikalleri ile reaksiyon oluşturur ve proton verirler. Renk değişimi ise bu yöntemde 517 nm'de okunup kaydedildi. Çalışmamızda puerarinin DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili antioksidan moleküller ve puerarinin IC₅₀ değerleri Tablo 2'de verildi. Buna göre; puerarin < BHT < α-tokoferol < BHA < troloks < askorbik asit olarak belirlendi. Bu ölçüm sonuçlarına göre DPPH molekülünün kimyasal yapısı büyük olduğu için sterik engele takıldığı bu sebeple puerarin bileşiğinin IC₅₀ değerinin bu engelden dolayı yüksek olduğu düşünülmektedir. Tablo 6'da Puerarin ve standartların 20 mg/mL konsantrasyondaki giderme aktivitelerine ait % inhibisyonları karşılaştırılarak verildi.

Tablo 6. Puerarin ve standartlara ait giderme aktivitelerinin % inhibisyonları

Antioksidanlar	ABTS ^{•+} Giderme	DMPD ^{•+} Giderme	DPPH• Giderme
BHT	94.45	*	48.10
BHA	94.45	31.36	87.71
α-Tokoferol	94.15	*	74.67
Troloks	99.55	96.73	93.58
Askorbik asit	99.33	*	94.13
Puerarin	99.33	11.86	0.54

* DMPD^{•+} giderme metodunda aktivite göstermemektedir (Gülçin, 2020).

ABTS'nin metmiyoglobin ve H₂O₂ ile tepkimeye girmesiyle ferril miyoglobin oluşmaktadır (Miller vd., 1993; Re vd., 1999). ABTS radikal giderme yöntemi kısmen kullanışlı bir yöntemdir çünkü suda ve organik çözücülerde çözündüğü, ayrıca iyonik şiddetten de etkilenmediği görülmüştür (Gülçin, 2012). Antioksidan mekanizmalarla yapılan çalışmada pH'ın etkisi önemlidir. Bunun içinde geniş pH aralıklarında çalışılabilir olması önemlidir. ABTS yöntemide yaklaşık yarım saat sürede gıda maddelerinde sonuç vermektedir (Gülçin, 2012). Ayrıca ABTS radikal giderme yönteminin, hem elektron transferiyle gerçekleşen yöntemlerde hem de hidrojen transferine dayalı yöntemlerde kullanışlı olacağı belirtilmiştir (M.Topal, 2014). Bu yöntemde antioksidanların 734 nm'de karakteristik absorpsiyona sahip mavi/yeşil bir kromofor olan uzun ömürlü ABTS radikal katyonunu söndürme kabiliyetine dayanmaktadır (Gülçin, 2012).

Bu tez kapsamında puerarinin ve standart antioksidanların ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesinin IC₅₀ değerleri ise, α-tokoferol < puerarin < BHT < askorbik asit < troloks < BHA olarak belirlendi.

Yapılan çalışmalarda bazı maddelerin ABTS radikal giderme yöntemi kullanılarak IC₅₀ değerleri belirlenmiş olup bu değerler ise; *Mentha pulegium* bitkisinin metanol ekstaktının IC₅₀ değeri 7.92 µg/mL (Gülçin vd., 2020), L-Adrenalinin IC₅₀ değeri 6.93 µg/mL (Gülçin, 2009), usnik asitin IC₅₀ değeri 10.41 µg/mL (Çakmak ve Gülçin, 2019) olarak belirlenmiştir. Tez kapsamındaki puerarin bileşiğine ait IC₅₀ değeri ise 3.381 µg/mL olarak tespit edildi. Literatürde verilen yukarıdaki doğal ve sentetik antioksidanlardan daha etkin ABTS radikal giderme aktivitesinde sahip olduğu gözlemlenmiştir.

