# BAZI FENOLİK DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Müşerref Hilal ŞEHİTOĞLU**

**Doktora Tezi**
**Kimya Anabilim Dalı**
**Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN**
**2012**
**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

# BAZI FENOLİK DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Müşerref Hilal ŞEHİTOĞLU**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZURUM**
**2012**

**Her Hakkı Saklıdır**

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

## TEZ ONAY FORMU

**BAZI FENOLİK DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I ve hCA-II) ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Müşerref Hilal ŞEHİTOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma ..17.../12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Başkan | : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU | *İmza* | : |
| Üye | : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI | *İmza* | : |
| Üye | : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR | *İmza* | : |
| Üye | : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN | *İmza* | : |
| Üye | : Doç. Dr. İhsan Güngör ŞAT | *İmza* | : |

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan **EFEOĞLU**
**Enstitü Müdürü**

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

# ÖZET

Doktora Tezi

BAZI FENOLİK DOĞAL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

M. Hilal ŞEHİTOĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu çalışmada apomorfin, timol ve humik asitin fenolik doğal bileşiklerin muhtemel antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri değerlendirildi. Ayrıca bu fenolik doğal bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi I ve II (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkileri de incelendi.

Fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivitesi, 2,2´-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit) radikal ($ABTS^{\bullet+}$) giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal ($DPPH^{\cdot}$) giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal ($DMPD^{\bullet+}$) giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivitesi, potasyum ferriksiyanit indirgeme metodu ile indirgeme kuvveti, Kuprak metodu ile kuprik iyonları ($Cu^{2+}$) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi ve ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi çalışıldı. Ayrıca BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi referans antioksidanlar kullanıldı. Kullanılan fenolik bileşikler bütün metotlarda kuvvetli antioksidan ve radikal giderme aktivitesi sergilediler.

Ayrıca çalışmanın ikinci kısmında ise fenolik doğal bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimi I ve II (hCA-I ve hCA-II) üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırıldı. Öncelikle hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla Sepharose-4B-L-tirozin afinite kolon kromatografisi ile %59,4, %65,9 verimle 194,5 ve 832,4 kat saflaştırıldı. Enzim saflığını belirlemek için, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve tek bant gözlendi. Bundan sonra $I_{50}$ değerlerini bulmak için, hidrataz aktivitesi kullanılarak fenolik doğal bileşiklerin hCA-I ve hCA-II üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Ayrıca fenolik doğal bileşiklerin hCA-I ve hCA-II üzerine inhibisyon etkileri 4-nitrofenil asetat substratı ile esteraz aktivite metodu kullanılarak da araştırıldı. Apomorfin, timol ve humik asitin hCA-I için 20,5-457,0 μM ve hCA-II için de 61,0–584,0 μM arasında $K_i$ değerlerine sahip oldukları gözlendi. Hümik asit hCA-I için yarışmalı inhibisyon gösterirken, hCA-II için yarışmasız inhibisyon gösterdi. Diğer fenolik bileşikler apomorfin ve timol (hCA-I, II için) 4-nitrofenil asetat substratı ile yarışmasız inhibisyon gösterdiler. Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşikler klinik olarak kullanılan süfanilamit ve asetazolamide benzer inhibisyon etkisi gösterdiler. Bu inhibitörler antioksidan özelliklerinden dolayı hCA-I ve hCA-II için daha güvenli olarak kullanılabilir.



**2012, 171 sayfa**

**Anahtar kelimeler**: Antioksidan aktivite, karbonik anhidraz, fenolik doğal bileşik, hCA-I, hCA-II, enzim inhibisyonu

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATON OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF SOME FENOLIC NATUREL COMPOUNDS and INVESTIGATION OF THEIR INHIBITON EFFECTS ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA-I and hCA-II)

M. Hilal ŞEHİTOĞLU

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

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In the present study, some phenolic naturel compounds such as apomorphine, thymol and humic acid were evaluated for possible antioxidant and radical scavenging activity. Also the inhibitory effects of these phenolic compounds were determined on human erythrocyte izoenzymes I and II (hCA-I and hCA-II).

In order to evaluate antioxidant capacity of phenolic compounds, different *in vitro* methods such as total antioxidant activity by ferric thiocyanate method, 2,2´-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical ($ABTS^{\bullet+}$) scavenging activity, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical ($DPPH^{\cdot}$) scavenging activity, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine radical ($DMPD^{\bullet+}$) scavenging activity, superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) scavenging activity, reducing power by potassium ferricyanide reduction method, cupric ion ($Cu^{2+}$) reduction capacity by Cuprac method, reducing capacity by FRAP method and ferrous ions ($Fe^{2+}$) chelating activities were performed separately. Also, BHA, BHT, α-tocopherol and trolox, a water-soluble analogue of α-Tocopherol, were used as the reference antioxidant compounds. The phenolic compounds exhibited powerfull antioxidant and radical scavenging effects in used all methods.

Also in the second part of this study, the *in vitro* inhibition effects of these phenolic compounds on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (hCA-I and hCA-II) from human blood were investigated. Firstly, hCA-I and hCA-II were purified by Sepharose-4B-L-tyrosine affinity chromatography column with a yield of 59.4, 65.9%, 194.5 and 832.4-fold purification of each isoenzyme, respectively. For determination of enzyme purity, SDS-PAGE was performed and single band was observed. For determination of $I_{50}$ values of these phenolic compounds were investigated by using hidratase assay.The inhibition of hCA-I and hCA-II, with a series of phenolic compounds was investigated by using the esterase assay with 4-nitrophenyl acetate as substrate. These phenolic compounds showed $K_i$ values in the range of 20.5-457.0 μM for hCA I and of 61.0-584.0 μM against hCA-II. Humic acid exhibited competitive inhibitory effect for hCA-I, but for hCA II, exhibited non-competitive inhibitory effect. Apomorphine and thymol were found as non-competitive inhibitors with 4-nitrophenylacetate as substrate for hCA I and hCA II. These phenolic compounds demonstrated effective hCA-I and hCA II inhibition in the same range as the clinically used sulfonamide and acetazolamide and can be used safer for hCA I and hCA II izoenzymes due to their antioxidant properties.



**2012, 171 pages**

**Keywords:** Antioxidant activity, Carbonic anhydrase, phenolic naturel compound, hCA-I, hCA-II, enzyme inhibition

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, manevi olarak bana güç veren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümün bütün imkanlarını benden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye ve Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuar çalışanı arkadaşlarım Fevzi TOPAL, Meryem NAR, Uzm. Hülya GÖÇER, Pınar ANNAKKAYA, Hatice HAN ve Biyokimya Araştırma Laboratuarında çalışan diğer bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Doktora sürecimde maddi destek sağlayan TUBİTAK / BİDEB'e ve her daim bizlerle ilgilenen değerli çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca zor günlerimde beni yalnız bırakmayan kardeşlerim Şeyma ve Şeyda'ya ve bugüne kadar benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana hem annelik hem babalık yapan, hayat tecrübelerinden yararlandığım canım annem Fatma ŞEHİTOĞLU'na gösterdikleri destek, sabır ve anlayışlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

M.Hilal ŞEHİTOĞLU
Aralik, 2012

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....xiv
**1. GİRİŞ.....1**
1.1. Karbonik Anhidraz (CA).....5
1.1.1. Karbonik Anhidrazın dağılımı ve fizyolojik önemi:.....5
1.1.2. Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar.....9
1.1.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....11
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar.....12
1.2.1. Serbest radikaller ve etkileri.....12
1.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS).....13
1.2.3. Serbest oksijen radikallerinin etkileri.....19
1.2.3.a. Serbest radikallerin Lipitlere etkileri.....19
1.2.3.b. Serbest radikallerin Proteinlere etkileri.....22
1.2.3.c. Serbest radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya etkileri.....23
1.2.3.d. Serbest radikallerin Karbohidratlara etkileri.....23
1.2.4. Antioksidan savunma sistemleri-Antioksidanlar.....23
1.2.5. Fenolik bileşikler.....33
1.2.5.a. Hümik Asit.....37
1.2.5.b. Timol.....39
1.2.5.c. Apomorfin.....40
1.3. Çalışmanın amacı.....41
**2. KAYNAK ÖZETLERİ.....45**
**3. MATERYAL ve YÖNTEM.....49**
3.1. Materyal.....49
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....49

3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar ..... 49
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması ..... 50
3.1.3.a. $Fe^{3+}$-$Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 50
3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 50
3.1.3.c. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler ..... 51
3.1.3.d. Bipiridil reaktifi ile metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler ..... 51
3.1.3.e. Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 52
3.1.3.f. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler ..... 52
3.1.3.g. $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 52
3.1.3.h. $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 53
3.1.3.i. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 53
3.1.3.j. Total antioksidan aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler ..... 54
3.1.3.k. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler ..... 55
3.1.3.l. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler . 56
3.2. Antioksidan çalışmaları ..... 58
3.2.1. $Fe^{3+}$-$Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi ..... 58
3.2.2. $Cu^{2+}$-$Cu^{+}$ indirgeme kapasitesi -Kuprak metodu ..... 58
3.2.3. FRAP indirgeme kapasitesi ..... 58
3.2.4. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi ..... 59
3.2.5. Ferröz İyonları ($Fe^{+2}$) şelatlama aktivitesi ..... 59
3.2.6. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivitesi ..... 59
3.2.7. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikallleri giderme aktivitesi .... 60
3.2.8. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi ..... 60
3.2.9. N,N´-dimethil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi ..... 61
3.2.10. Total antioksidan aktivitesi ..... 61
3.4. Enzim Saflaştırma Çalışmaları ..... 62
3.4.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması ..... 62
3.4.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar .... 62
3.4.2.a. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanması ..... 62
3.4.2.b. Afinite kolonunun paketlenmesi ..... 65

3.4.2.c. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu ..... 65
3.5. CA Enzim Aktivitesi Tayini ..... 65
3.5.1. Hidrataz aktivitesi ..... 65
3.5.2. Esteraz aktivitesi ..... 66
3.6. Protein Tayini ..... 68
3.6.1. Kalitatif protein tayini ..... 68
3.6.2. Kantitatif protein tayini ..... 69
3.7. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar ..... 69
3.7.1. Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar ..... 69
3.8. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü ..... 70
3.9. hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Fenolik Doğal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesi ..... 71
**4. ARAŞTIRMA BULGULARI ..... 72**
4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları ..... 72
4.1.1. $Fe^{3+}$- $Fe^{2+}$ indirgeme kuvveti bulguları ..... 72
4.1.2. Kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) kupröz iyonlarına ($Cu^{+}$) indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları ..... 73
4.1.3. Ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kuvveti (FRAP metodu) bulguları ..... 74
4.1.4. Bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi bulguları ..... 76
4.1.5. Ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi bulguları ..... 77
4.1.6. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları ..... 79
4.1.7. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları ..... 80
4.1.8. ABTS serbest radikal giderme aktivitesi bulguları ..... 83
4.1.9. DMPD serbest radikal giderme aktivitesi bulguları ..... 86
4.1.10. Total Antioksidan aktivitesi bulguları ..... 88
4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışma Bulguları ..... 91
4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik ..... 91
4.2.2. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması Sonuçları ..... 92
4.2.3. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları ..... 93

4.2.4. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları ..... 94
4.2.5. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları ..... 95
4.2.5.a. Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmaların sonuçları ..... 95
4.2.6. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine doğal fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları ..... 97
4.2.6.a. hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları ..... 97
4.2.6.b. hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları ..... 98
4.2.6.c. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerin $[I]_{50}$ değeri sonuçları ..... 99
4.2.6.d. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları ..... 100
4.2.6.e. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları ..... 104
**5. TARTIŞMA ve SONUÇ ..... 109**
KAYNAKLAR ..... 152
ÖZGEÇMİŞ ..... 172

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| ABTS | 2,2´-Azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) |
| $ABTS^{\bullet+}$ | 2,2´-Azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) radikali |
| BHA | Bütillenmiş hidroksianisol |
| BHT | Bütillenmiş hidroksitoluen |
| CA | Karbonik anhidraz enzimi |
| DMPD | N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür |
| $DMPD^{\bullet+}$ | N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür radikali |
| DPPH | 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil |
| DPPH• | 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali |
| DPPH-H | İndirgenmiş 1,1-difenil 2-pikril hidrazil |
| E.Ü. | Enzim Ünitesi |
| hCA-I | İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi |
| hCA-II | İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi |
| HAT | Hidrojen atom transfer |
| $I_{50}$ | Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu |
| $K_i$ | Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti |
| $K_m$ | Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi |
| LOO• | Lipit peroksit radikali |
| LOOH | Lipit hidroperoksit |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| ROS | Reaktif oksijen türleri |
| S | Substrat |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SET | Tek elektron transfer |
| V | Enzimatik reaksiyon hızı |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametilendiamin |
| TCA | Triklorasetik asit |
| Tris | Trihidroksimetil amino metan |
| Troloks | 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1.1.** Afinite kromatografisinin prensibi ..... 4
**Şekil 1.2.** $CO_2$'in farklı açılara sahip piramidal yapıda $H_2CO_3^-$'e kendiliğinden dönüşümü ..... 10
**Şekil 1.3.** Karbonik anhidrazın katalizlediği $CO_2$-hidrataz mekanizması ..... 10
**Şekil 1.4.** Radikal olmayan reaktif oksijen molekülü ..... 13
**Şekil 1.5.** Reaktif oksijen türleri oluşumu ..... 13
**Şekil 1.6.** Glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz enzim sistemi ..... 19
**Şekil 1.7.** Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu ..... 20
**Şekil 1.8.** Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması ..... 27
**Şekil 1.9.** Katekolün peroksil radikalleriyle reaksiyon mekanizması (HAT ve SET esasına göre). ..... 31
**Şekil 1.10**. Flavonoitlerin genel yapısı ..... 34
**Şekil 1.11.** Fenoliklerin biyosentezi ..... 35
**Şekil 1.12.** Fenol radikalinin rezonans yapıları ..... 36
**Şekil 1.13.** Hümik asidin açık yapısı ..... 38
**Şekil 1.14.** 5-Metil-2-izopropilfenol (timol)'ün açık yapısı ..... 39
**Şekil 1.15.** Apomorfinin açık yapısı ..... 40
**Şekil 3.1.** CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları ..... 64
**Şekil 3.2.** *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması ..... 67
**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) doğal fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 72
**Şekil 4.2.** Fenoliklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 74
**Şekil 4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetlerinin (FRAP) birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 75

**Şekil 4.4.** Fenolik doğal bileşiklerin (30 μg/ml) bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 77
**Şekil 4.5.** Fenolik doğal bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 μg/ml) metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 78
**Şekil 4.6.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşik çözeltilerinin (10–30 μg/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... 79
**Şekil 4.7.** DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği ..... 81
**Şekil 4.8.** Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μg/ml) DPPH radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 82
**Şekil 4.9.** ABTS$^{\cdot}$nin açık kimyasal yapısı ..... 83
**Şekil 4.10.** $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayininde kullanılan $ABTS^{\bullet+}$ için hazırlanan standart grafik..... 84
**Şekil 4.11.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin (10-30 μg/ml) $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... 85
**Şekil 4.12.** $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik..... 87
**Şekil 4.13.** Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μg/ml) $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... 87
**Şekil 4.14.** Apomorfinin (10-30 μg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 89
**Şekil 4.15.** Timolün (10- 30 μg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 90

**Şekil 4.16.** Hümik asitin (10-30 μg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 90
**Şekil 4.17.** Coomassie Brillant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik ..... 92
**Şekil 4.18.** İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM $Na_2HPO_4$ pH:6,3 ve 0,1 M $NaCH_3COO$/0,5 M $NaClO_4$ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği (Kolon çapı 1,3 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml)..... 93
**Şekil 4.19.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı ..... 95
**Şekil 4.20.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..... 96
**Şekil 4.21.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA-II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..... 96
**Şekil 4.22.** hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda $I_{50}$ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği ..... 98
**Şekil 4.23.** hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda $I_{50}$ değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Hümik asit] grafiği ..... 99
**Şekil 4.24.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ iyonuna fenolik antioksidan inhibitörlerin bağlanma modeli ..... 100
**Şekil 4.25.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği ..... 101
**Şekil 4.26.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..... 101
**Şekil 4.27.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorfin] grafiği .. 102
**Şekil 4.28.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği ..... 102

**Şekil 4.29.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği.....103
**Şekil 4.30.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....103
**Şekil 4.31.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği..105
**Şekil 4.32.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....105
**Şekil 4.33.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorfin] grafiği..106
**Şekil 4.34.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....106
**Şekil 4.35.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği.....107
**Şekil 4.36.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....107
**Şekil 5.1.** FRAP metoduna göre $[Fe^{3+}\text{-}(TPTZ)_2]^{3+}$ - $[Fe^{2+}\text{-}(TPTZ)_2]^{2+}$ indirgenme sistemi .....112
**Şekil 5.2.** Bir antioksidan molekülü ile KUPRAK reaksiyonu.....115
**Şekil 5.3.** L-Karnitin ile ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) arasındaki öne sürülen metal şelatlama mekanizması.....118
**Şekil 5.4.** L-Adrenalinin bir ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak L-Adrenalin-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması .....119
**Şekil 5.5.** Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak kurkumin-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması.....120
**Şekil 5.6.** İki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak Rezveratrol-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması.....120
**Şekil 5.7.** Apomorfin ve timolün ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak oluşturduğu kompleks .....121
**Şekil 5.8.** Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi.....125
**Şekil 5.9.** L-Karnitin ile DPPH radikali arasında öne sürülen radikal giderme mekanizması.....125

**Şekil 5.10.** Konjuge gruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon ..... 126
**Şekil 5.11.** Bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluşumu ..... 128
**Şekil 5.12.** DPPH radikali ile kurkumin arasında önerilen reaksiyon mekanizması .... 128
**Şekil 5.13.** Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve L- adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu ..... 129
**Şekil 5.14.** Eugenol'ün DPPH radikal giderme mekanizması ve eşleme tepkimesiyle dehidrodieugenol oluşumu ..... 130
**Şekil 5.15.** Mono fenoller için muhtemel DPPH• radikali giderme mekanizması ..... 131
**Şekil 5.16.** $K_2S_2O_8$ ile ABTS'nin oksidasyonu mekanizması ..... 133
**Şekil 5.17.** Kararlı bir radikal olan $DMPD^{\bullet+}$'nin oluşum ve giderilme mekanizması .. 135
**Şekil 5.18.** Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin $NBT^{2+}$'yi formazana indirger ..... 138
**Şekil 5.19.** NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin $NBT^{2+}$'yi formazana indirger ..... 140
**Şekil 5.20.** 9-Hidroperoksi endoperoksit oluşturan α-linoleik asitten 12-hidroperoksit reaksiyonu ..... 144
**Şekil 5.21.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli ..... 149

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 1.1.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri ..... 9

**Çizelge 4.2.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik doğal bileşiklerin ferröz iyonlarının ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları ..... 78

**Çizelge 4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler ve standart antioksidanların süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinde $IC_{50}$ değerleri ..... 80

**Çizelge 4.4.** Fenolik bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması ..... 82

**Çizelge 4.5.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesinde $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları ..... 85