DMPD^{•+} radikali giderme yönteminin özünde uygun oksidan varlığında ve asidik pH etkisi altında DMPD'nin renkli ve kararlı bir katyonu olan DMPD^{•+} oluşturulmasına temeline dayanır. DMPD^{•+}'nın maximum absorbands değeri 505nm'de ölçülür (Gülçin, 2012). Ayrıca bu yöntemin hidrofobik antioksidanlarla kullanılamaması olumsuz tarafıdır (Fogliano vd., 1999).

Puerarin ve kullanılan standart antioksidanların DMPD radikal giderme aktiviteleri değerlendirilerek sıralandırıldı. Buna göre, troloks < BHA < puerarin olarak belirlendi. DMPD^{•+} molekülünün kimyasal yapısı büyük olduğu için sterik engelle takıldığından α-tokoferol, askorbik asit ve BHT'nin hesaplamaları yapılamamıştır. DMPD^{•+} radikali giderme yöntemi ile ilgili daha önceden yapılan çalışmalarda ise IC₅₀ değerleri; usnik asit için IC₅₀ değeri 33.0 µg/mL (Çakmak ve Gülçin, 2019), *Satureja cuneifolia* ekstraktı için ise IC₅₀ değeri 38.16 µg/mL (Taslimi vd., 2020), *Actinidia deliciosa* için ise IC₅₀ değeri 40.0 µg/mL (Bursal ve Gulcin, 2011), kurkumin için IC₅₀ değeri 34.5 µg/mL olarak (Ak ve Gülçin, 2008), L-adrenalin için IC₅₀ değeri 15.6 µg/mL (Gülçin, 2009), resveratrol için ise IC₅₀ değeri 9.5 µg/mL (Gülçin, 2010b), eugenol için IC₅₀ değeri 10.04 µg/mL (Gülçin, 2010a) olarak bulunmuştur. Tez çalışmamız kapsamındaki puerarine ait IC₅₀ hesaplanamadı. Konsantrasyonlar arasındaki azalış ve standart sapmalarda kararsızlık tespit edildi. Bu nedenle sütun grafiği Şekil 14'te verildi. Tablo 6'da 20 mg/mL konsantrasyondaki DMPD radikal giderme aktivitelerine ait % inhibisyonları verildi. Standartlardan daha düşük giderme sergiledi.

Ellman metoduna göre AChE ve BChE'nin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır (Ellman vd., 1961). Çalışma kapsamında puerarinin inhibisyon çalışması esterase aktivite yöntemlerine göre farklı inhibitör konsantrasyonunda ve 412 nm'de yapıldı. Bu yöntem AChE ve BChE yöntemlerinde pozitif kontrol olarak kullanılan takrin molekülü içinde yapıldı. Sonra grafikleri çizilip IC₅₀ değerleri hesaplandı ve K_i hesaplamaları yapıldı Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. AChE ve BChE enzimleri için puerarin ve takrinin karşılaştırılması

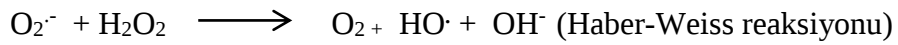
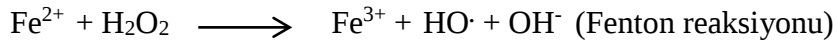
Enzimler	Puerarin (nM)		Takrin (nM)	
	IC ₅₀	K _i	IC ₅₀	K _i
AChE	177.73	60.87±5.29	239.02	133.91±18.98
BChE	315.07	183.82±19.75	407.73	369.58±25.48