**Çizelge 4.6.** Fenolik bileşiklerin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırmaları ..... 88

**Çizelge 4.7.** Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların 30 μg/ml ve 60. saate karşılık gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri ..... 91

**Çizelge 4.8.** Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları ..... 94

**Çizelge 4.9.** hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ($I_{50}$ değerleri) ..... 99

**Çizelge 4.10.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin $K_i$ değerleri ve inhibisyon türleri ..... 104

**Çizelge 4.11.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin $K_i$ değerleri ve inhibisyon türleri.....108
**Çizelge 5.1.** Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin 20 µg/ml konsantrasyonunda ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ve kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kapasiteleri .....116
**Çizelge 5.2.** Standartlar ve fenolik doğal bileşiklere ait DPPH•, $ABTS^{+\bullet}$, $DMPD^{+\bullet}$ ve $O_2^{-\bullet}$ ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili $IC_{50}$ (µg/ml) değerleri..122
**Çizelge 5.3.** Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların 30 µg/ml ve 60. saate karşılık gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri .....145

# 1. GİRİŞ

Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2005). Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürün oluşumuna meydan vermeyen, %100 lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Örnek olarak canlı vücudunda karbonik anhidraz enzimi katalizörlüğünde bikarbonat iyonu ($HCO_3^-$) oluşumunun gerçekleşmesi verilebilir. Özelleşmiş bazı RNA moleküllerinin dışında bütün enzimler protein yapısındadır (Lehninger 1993; Gözükara 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2004). Proteinlerin en büyük ve en özel kısmını teşkil ederler. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısıyla ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın molekül sayısıdır. Katalaz 40.000.000 $s^{-1}$ ile turnover sayısı en yüksek olan enzim iken CA $10^6$ $s^{-1}$ ile ikinci en yüksek turnover sayısına sahip enzimdir (Fresht 1999; Söyüt 2006; Bülbül *et al.* 2006).

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere "izoenzim" denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. İzoenzimlere örnek olarak bu tez kapsamında çalışılacak karbonik anhidraz izoenzimleri verilebilir (Devlin 2002).

Enzimler isimlendirilirken genelde ya substrat adının sonuna “-az” eki getirilir veya ilk bulucularının ortaya attıkları isimle anılırlar. Örneğin, fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Ancak yaygın olarak kullanılan Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma ile verilen isimlerdir. Ayrıca her bir enzim için dört rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981).

Substrat denilen küçük moleküllere spesifik olarak bağlanan enzimler onları ürüne dönüştürürler. Kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar ve reaksiyonlara kontrol edilebilen bir hız kazandırırlar. Bu hız genelde $10^3$-$10^8$ $s^{-1}$ arasındadır (Champe and Harvey 1994; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimler katalitik aktiviteleri için kofaktör veya koenzim denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler enzime gevşek bağlıdır. Ancak bazıları kovalent bağlanırlar ki bu gruplara prostetik grup adı verilir. Örneğin, karbonik anhidraz enziminin yapısındaki $Zn^{2+}$ prostetik gruptur (Smith *et al*. 1985; Onat vd 1996; Beydemir and Gülçin 2004).

Enzimler protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Makromoleküller olmalarından dolayı sellofan ve kolodyum zarlarından geçemezler. Bundan dolayı ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar. Ayrıca asidik veya bazik ortamlara karşı da oldukça hassastırlar. Katalitik aktiviteleri gerekli olan sıcaklık genelde 30 ile $50^oC$'dir. Fakat bu sıcaklıkların üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona uğrarlar (Champe and Harvey 1997).

Enzimli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörler:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. Sıcaklık
5. İyonik şiddet
6. Kofaktör konsantrasyonu
7. İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu

Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedir (Söyler 2006). Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon

sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir.

Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

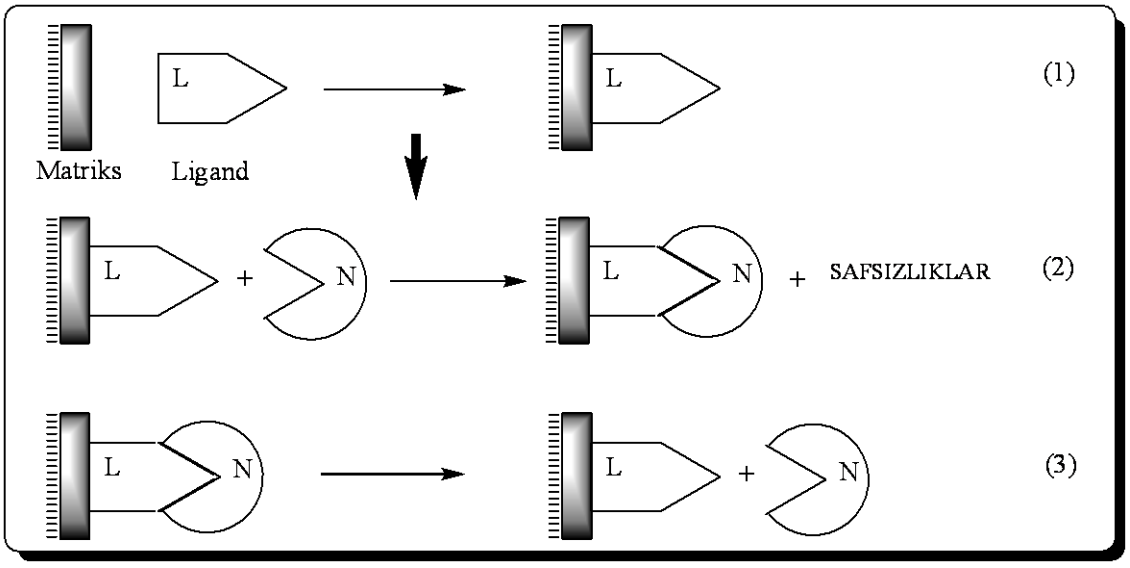
Kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonların hızları da sıcaklıkla değişmektedir. Tepkime hızının artması, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Ancak belli bir sıcaklığın üzerinde enzimin üç boyutlu yapısı bozulur, enzim inhibe olur ve reaksiyon hızında düşme gözlenir. Bir enzim için $10^{o}$C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı $Q_{10}$ değeriyle ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimler üzerinde en çok araştırma yapılan bir diğer önemli özellikte enzimlerin inhibisyonudur. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına enzim inhibisyonu, bu olaya neden olan bileşiklere de inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Birçok ilaç ve toksik madde, enzimler üzerinde inhibitör etkisi yapabilir ve inhibisyona neden olabilir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için oldukça önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu 2004). Daha önce de belirttiğimiz gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimlere de uygulanabilir.

Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan saflaştırılması oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000'in üzerinde enzim kısmen

saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Enzimlerin saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç vereni; spesifik ligandlar esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatografisi yöntemidir (Keha ve Küfrevioğlu 2004). Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, "matriks" adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Çiftçi ve Küfrevioğlu 2008). Kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak, bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabi şekillerini ayrımak ve kirletici büyük miktarlardan küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak amacıyla kullanılmaktadır.




**Şekil 1.1.** Afinite kromatografisinin prensibi

Şekil 1.1'de görüldüğü gibi ligand matrikse bağlanır (1), saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup safsızlıklar akar (2), numune elüe edilir (3) (Çiftçi ve Küfrevioğlu 2008). Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, ilk olarak Falkbring ve arkadaşları tarafından 1972 yılında gerçekleştirilmiştir.

## 1.1. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz (Karbonat hidroliyaz, CA, E.C.4.2.1.1), bütün organizmalarda bulunan $Zn^{2+}$ iyonu içeren bir metaloenzimdir. İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda $CO_2$'in hidratasyonunu ve $HCO_3^-$'ın dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2001; Nar 2011).

$$CO_2 + H_2O \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik $CO_2$ transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda $H^+$ ve $HCO_3^-$ birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bunlardan başka daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, histokimyasal metotlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, çeşitli bakteriler ve bitkisel kaynaktan saflaştırılmış ve birçok kaynaktan da karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al*. 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004; Çoban *et al.* 2009).

Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır.

### 1.1.1. Karbonik Anhidrazın dağılımı ve fizyolojik önemi:

Basta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynayan CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Doku/organlar ile akciğer arasındaki $CO_2/HCO_3^-$'ın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve $CO_2$ homeostazında, elektrolit

sekresyonunda, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al*. 2000; Supuran and Scozzafava 2000; Gülçin and Beydemir 2012).

CA, bitkilerde çoğunlukla kloroplastlarda ve az miktarda da sitozolde bulunur. Kloroplastlarda bulunan karbonik anhidraz, tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde bağlı CA olarak, stroma sıvısında çözünür halde bulunmaktadır. Bitki karbonik anhidraz enzimlerinin fonksiyonlarının lokalizasyonu ile yakından alakalıdır. Bu lokalizasyona bağlı olarak CA, fotosentez esnasında elektron transportuna katılır ve elektron transport zincirine elektron vericisi olan bikarbonat ($HCO_3^-$) iyonlarını sağlar (Patterson *et al*. 1971; Vaklinova *et al*. 1982; 1984).

Tilakoit membranlarında bağlı CA, elektron taşınmasına katılırken, stroma tilakoitlerinde bulunan bağlı CA, fotosentez sırasında $CO_2$ fiksasyonuna katılır. Sitoplazmik CA ise $CO_2$'yi transfer ederek hücrede bikarbonat havuzunu devam ettirir. CA'nın fotosenteze direk katılmasının bir ispatı fotosentez inhibitörleri Siklohegzimid'in hem fotosentezi hem de CA'yı inhibe etmesidir. Karboksilasyonu sağlayan enzimler Riboloz bifosfat karboksilaz ve Fosfoenol piruvat karboksilaz enzimleri ile CA'nın yakın ilişkide olması Calvin Siklusunun önemli enzimleri olan ribuloz bifosfat karboksilaz ve oksijenaz enzimleri ile CA arasında koordineli bir artma veya azalma olması da önemli birer ispattır (Spencer *et al*. 1983; Popova and Lazova 1993; Sütlemeyer *et al*. 1993; Majeau and Coleman 1994).