AChE ve BChE enzim antioksidanlarında Alzheimer hastalığı için kullanılan etken bir madde olan takrin ile de çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda puerarinin AChE enzim aktivitesinde IC₅₀ değeri 177.73 µg/mL iken, takrinde bu değer 239.02 µg/mL olarak bulunmuştur. BChE enzim aktivitesinde ise çıkan sonuçların IC₅₀ değerleri puerarin için 315.07 µg/mL iken, takrinin ise 407.73 µg/mL olduğu gözlenmiştir. Elde edilen ölçüm sonuçlarını kıyasladığımızda puerarinin takrine göre daha etkili sonuç verebileceği ortaya konmuştur. Dolayısıyla bu çalışmamızın nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde farklı bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiş olduk.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Esansiyel metallere olan bakır insan fizyolojisi için büyük önem taşır ve yaşam için gereklidir. Yorgunluk ve halsizlik durumlarında ilk akla gelen bakır eksikliğidir. Bağırsaklarda demirin emilimi için bakıra ihtiyaç duyulmaktadır. Bakır konsantrasyonundaki düşüşler demir emilimi de azaltmaktadır. Böyle bir durumda da dokulara yeterli oksijen taşınamamakta ve demir eksikliği anemisi görülmektedir (Siotto ve Squitti, 2018).

Alzheimer hastalığının bakır (Cu) dengesizliği ile ilgili yapılan bir çalışmada Alzheimer hastalığının gelişiminde serbest bakır olarak bilinen (nCu-Cu) seruloplazmine bağlı olmayan serum Cu daki artışın bilişsel bozulmayla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bakır homeostazı vücudumuzda hassas bir şekilde düzenlenir ve değişebilir. nCu-Cu'nun genişlemesi, sayısız biyolojik yolu etkileyen bu homeostazın bozulmasının belirtisidir. Bakır yapısal olarak enzimlere bağlı değilse veya proteinler tarafından koordine edilmezse Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları yoluyla serbest radikal oluşumu gerçekleşmiş olur. İnsan serum albumini en bol bulunan serum proteini aynı zamanda seruloplazmin içerisinde en çok bulunan ana proteindir. İnsan serum albumini kanda dolaşan diğer bakır molekülleri ile denge halindedir. Dolaşımdaki serbest moleküller bu dengeyi bozduğunda Alzheimer hastalığının seyri hızlanmaktadır. Çalışmanın sonucunda Alzheimer hastalarının beyinlerindeki Cu metal seviyesinin azalmasının bu hastaların kanında nCu-Cu seviyesinin arttığını ortaya çıkarmıştır. İnsan serum albumini proteini antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır.



Bakır, ROS oluşumunda etkili bir element olarak tespit edilmiştir. Alzheimer hastalığında bakır seviyesi arttığı yapılan deneysel çalışmalarla belirlenmiştir (Sevim vd., 2007). Bununla beraber bakır konsantrasyonundaki artış radikal seviyesinde artıracığından çalıştığımız molekülün hem antioksidan hem de bakır düzeyini indirgeyici etkiye sahip olması metabolik açıdan oldukça önemlidir.

Öte yandan mitokondriyal işlev bozukluğu terimleri biyoenerjetik ve hücre biyolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mitokondrinin baskın fizyolojik işlevi, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP'nin üretilmesidir. Fakat ek işlevler arasında reaktif oksijen türlerinin üretimi ve detoksifikasyonu, bazı apoptoz biçimlerine katılım, sitoplazma ve mitokondri matris kalsiyumunun düzenlenmesi, metabolitlerin sentezi ve katabolizması

yer alır. Hücre içindeki bu süreçlerin herhangi birindeki anormallik mitokondriyal disfonksiyon (MD) olarak adlandırılabilir (Brand ve Nicholls, 2011). Mitokondri oksidatif hasara uğrayan organellerin başındadır. Çünkü asıl oksidasyon reaksiyonları burada gerçekleşir. MD, vücutta özellikle yağ doku, karaciğer ve iskelet kasında gelişmektedir. MD'ye neden olan birçok faktör gösterilmektedir. Bunların başında yağlı beslenme gelmektedir. ROS seviyesindeki artış, metabolik gen ekspresyonunun baskılanması ve yağ asidi oksidasyonunun tamamlanamaması MD'ye neden olan etmenler arasındadır. MD'nin neden olduğu ROS seviyesindeki artış metabolizmada mevcut antioksidan sistemi etkisiz hale getirerek radikal seviyesinde artışa yol açar (Gürdöl, 2018). Oksijeni kullanan ve metabolik hızı yüksek olan organlardan biri de beyindir. Bu nedenle ROS üretiminin en fazla olduğu organdır. Alzheimer hastalığında da oksidatif hücre hasarının fazla olduğu hatta MD'nin özellikle hastalığın ilk evrelerinde görüldüğü bildirilmiştir (Akkaya, 2015).

Bu nedenle yapılan tez çalışmamızda AChE ve BChE enzimleri üzerine puerarinin etkisi de incelendi. Alzheimer hastalarının tedavisinde kullanılan ve etkili moleküllerden biri olarak takrin toksik etkileri nedeniyle kullanımında sınırlandırmalar mevcuttur. Bizde doğal bir kimyasal ürün olarak puerarinin hem antioksidan hem de etkili bir enzim inhibitörü olacağını elde ettiğimiz sonuçlarla bilim dünyasına sunmaktayız. Tablo 7'de verilen sonuçlara göre Puerarin molekülü için AChE enzime ait IC_{50} değeri 177.73 nM iken, Takrin molekülü için bu değer 239.02 nM olarak hesaplanmıştır. Her iki molekülde hem AChE enzimi için hem de BChE enzimi için yarışmalı inhibisyon sergilemiştir. Yine puerarin bileşiği BChE enzime ait IC_{50} değeri 315.07 nM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca puerarin için yapmış olduğumuz Tablo 5'te elde edilen sonuçlara göre bakır indirgemedede etkili indirgeyici ajan olarak rol oynamıştır.

Böylece puerarin molekülü ile hem iyi bir antioksidan hem de henüz tam bir tedavisi elde edilememiş Alzheimer hastalığını önlemede alternatif bir ürün belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların ile kanser, Parkinson, Alzheimer, hücre hasarı başta olmak üzere toplumda yaygın ve tedavisi zor olan birçok hastalığı önlemek için yapılan tıbbi ve farmakolojik uygulamalara rehberlik edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Adam, B. ve Yiğitoğlu, M. R. (2012). *Tıbbi biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 52-549.
- Ak, T. ve Gülçin, İ. (2008). Antioxidant ve radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akkaya, Ç. (2015). *Alzheimer hastalarında oksidatif DNA hasarı ve redoks statüsünün değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (431786)*.
- Alaşehirli, B. (2005). Kolinesteraz inhibitörleri (antikolinesterazlar). *International Journal of Medical Sciences*, 1, 47-57.
- Ame, S. N., Shigrenaga, M. K. ve Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922.
- Amundsen, E. S. ve Nese, G. (2009). Integration of tradable green certificate markets: What can be expected. *Journal of Policy Modeling*, 31(6), 903-922.
- Annakkaya, P. (2012). *Turna yemişi (Vaccinium macrocarpon) ve mersinin (Myrtus Communis) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (312918)*.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Erça, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity ve polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Science ve Nutrition*, 57, 292-304.
- Arosio, B., Gagliano, N. ve Fusaro, L. M. P. (2000). Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acut liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology ve Toxicology*, 87, 229-233.
- Arvaniti, O. S., Samaras, Y., Gatidou, G., Thomaidis, N. S. ve Stasinakis, A. S. (2019). Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Research International*, 119, 244-267.
- Bacanlı, M., Anlar, H. G., Başaran, A. A. ve Başaran, N. (2017b). Does puerarin have genotoxic properties on mammalian cell lines? *The Turkish Journal of Occupational/Environmental Medicine ve Safety*, 2(1), 22.