Şimdiye kadar karbonik anhidraz'ın 16 tane farklı izoenzimi bulunmuştur. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV) ve üç tanesi nonkatalitiktir (CA VIII, X, XI) (Supuran *et al*. 2003; 2004; Nar 2011). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümör oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Nishimoiri 2004; Hilvo *et al*. 2005; Öztürk Sarikaya *et al*. 2011 ).

İnsanda CA izoenzimlerinin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokuların çoğunda CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimlerin varlığı tespit edilmiştir. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri, insan eritrosit hücrelerinde bulunan izoenzimlerdir. hCA-I insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 $mg/_{g\ hemoglobin}$ olarak hesaplanmıştır (Öztürk Sarıkaya *et al.* 2011). Bu İzoenzimlerin en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan $CO_2$'i, $HCO_3^-$'a, akciğer pulmoner kapilerde ise $HCO_3^-$'ın $CO_2$'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2,5x10^5\ s^{-1}$'dir (Nar 2011).

hCA-I izoenzimin fizyolojik özelliği hCA-II kadar açık değildir. hCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001).

Karbonik anhidrazın en çok çalışılan izoenzimi hCA-II'dir. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer hCA-I'e oranla daha azdır. Bu izoenzimin turnover sayısı $25^oC$'de $106\ s^{-1}$ olarak bulunmuştur. Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, hCA-II'nin yanı sıra hCA-IV izoenzimleri de bol miktarda bulunmaktadır (Supuran 2004). Bu dokuda bulunan hCA-II izoenziminin önemi, glukoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Renzi *et al*. 2000). hCA-II izoenzimi böbrek korteksinde membrana yapışık haldedir ve $Na^+$ ile $H_2O$'nun geri emilimi sağlanmaktadır. hCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu sonucu kemiklerde kireçlenme, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme meydana gelmektedir. Bu da hCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al*. 1997).

İskelet kasında CA enzimi olarak hCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. hCA-III

izoenzimi doku kapilerine $CO_2$'nin difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır (Cabiscol and Levine 1996).

Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8x10^3$ $s^{-1}$'dir. hCA-III izoenzimi kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan dolayı, büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek miktarda bulunmaktadır. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri gibi hCA-III de *p*-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan hCA-III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır (Engberg *et al*. 1985).

hCA-IV izoenzimi membrana bağlıdır. Böbrek membranına, bazı epitel hücrelerin membranlarına ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sülfonamit inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA-IV 'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan $HCO_3^-$ iyonunu, sitrik asit devrinden gelen $CO_2$'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır.

hCA-V izoenzimi de bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve Piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenez'de rol oynadığı belirlenmiştir. Bu izoenzim ayrıca lipogenez olayında da etkili olmaktadır (Hazen *et al*. 1996). Tükrük bezinde CA enzimi olarak hCA-VI ve hCA-VII izoenzimleri vardır.

hCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanmaktadır. İnsan tükrüğünden saflaştırılmıştır. Tükrüğün pH dengesini hCA-VI izoenziminin sağladığına inanılmaktadır. hCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Lakkis *et al.* 1996).

### 1.1.2. Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

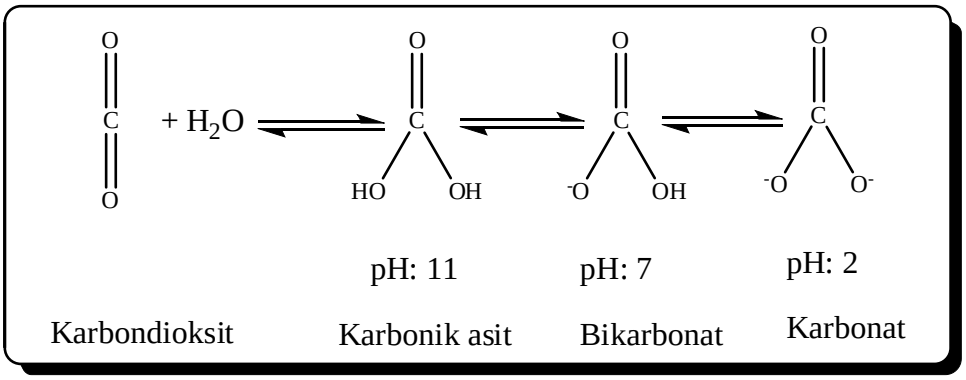
Karbonik anhidraz $CO_2$ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri ve ayrıca siyanatın karbamata veya ürenin siyanamite, aldehitin geminal diole hidratasyonu reaksiyonları da bu enzim tarafından katalizlenir.

CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliğinden dolayı organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Jabusch and Deutsch 1989; Lindskog 1997).

**Çizelge 1.1.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

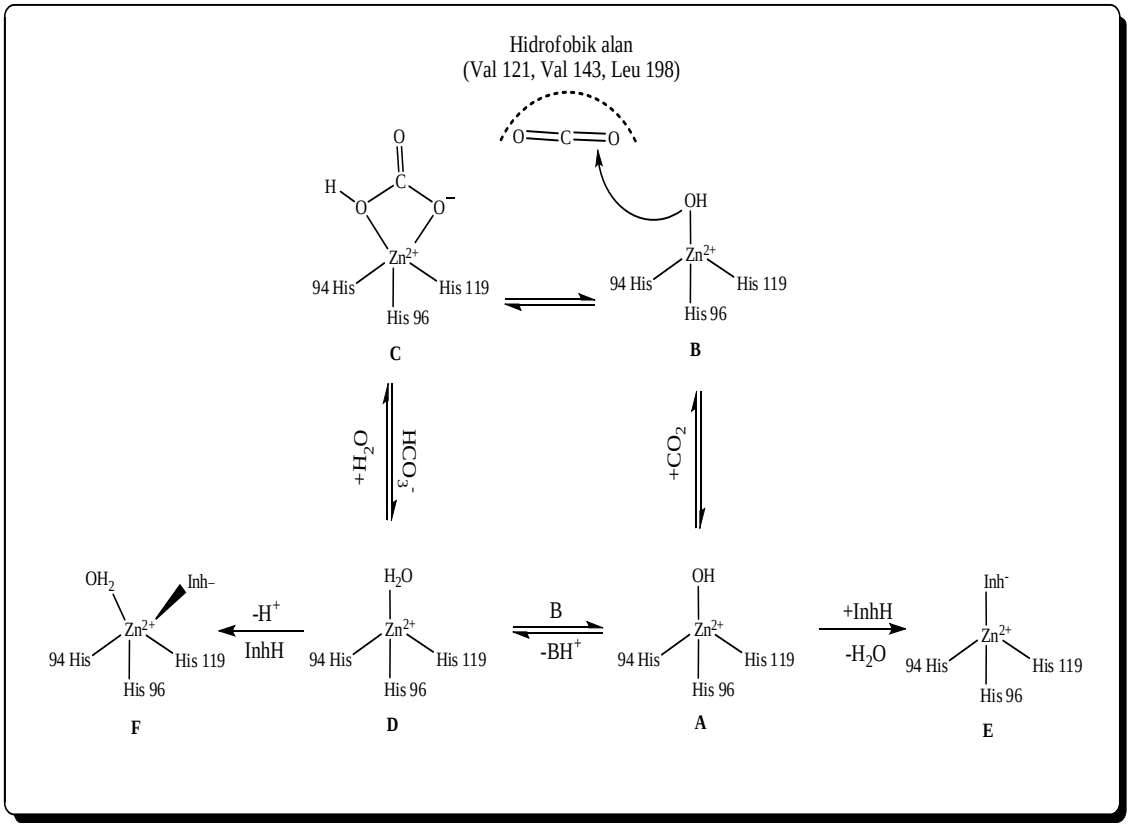
| | |
|---|---|
| (1) | $O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ |
| (2) | $O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$ |
| (3) | $HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$ |
| (4) | $RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$ |
| (5) | $RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$ |
| (6) | $RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$ |
| (7) | $ArOPO_3^{2-} + H_2O \leftrightarrow HPO_3^{2-} + ArOH$ |
| (8) | $ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar: 2,4dinitrofenil) |
| (9) | $PHCH_2OCOCl + H_2O \leftrightarrow PHCH_2OH + CO_2 + HCl$ |
| (10) | $RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (R: Me; Ph) |

Karbonik anhidraz $CO_2$ ve $H_2CO_3$ veya ortamın pH'sına göre $HCO_3^-$ ve $CO_3^{2-}$ iyonları arasında dönüşümlerini katalizlemektedir. Düzlemsel bir molekül olan $CO_2$' in farklı açılara sahip piramidal yapıda $H_2CO_3$'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.




**Şekil 1.2.** $CO_2$'in farklı açılara sahip piramidal yapıda $H_2CO_3$'e kendiliğinden dönüşümü

Karbonik anhidraz, bu çok yavaş gerçekleşen dönüşüm reaksiyonlarını *in vivo* ve *in vitro* şartlarda son derece hızlı bir şekilde katalizlemektedir. hCA-II'nin turnover sayısı 600.000 $s^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

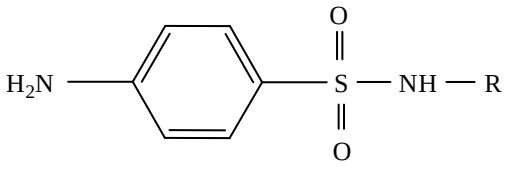



**Şekil 1.3.** Karbonik anhidrazın katalizlediği $CO_2$-hidrataz mekanizması

### 1.1.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

İnhibisyon etkilerini ya CA'nın aktif bölgesindeki $Zn^{2+}$ iyonuna bağlı su molekülü ile yer değiştirerek veya $Zn^{2+}$ iyonuna ilave bir ligand bağıyla bağlanarak gösteren bu inhibitörler, mononegatif anyonlar (halojenürler, $NCO^-$,$SCN^-$, $CN^-$ gibi), ve bazı nötral organik bileşikler (sülfonamitler) enzime sıkıca bağlanarak dönüşümlü inhibisyona neden olmaktadırlar. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı asetazolamittir. Farmakokinetik özelliklerinden dolayı glokom, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Innocenti *et al*. 2010).

Sülfonamit türevleri (asetazolamit, etokzolamit, metazolamit, klorzolamit gibi) CA'nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).




Sülfonamit

Alkoller, organik solventler ve amit bileşikleri gibi diğer nötral inhibitörler ise enzime gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon meydana getirirler. Karbonik anhidraz inhibitörleri, sülfonamitlerin değişik türevlerini oluşturan ajanlardır. (Liang and Lipscom 1991). Karbonik anhidraz inhibitörleri, sistematik olarak verildiklerinde akut glokomların kısa süreli tedavisinde fayda sağlasalar da, uzun süreli kullanımlarda genellikle yüksek görme kaybı riski taşıyan hastalar için rezerve edilmiştir. Miyotiklerle kombine edildiklerinde gayet iyi ilave etki oluştururlar (Orağlı 2001).

## 1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

### 1.2.1. Serbest radikaller ve etkileri

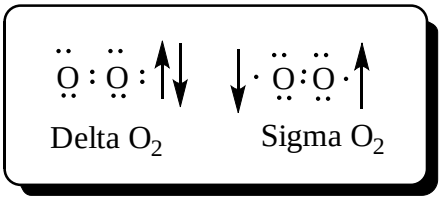
Oksijen hayati fonksiyonların sürekliliği için oldukça önemlidir. Oksijen tüketimimizin %90'ından daha fazlası elektron transport zinciri, geriye kalanından ise diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur.

Elektron transport zinciri yani elektron taşıma zincirinde moleküler oksijen NADH ve $FADH_2$'den elektron alarak suya indigenerek oksitleyici gücü oluşturan ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağına dönüşür. Moleküler oksijene ihtiyaç duyan çeşitli reaksiyonlar amino asitlerin katabolizması, detoksifikasyon gibi özel metabolik yollar için önemlidirler. Bu reaksiyonlarda oksijeni suya veya hidrojen perokside indirgeyen enzimler ve oksijenazlar görev yapmaktadırlar (Altınışık 2000).

Serbest radikaller ortaklanmamış elektrona sahip atom, atom grubu veya moleküller olarak tanımlanmaktadırlar. $Fe^{3+}$, $Cu^{2+}$, $Mn^{2+}$ ve $Mo^{5+}$ gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal değillerdir ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller katyon, anyon veya nötral halde bulunabilirler (Gülçin 2012).

Moleküler oksijen, iki tane ortaklanmamış elektrona sahiptir ve radikal olmayan maddelerle yavaş diğer serbest radikallerle hızlı tepkime verirler. Oksidasyon reaksiyonları, geçiş metalleri içeren enzimlerin bu geçiş metallerindeki bir elektronu moleküler oksijene vermesiyle gerçekleşir (Gülçin 2012).

Biradikal olan moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijenin ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır (Altınışık 2000).

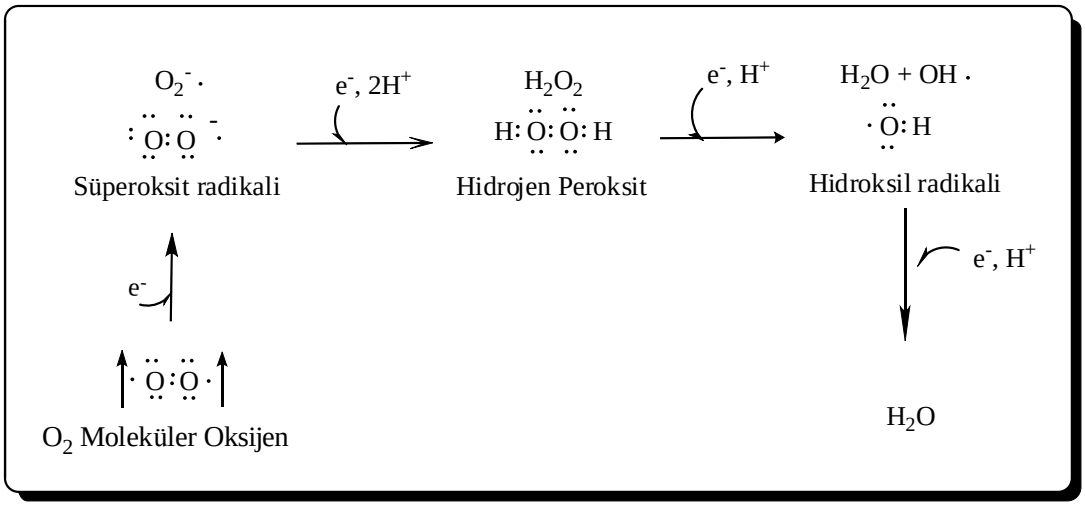



**Şekil 1.4.** Radikal olmayan reaktif oksijen molekülü

Moleküler oksijen, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. ROS hücreye zarar verir ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hücre ölümlerine sebebiyet verirler. Oksijenin yükseltgeyici özelliğinden anaeropların yanısıra aeroplar da zarar görmektedirler. %40'lık oksijen konsantrasyonunda protein agregatları birikimi, proteaz aktivitesi artışı ve yaşlanmada hızlanma görülmüştür (Davies 2000).

### 1.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^-$), hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve hidroksil radikali (OH•)'dir. Ayrıca peroksi (ROO•), alkoksi (RO•), hidroperoksi (HOO•), hipokloröz asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr), ozon ($O_3$), singlet oksijen ($^1\Delta g$ $^1O_2$) de radikal ve nonradikal olan reaktif oksijen türlerindendir.




**Şekil 1.5.** Reaktif oksijen türleri oluşumu

Reaktif oksijen serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilmekte ve karbon merkezli organik radikaller (R•), peroksit radikalleri (ROO•), alkoksi radikalleri (RO•), tiyil radikalleri (RS•), sülfenil radikalleri (RSO•), tiyil peroksit radikalleri ($RSO_2$•) gibi çeşitli serbest radikalleri oluşturmaktadırlar (Halliwell 1996; Gülçin 2012).

Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksitleri oluşturur (Halliwell 1991). Bu radikallerin kaynakları iç kaynaklar ve dış kaynaklar olmak üzere iki grupta toplanır (Alhan 2002). Endojen yani iç kaynaklar, elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları, enzimatik reaksiyonlar ve fagositik (makrofajlar, nötrofil) ve endotelyal hücrelerde meydana gelen oksidatif reaksiyonlardır. Dış kaynaklar çevresel faktörlerle meydana gelebilir. Bunlar, ilaçlar, sigara dumanı, radyasyon ve UV ışığı gibi faktörlerdir.

Süperoksit radikali ($O_2^-$) neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin ($O_2$) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu da meydana gelmektedir ve reaksiyonlar demir ve bakır metaller tarafından önemli derecede hızlandırılır (Temür 2005).

$$Fe_2^{+} + O_2 \rightarrow Fe_3^{+} + O_2^{\bullet -}$$

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu_2^{+} + O_2^{\bullet -}$$

Süperoksit radikali, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması sebebiyle hasar kaynağı özelliğini taşımaktadır. Düşük pH'larda daha reaktiftir ve protonlanarak perhidroksi radikali ($HO_2$•) oluşturmaktadır.

$$O_2^{\bullet -} \xleftrightarrow{H^+} HOO\cdot$$

Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali dismutasyon reaksiyonuyla hidrojen peroksiti meydana getirirler.

$$HOO\cdot + O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

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

$$Sitc\,(Fe_3^{+}) + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + Sitc\,(Fe_2^{+})$$

Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan gibi görev yapar ve bir elektron alarak hidrojen perokside ($H_2O_2$) indirgenir. Süperoksit radikalinin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO•) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit ($NO_2^-$) ve nitrat ($NO_3^-$) oluşturmak üzere metabolize edilir. Damar endotellerinde nitrik oksiti nötralize etmek için sürekli olarak süperoksit oluşumu gerçekleşmektedir (Massie 1993; Payzın 2000).

Süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ($H^+$) ile birleşmesiyle hidrojen peroksit ($H_2O_2$) meydana gelmektedir.

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$
$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit süperoksitin ($O_2^-$) dismutasyonu ile gerçekleşmektedir. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Bu reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak tanımlanır. Bu reaksiyonlar ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir (Alhan 2002).

Kendiliğinden oluşan dismutasyon pH 4,8' de en hızlıdır. Enzimatik dismutasyon ise kendiliğinden dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar (Gülçin 2012).

Geçiş metalleri, fizyolojik şartlarda elektron alış verişi şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev aldıklarından dolayı serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran etkiye sahiptirler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini $H_2O_2$ ve $O_2^-$ den OH• sentezini katalizlerler.