- Bekris L. M., Yu C. E., Bird, T. D. ve Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23, 213-27.
- Bhatta, S., Ratti, C., Poubelle, P. E. ve Stevanovic, T. (2018). Nutrients, antioxidant capacity and safety of hot water extract from sugar maple (*Acer saccharum* M.) and red maple (*Acer rubrum* L.) bark. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 25-33.
- Bingol, Z., Kızıldaş, H., Gören, A. C., Kose, L. P., Topal, M., Durmaz, L., . . . Gülçin, İ. (2021). Antidiabetic, anticholinergic and antioxidant activities of aerial parts of shaggy bindweed (*Convolvulus betonicifolia* Miller subsp.)-profiling of phenolic compounds by LC-HRMS. *Heliyon*, 7(5), 1-9.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Boyer, P. D. ve Sigman, D. (1990). *Mechanisms of Catalysis*: Academic Press.
- Brand, M. D. ve Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297-312.
- Bursal, E. ve Gülçin, İ. (2011). Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44(5), 1482-1489.
- Bursal, E., Taslimi, P., Gören, A. C. ve Gülçin, İ. (2020). Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101711.
- Burunkaya, B., Selli, S. ve Kelebek, H. (2020). Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Fenoliklerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antimikrobiyal Potansiyelinin Belirlenmesi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 36(2), 309-324.
- Chatonnet, A. ve Lockridge, O. (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, 260(3), 625.
- Chaudiere, J. ve Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular Antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food ve Chemical Toxicology*, 37, 949-962.
- Cucuianu, M. ve Popescu, T. A. (1968). Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. *Clinica Chimica Acta*, 22(2), 151-155.
- Cutz, C., Bonert, M. ve Major, P. (2018). Biphasic alteration of butyrylcholinesterase (BChE) during prostate cancer development. *Translational Oncology*, 11(4), 1012-1022.
- Cakmak, K. C. ve Gülçin, İ. (2019). Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-An activity-structure insight. *Toxicology Reports*, 6, 1273-1280.

- Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9 (1), 73-83.
- Çelebi, Ç. (2010). *Fesleğenin (Ocimum basilicum) fenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (284988).*
- Çinkılıç, S. (2009). *Mayıs papatyasının (Matricaria chamomilla) antioksidan kapasitesinin incelenmesi ve toplam fenolik bileşik tayini. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (251240).*
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. ve Masella, R. (2007). Polyphenols, Dietary Sources ve Bioavailability, *Annali- Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348-361.
- Dave, K. R., Syal, A. R. ve Katyare, S. S. (2000). Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 100-108.
- David, G., Wilkinson, P. T., Schwam, E. ve Parrish, J.P. (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer's disease. the relationship between pharmacological effects ve clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 453-478.
- Davies, K. J. A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 61, 1-31.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289.
- Demir, H. ve Turkoglu, V. (2005). Effects of neostigmine methylsulphate on enzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plazma, muscle ve liver *in vivo*. *Scveinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 32, 25-30.
- Dincel, D., Hatipoğlu, S. D., Gören, A. C. ve Topcu, G. (2013). Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. *Turkish Journal of Chemistry*, 37(4), 675-683.
- Diplock, A. T. (1998). Defence against reactive oxygen species. *Free Radical Research*, 29(6), 463-467.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. ve Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ersoy, N., Bağcı, Y., Askın, M. A. ve Kazaz, S. (2011). Erkenci nektarın, şeftali ve kayısı çeşitlerinin bazı fiziko-kimyasal özellikleri ve antioksidan kapasiteleri. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 25(2), 64-69.

- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. ve Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1035-1040.
- Frankel, E. N. (1998). Lipid Oxidation. Dundee, Scotlve: *The Oily Press LTD*.
- Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. ve Apak, R. (2005). Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper (II)-neocuproine reagent in beverages ve pharmaceutical. *Talanta*, 65 (5), 1226-1232.
- Gürdöl, F. (2018). Fazla Yağlı Beslenme ve Mitokondri Disfonksiyonu. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(2), 13-16.
- Goulart, M., Batore'u, MC., Rodriguez, A.S., Laires, A. ve Rueff, J. (2005). Lipoperoxidation products ve thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 20, 311-315.
- Göçer, H. (2014). *Sinefrin ve fenilefrin: Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (352127).*
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *Journal of Fisheries ve Aquatic Sciences*, 23, 85-89.
- Gu, Y., Lin, X., Kapoor, A., Li, T., Major, P. ve Tang, D. (2021). Effective Prediction of Prostate Cancer Recurrence through the IQGAP1 Network. *Cancers*, 13(3), 430.
- Gulcin, I., Kaya, R., Goren, A. C., Akincioglu, H., Topal, M., Bingol, Z., . . . Alwasel, S. (2019). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1511-1526.
- Gülçin, İ., Alici, H. A. ve Cesur, M. (2005). Determination of in vitro antioxidant ve radical scavenging activities of propofol. *Chemical ve Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M. ve Aboul-Enein, H. Y. (2007). Determination of antioxidant ve radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21, 354-361.
- Gülçin, İ. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin ve serotonin by the DMPD ve CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition ve 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., Huyut, Z., Elmastaş, M. ve Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu H. M., Bilsel, M. ve Gören, A.C. (2010a). Polyphenol contents ve antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum. *Turkey, Food ve Chemical Toxicology*, 48, 2227-2238.
- Gülçin, İ., Kireççi, E., Akkemik, E., Topal, F. ve Hisar, O. (2010b). Antioxidant ve antimicrobial activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Biology*, 34, 175-188.
- Gülçin, İ. (2011). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ. (2020). Antioxidants ve antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651-715.
- Haigh, R. (1986). Safety ve necessity of antioxidants. *Food ve Chemical Toxicology*, 24, 1031-1036.
- Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4), 569-605.
- Halliwell, B. (1996). Oxidative stres, nutrition ve health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25, 57-74.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç. ve Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity ve proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111, 400- 407.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). *Biyokimya*, Aktif Yayın Evi, ISBN 975-6755-20-02, Erzurum, 217s.
- Koczka, N., Stefanovits-Bányai, É. ve Ombódi, A. (2018). Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species. *Medicines*, 5(3), 84.
- Köksal, E. ve Gülçin, İ. (2008). Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(1), 65-78.
- Kör, S. (2014). *Postprandiyal lipemi ile eritrosit membran kolesterol düzeyi arasındaki ilişkinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (359349).*
- Köksal, D., Strähle, J., Müller, M. ve Freise, M. (2017). Social sustainable supply chain management in the textile and apparel industry-A literature review. *Sustainability*, 9(1), 100.

- Krishnaiah, C., Reddy, A. R., Kumar, R. ve Mukkanti, K. (2010). Stability-indicating UPLC method for determination of Valsartan and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), 483-489.
- Kutlu, M., Poyraz, I. ve Özata, A. (2000). Effects of lead and some ions on the activity of Glutathione reductase in *Gammarus pulex*. *ACTA Pharmaceutica Scientia*, 42(4), 159-165.
- Lee, S., Decker, E. A., Faustman, C. ve Mancini, R. A. (2005). The effects of antioxidant combinations on color ve lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70, 683-689.
- Leonard, N. (2000). Stability testing of nutraceuticals and functional foods. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods; CRC Press: Boca Raton, Fl, USA*.
- Lotti, M. (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41, 1814-1818.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. ve Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity ve its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.
- Nachmansohn, D. (1952). *In Modern Trends in Physiology. Biochemistry*. Academic Press. New York. 229.
- Namitha, K. K. ve Negi, P. S. (2010). Chemistry ve biotechnology of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science ve Nutrition*, 50(8), 728-760.
- Nizamlioğlu, N. ve Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özler, E. (2021). *Sarı halile (Terminalia citrina roxb. ex. fleming) türünün antioksidan kapasitesinin ve fenolik içeriklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (668134)*.
- Pakiari, A., Farrokhnia, M. ve Moradshahi, A. (2010). Quantum chemical analysis of ATP, GTP ve related compounds in gas phase. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7 (1), 51-58.
- Pokorny, J. (1999). *Antioksidants in food preservation. Handbook of food preservation*. CRC Press, ISBN 978-1-57444-606-7, New York. 309-337s.
- Prieto, P., Pineda, M. ve Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:

- Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bioology ve Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reyes-Carmona, J., Yousef, G. G., Martínez-Peniche, R. A ve Lila, M. A. (2005). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus sp.*) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*, 70(7), 497-503.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J. ve Paganga, G. (1997). Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Rizvi, S., Raza S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S. ve Mahdi, F. (2014). The role of vitamin e in human health ve some diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14 (2), 157-165.
- Roginsky, V. ve Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments ve colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.
- Semiz, B., Çoban, H., Roden, M. F., Özpınar, Y., Flower, M. F. ve McGregor, H. (2012). Mineral composition in cognate inclusions in Late Miocene-Early Pliocene potassic lamprophyres with affinities to lamproites from the Denizli region, Western Anatolia, Turkey: implications for uppermost mantle processes in a back-arc setting. *Lithos*, 134, 253-272.
- Sevim, S., Ünal, Ö., Tamer, L., Doğu, O. ve Özge, A. (2007). Normalden farklı bakır ve çinko düzeyleri Alzheimer Hastalığı için bir belirteç olabilir mi? *Journal of Neurological Sciences (Turkish)*, 24(3), 197-205.
- Siotto, M. ve Squitti, R. (2018). Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin plays. *Coordination Chemistry Reviews*, 371, 86-95.
- Soreq, H. ve Zakut, H. (1993). Human acetylcholinesterases ve anticholinesterases. *The American Society of Human Genetics*, 55, 593-594.
- Taslimi, P., Köksal, E., Gören, A. C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., . . . Gülçin, İ. (2020). Anti-alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(3), 4528-4537.

- Telkoparan Akillilar, P., Tuglu, Y. B. ve Shomali Moghaddam, N. (2018). Anticancer, antioxidant properties and phenolic, flavonoid composition of *Heracleum platytaenium* plant methanolic extracts. *Marmara Pharmaceutical Journal* 22(3), 396-404.
- Temel, H.E. (2008). *Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi. Doktora tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (225218).*
- Topal, F. (2009). *İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine bazı kemoterapi ilaçların etkilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (238036).*
- Topal, F. (2019). Anticholinergic and antidiabetic effects of isoeugenol from clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 583-592.
- Topal, M. (2014). *Bazı Kinizarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleriüzerine İnhibisyon Etkileri. Doktora tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (352130).*
- Topal, F. (2014). *Bazı eugenol türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (361157).*
- Topal, M. (2020). Secondary metabolites of ethanol extracts of *Pinus sylvestris* cones from Eastern Anatolia and their antioxidant, cholinesterase and α -glucosidase activities. *Records of Natural Products*, 14(2), 129-138.
- Topal, M., Ozturk Sarıkaya, S. B. ve Topal, F. (2021). Determination of *angelica archangelica*'s antioxidant capacity and mineral content. *Chemistryselect*, 6(31), 7976-7980.
- Van Outersterp, R. (2016), Structural characterization ve activation of nature's fuels of life. *Student Undergraduate Research E-journal*, 2,
- Wilson, I., Nachmansohn, D. ve Edward, R. (1954). Ion transport across membranes. *Acedemic Pres Inc., New York*. 35s.
- Yavaşer, R. (2011). *Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi, Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi, (300122).*
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G. ve Tavili, A. (2019). Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15.

Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M. H., . . . Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves. *Food chemistry*, 190, 673-680.



ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimini Ordu ili Gököy ilçesi Damarlı Beldesinde, Lise öğrenimi ise Ordu/Merkez' de tamamladı. 2006 yılında kazandığı Giresun Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünden 2010 yılında mezun oldu ve 2012 yılında Samsun Terme Oğuzlu Ortaokuluna atandı. Daha sonra 2014 yılında Gümüşhane Merkez Gazipaşa Ortaokuluna tayin oldu ve halen orada çalışmaya devam etmektedir. 2019-2020 Eğitim-Öğretim yılında Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir. Evli ve iki kız çocuk annesidir.