Fenton reaksiyonu $Fe^{2+}$ veya $Cu^+$ gibi geçiş metallerinin varlığında gerçekleşir. Süperoksit radikalinin varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu meydana gelmektedir. Bu iki reaksiyon sonucunda ise en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH•) oluşur (Malo Wilson 2000).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \qquad \text{(Fenton Reaksiyonu)}$$

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \xrightarrow{H^+} O_2 + H_2O + OH^{\bullet} \qquad \text{(Haber-Weiss Raksiyonu)}$$

Hidrojen peroksit kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan fakat $Fe^{2+}$ içeren membranlarda hasar oluşturabilir. Bu hasarları önlemek için hücrelerde önemli göreve sahip olan antioksidan enzimlerden katalaz ve peroksidaz enzimleri rol oynarlar (Kılınç 2002).

Hidroksil radikali en güçlü ROS olmakla birlikte oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS•), karbon merkezli

organik radikaller (R•), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (Gülçin 2012).

$$R\text{-}SH + OH^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2O$$
$$R\text{-}CH_2\text{-}R + OH^{\bullet} \rightarrow R - CH^{\bullet}\text{-}R + H_2O$$

Metabolik olaylar sonucu enzim aktif bölgelerinde ara ürün olarak oluşan radikaller, moleküler oksijen ile etkileşip serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Oluşan bu serbest radikaller yapısal moleküllerin oksidatif hasarına neden olmaktadırlar (Serafani and Del Rio 2004). Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır (Stadtman 2002; Nohl *et al*. 2003).

Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz hasar görmemiş dokularda bir dehidrogenaz olarak vardır, pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden ($O_2$) daha çok $NAD^+$ kullanır.

Oksijen yetersizliğine bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonu azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında) ADP yıkılır ve pürin bazı, ksantin oksidazın bir oksidaz olarak etkili olmasıyla hipoksantine dönüştürülür. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen perokside indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz (Altınışık 2000).

Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda $H_2O_2$ ve $O_2^-$ oluşur, bunların etkisiyle de

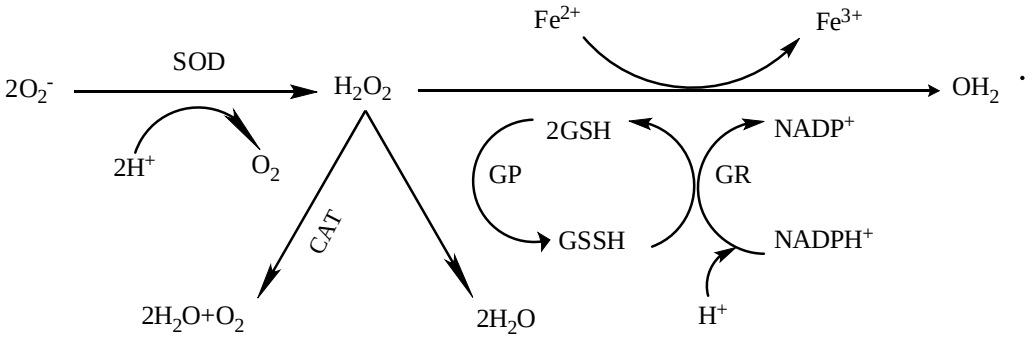
iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir (Chen *et al*. 2000).

Hayvan hücrelerinde askorbik asit, tiyoller, adrenalin ve flavin koenzimleri gibi bazı bileşiklerin otooksidasyonu süperoksit radikalinin bir başka kaynağıdır. Dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksigenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi $H_2O_2$ kaynağıdırlar. Peroksizomlardaki oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit ($H_2O_2$) üretirler. $H_2O_2$' nin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi çok yüksektir. Bundan dolayı peroksizomlardan sitozole ne kadar $H_2O_2$ geçtiği bilinmemektedir.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipit peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali gibi radikaller lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Demir iyonları lipit peroksidasyonunda oldukça büyük bir öneme sahiptir (Kneepkens 1994; Loeckie 1999). Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunda lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalizlemektedirler.

Heksoz monofosfat yolunda elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin ($O_2$) süperoksit radikaline ($O_2^-$) indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar. $NADP^+$'nin diğer kaynağı $H_2O_2$ detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz enzim sistemidir.




**Şekil 1.6.** Glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz enzim sistemi
*(SOD:Superoksit dismutaz, GR: Glutatyon redüktaz, CAT: Katalaz, GP: Glutatyon peroksidaz)

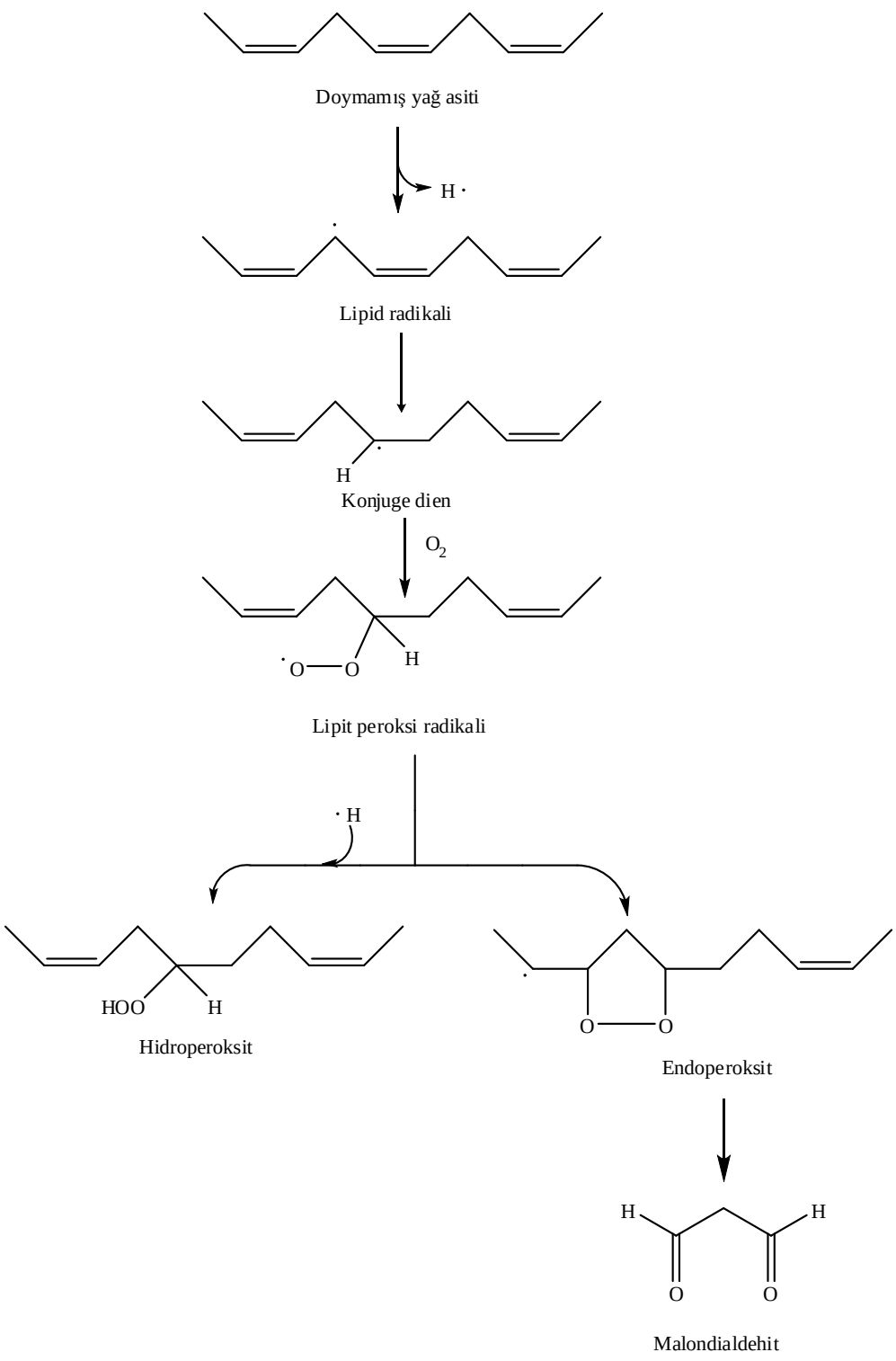
### 1.2.3. Serbest oksijen radikallerinin etkileri

Serbest radikallerin hücrelerde lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşiklere önemli etkileri bulunmaktadır. Süperoksit radikali ($O_2^-$) ve hidroksil radikali (OH•) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatır.

Membranlarda lipit peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur.

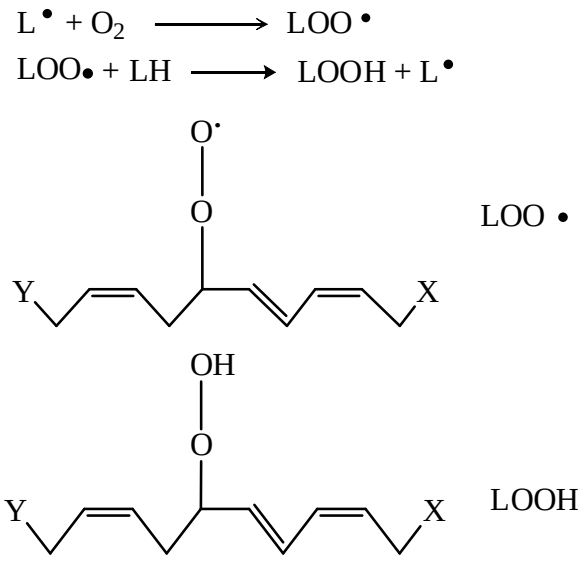
### 1.2.3.a. Serbest radikallerin Lipitlere etkileri

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır (Şekil1.7).




**Şekil 1.7.** Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu

Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki çift bağlardan bir hidrojen atomunun çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla lipit peroksidasyonu başlar. Lipit radikallerinin (L•) moleküler oksijenle ($O_2$) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri (LOO•) oluşur. Lipit peroksit radikalleri (LOO•), membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek zincirleme devam eder.




Lipit peroksit

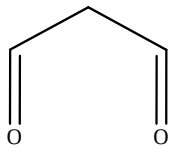
Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı ortamda bulunan demir ve bakır tuzları gibi geçiş metalleri iyonları gerçekleştirir. Oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri peroksidasyonu uyarırlar (Kneepkens 1994; Loeckie 1999).

$$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + RO^{\bullet}$$

$$LOOH + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + H^{+} + RO_2$$

Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik yönden aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar veya oluştuğu andan itibaren diğer hücrelerde hasara yol açacak etkilere neden olurlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.




Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), lipit peroksidasyonunda peroksit seviyelerinin belirlenmesinde indikatör olarak kullanılır. Genel olarak kanda ve idrarda ortaya çıkar. Bu nedenle varlığı önem arz eder. Lipit peroksidasyonu membran yapısına hasar verdiğinden ve ürettiği reaktif aldehitlerle çok zararlı bir zincir reaksiyonu olduğundan dolayı doku hasarına ve birçok hastalığa sebep olmaktadır.

### 1.2.3.b. Serbest radikallerin Proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı yağ asitleri kadar hassas değillerdir ancak serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit dizimlerine bağlıdır. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Prolin ve lizin ROS üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem içeren proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin $O_2^{\cdot-}$ veya $H_2O_2$ reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Altınışık 2000).

Serbest radikaller proteinlerin peptit bağlarını koparıp hücrelerdeki proteinlerin yıkımına neden olurlar. Protein yapısındaki enzimlerin fonksiyonlarını bozabilirler. Hücredeki iyon transportundan sorumlu enzimin fonksiyonel özelliğinin bozulup hücre iyon dengesinin kaybedilmesi örnek olarak gösterilebilir (Loeckie 1999).

### 1.2.3.c. Serbest radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya etkileri

Serbest radikaller radyasyon sonucunda DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve yapısal değişikliklere yol açar. Ayrıca Pürin ve pirimidin bazlarına da etki ederek modifikasyonlara neden olur böylece protein sentezinde inhibisyona yol açarlar (Dizdaroğlu 1991). Fagositik nötrofillerden kaynaklanan $H_2O_2$ ise membrandan kolayca geçerek DNA hasarına sebep olur.

### 1.2.3.d. Serbest radikallerin Karbohidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet, koroner kalp hastalıkları, hipertansiyon, romatizma, Behçet hastalığı, deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir (Altınışık 2000).

### 1.2.4. Antioksidan savunma sistemleri-Antioksidanlar

Metabolizmada ROS oluşumunu ve buna bağlı hasarları önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinirler. Antioksidanlar lipit, protein, DNA gibi yükseltgenebilen bir substrata göre düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda o substratın yükseltgenmesini geciktirebilen veya engelleyen maddelerdir (Apak *et al*. 2006).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

**1.** Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif bir moleküle çevirirler. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.
**2.** Bastırıcı etki: ROS ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürürler. Vitaminler, flavanoitler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
**3**. Zincir kırıcı etki: ROS' u bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
**4.** Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya ekzojen kaynaklı olabilirler:

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon s-transferazlar (GST), Katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidazlar sayılabilir.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar: melatonin, serotonin, seruloplazmin, adrenalin, epinefrin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albümin sayılabilir (Gülçin *et al*. 2002; 2003b).

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

**a.** Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır:

1. α-Tokoferol (E Vitamini).
2. β-Karoten (A Vitamininin provitamini).
3. Askorbik asit (C Vitamini).
4. Folik asit ($B_{10}$ veya $B_{11}$ Vitamini).

**b.** İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır:

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
2. NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, difenilin iyodonyum).
3. Rekombinant süperoksit dismutaz.
4. Trolox (E Vitamini analoğu).
5. Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein).
6. Nonenzimatik serbest radikal gidericiler (mannitol, albümin).
7. Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin).
8. Sitokinler (TNF ve IL-1).
9. Barbitüratlar.
10. Demir şelatörleri.

**c.** Gıdalardaki ekzojen antioksidanlar şunlardır:

1. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
2. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
3. Sodyum benzoat
4. Etoksikuin
5. Propilgalat

Tokoferoller, fenolik bir hidrojeni, peroksitlenmiş doymamış bir yağ asidinin peroksi serbest radikaline aktararak antioksidan etki yaparlar. E Vitamini terimi bir grup tokoferol ve tokotrienoller için kullanılmaktadır. Bu grup içine giren tokoferoller (α, β, γ ve δ) ve dört tokotrienol (α, β,γ ve δ) antioksidan aktiviteye sahiptir.

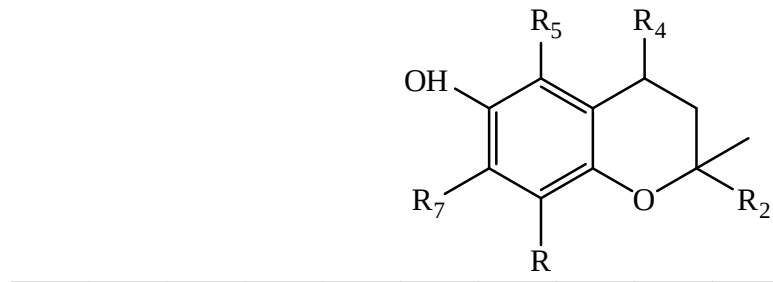
α-tokoferol lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sonlandırabilir. E Vitamini süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer

radikalleri indirger. E Vitamini zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir (Flohe and Traber 1999).

$$L^{\bullet} + VitE \rightarrow LH + VitE^{\bullet}$$

$$VitE^{\bullet} + L^{\bullet} \rightarrow LH + VitE_{OX}$$

E Vitamini okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile E Vitamini, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken E Vitamini peroksitlerin sentezini engeller. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve E Vitamini ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği kaydedilmiştir (Gülçin 2012).




Tokoferoller Tokotrienoller

$R_2$= $R_2$=

| | $R_4$ | $R_5$ | $R_7$ | $R_8$ | $R_4$ | $R_5$ | $R_7$ | $R_8$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| α-Tokoferol | H | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ | H | $CH_3$ | $CH_3$ | $CH_3$ |
| β-Tokoferol | H | $CH_3$ | H | $CH_3$ | H | $CH_3$ | H | $CH_3$ |
| γ-Tokoferol | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ |
| δ-Tokoferol | H | H | H | $CH_3$ | H | H | H | $CH_3$ |

**Şekil 1.8.** Tokoferol ve tokotrienollerin sınıflandırılması (Gülçin 2012).

Karotenoitler havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur (Frel 1994). A Vitamininin ön maddesi olan β-karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır (Canfield and Valenzuela 1993).

Melatonin serbest hidroksil radikali ile reaksiyona girdikten sonra oluşan ürün ortamdaki süperoksit radikalini ($O_2^-$) tutar. Melatonin en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH•) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (Gülçin *et al.* 2002). Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrolün DNA üzerine hasar oluşturucu etkisinin, melatonin tarafından çok etkili şekilde inhibe

edildiği gösterilmiştir. Melatonin kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir (Gülçin 2008).

Glutatyon (GSH) çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. Glutatyon (GSH) eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (Altınışık 2000).

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipit radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır (Mavi 2005).

Doğal antioksidanlardan tahıl ve baklagillerde, meyvelerde, şifalı bitkilerde (Foo and Porter 1981; Namiki 1990) bulunan antioksidanlar; tokoferoller, flavonoitler, fenolik asitler gibi fenolik bileşikler, alkaloit, klorofil, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu organik asitler ve karotenlerdir (Endo *et al*. 1985; Larson 1988; Hudson 1990; Aruoma and Cuppett, 1997).

Sentetik antioksidanların kanserojen ve toksik olduğu hakkındaki bazı şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi arttırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjist etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asitin antioksidan aktivitesi nispeten sentetik antioksidanlardan daha düşüktür (Nishina 1991; Gülçin 2002; 2012).

Son yıllarda kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve kanser gelişimi üzerinde serbest oksijen radikallerinin bilinen etkilerinden dolayı gıda ve diyetle alınan

antioksidanlar için aktivite çalışmalarına ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Garcìa-Parrilla 2008; Gülçin 2012). Bu amaçla, gıda maddelerinin total antioksidan kapasitesini belirlemeye yönelik farklı prosedürler geliştirilmiştir (Pellegrini *et al*. 2003; Pérez-Jiménez and Saura-Calixto 2005). Antioksidan metotlar için güvenilir yöntemlere ihtiyaç olduğu bildirilmektedir (Prior *et al.* 2005; Magalhaes *et al.* 2008). Bir bileşiğin antioksidan aktivitesini belirlemek için standartlaştırılmış bir yöntem belirtilen ideal gereksinimleri karşılamalıdır: (1) potansiyel uygulamalar için mevcut kimyasalların olması; (2) biyolojik ilişkili bir radikal kaynağından yararlanılması; (3) numune; (4) tanımlanmış bir bitiş noktası ve kimyasal bir etki mekanizması olan bir yöntem kullanılması; (5) kimyasal ve materyallerin kolaylıkla bulunması; (6) çalışma sırasında ve gün içinde tekrarlanabilir özellikte olması; (7) hem hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar hem de farklı radikal kaynakları için uyarlanabilir olması; (8) analizlerin rutin kalite kontrol metotları için uyarlanabilir olması (Prior *et al*. 2005; Gülçin 2012).

Antioksidan kapasite tayini için kullanılacak ideal yöntem, ROS ve RNS (Reaktif nitrojen türleri) 'nin *in vivo* etkileri de göz önünde bulundurulduğunda, benzer reaksiyon koşulları içinde bulunan maddelere etkilerini de değerlendirmesi gerekir. Ancak sadece ROS ve RNS' nin etkilerini belirlemeye yönelik olabileceğinden diğer faktörler değerlendirilmeyebilir (Magalhães *et al.* 2009). Bu nedenle doğru metotların uygulanması önem arz etmektedir. Antioksidanların çok çeşitli oluşu bunların sebze-meyve matrikslerinden ayrılmalarını ve bireysel kantitatif tayinlerini güçleştirir. Ayrıca antioksidanların eşgüdüm içinde davranmaları da söz konusudur. Toplam antioksidan kapasitesini doğrudan bitkisel ekstraktlarda ve biyolojik sıvılarda ölçebilecek güvenilir metotlara ihtiyaç duyulmaktadır (Apak *et al.* 2007). Reaksiyon türlerine göre metotlar, hidrojen atomu transferi (HAT)'ne dayanan yöntemler ve single elektron transferi (SET) temelli yöntemler olarak ele alınmaktadır (Gülçin 2012).

SET-temelli yöntemler, potansiyel bir antioksidanın, metal, karbonil ve radikal gibi herhangi bir bileşiği veya grubu indirgemek için onlara bir elektron transferini esas alır (Huang *et al.* 2005). SET-temelli yöntemler, indirgendiğinde renkliliği veya ışıma özelliği değişen yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidan kapasitesini ölçer. Bu

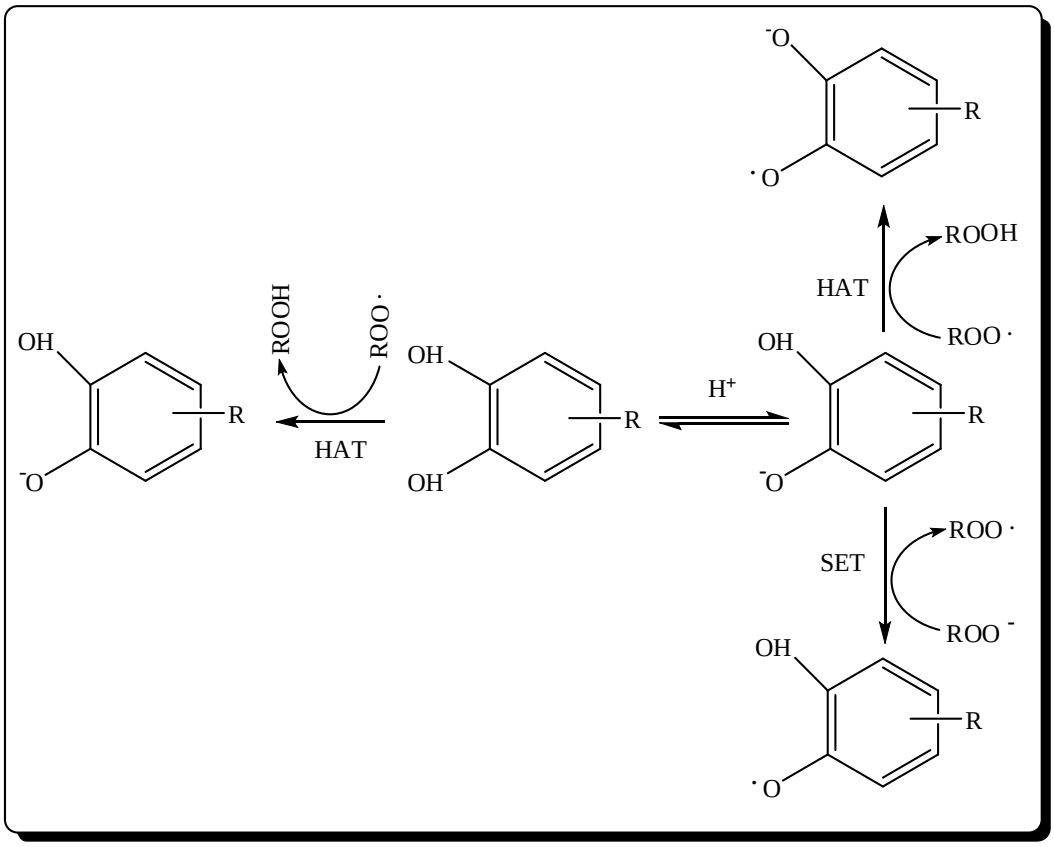
olay bir absorbans/floresans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, başlangıç örneğindeki antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir (Wright *et al*. 2001).

HAT-temelli yöntemler bir antioksidanın, hidrojen verme yoluyla serbest radikalleri gidermedeki mükemmel yeteneğini ortaya koymaktadır. HAT reaksiyonları, çözücü ve pH' dan bağımsız ve oldukça hızlıdır. Genellikle birkaç dakika içinde tamamlanabilir. Metal içeren indirgen maddelerin varlığı, HAT yönteminde karışıklığa ve yanlışlıkla yüksek bir reaktiviteye yol açabilir (Prior *et al*. 2005). Bu tür yöntemlerde metal iyonları gibi indirgeyici ajanların bulunması yüksek reaktif kaynakları olduğundan dolayı önerilmemektedir (Prior *et al.* 2005; Miguel 2010). HAT esaslı yöntemlerde, antioksidanların hidrojen verme yoluyla serbest radikalleri gidermeleri mümkündür.

$$AH + X^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + XH$$

Bu yöntemlerin nispi reaktivitesi, bağ ayrışma enerjisi (≈-10 kcal/mol) ve iyonizasyon potansiyeli (<-36 kcal/mol) aralığı ile bileşikler için karakteristik olan antioksidanların H-verici gruplarının bağ ayrışma enerjisi ile belirlenir. HAT esaslı metotlar aşağıdaki verilmiştir (Huang *et al.* 2005; Gülçin 2012):

1. Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
2. Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
3. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun inhibisyonu
4. Total oksiradikal giderme kapasitesi tayini (TOSCA)
5. Krosin veya β-karoten ağartma yöntemleri
6. Kemilüminesans yöntemi




**Şekil 1.9.** Katekolün peroksil radikalleriyle reaksiyon mekanizması (HAT ve SET esasına göre)(Gülçin 2012).

$$AH + X^{\cdot} \rightarrow AH^{\cdot+} + X^{\cdot}$$

$$AH^{\cdot+} + H_2O \rightarrow A^{\cdot} + H_3O^{+}$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \rightarrow XH + H_2O$$

$$AH + M^{3+} \rightarrow AH^{+} + M^{2+}$$

SET esaslı yöntemlerdeki göreceli aktiviteler öncelikle bir molekülden hidrojen iyonlarının ayrıştırılmasını (Lemanska *et al.* 2001) ve reaktif fonksiyonel grubun iyonizasyon potansiyelini esas almaktadır (Wright *et al.* 2001). Genel olarak pH arttıkça iyonizasyon potansiyeli azalır. Bu nedenle SET reaksiyonları pH' dan bağımsızdır.

Redoks potansiyeli ve SET reaksiyonları arasında bir ilişki önerilmiş fakat tutarlı bir şekilde gösterilememiştir (Ou *et al.* 2005). SET reaksiyonları genellikle yavaştır ve tamamlanması için uzun bir zaman gerekir. Böylece antioksidan kapasite hesaplamaları kinetiktense, ürün içindeki yüzde azalma miktarına göre değerlendirilir. $AH^{+}$'nin yeterli bir ömrü olduğunda, ikincil reaksiyonlar analizlerde önemli bir engel oluşturur ve hatta *in vivo* olarak toksisiteye sebep olabilir (Sartor *et al.* 1999).

SET yöntemleri plazma redoks tonunun korunmasında önemli olan ürik asit ve askorbik asit için çok duyarlıdır ve indirgenmiş polifenoller de tespit edilir. Önemli olarak, iz bileşenler ve metal gibi kirleticiler SET yöntemleri ile engellenebilmektedir (Wright *et al.* 2001; Lemanska *et al*. 2001; Prior, Wu and Schaich 2005). Sonuçlardaki yüksek değişkenlik, düşük tekrarlanabilirlik ve tutarlılık için de çeşitli hesaplamalar yapılabilir (Ou *et al*. 2005). Elektron transferine dayanan reaksiyonlar genellikle yavaştır ve kinetik açıdan değil de ürün yüzdesindeki azalmaya göre esas alınmıştır (Prior *et al.* 2005). SET esaslı metotlar şöyle sıralanabilir:

1. Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemi ile total fenolik tayini
2. Troloks ekivaleni antioksidan kapasitesi (TEAC)
3. Ferrik iyonları indirgeyici antioksidan aktivite tayini (FRAP)
4. Total antioksidan kapasite tayini (oksidan olarak $Cu^{2+}$ kullanarak)
5. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali ($DPPH^{\cdot}$) giderme tayini
6. 2,2-Azinobis 3-etilbenzitiazolin-6-sülfonik asit radikali ($ABTS^{\cdot+}$) giderme tayini
7. N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikali ($DMPD^{\cdot+}$) giderme tayini
8. Bakır iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme aktivitesi tayini (CUPRAC)

ABTS metodunun hem HAT, hem de SET esaslı yöntemlerde kullanılabildiği belirtilmiştir (Prior *et al.* 2005).

Antioksidanların, biyolojik sistemlerdeki veya gıda bileşenlerindeki büyük makromolekülleri etkileyip hasara sebep olan çeşitli ROS'ları gidermek ve antioksidan

kapasitelerini belirlemek amacıyla başka metotlar da kullanılmaktadır (Huang *et al.* 2005; MacDonald-Wicks *et al*. 2006; Miguel 2010):

1. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$) giderme tayini
2. Hidrojen peroksit ($H_2O_2$) giderme tayini
3. Hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$) giderme tayini
4. Singlet oksijen ($^1O_2$) giderme tayini
5. Peroksinitrit ($ONOO^-$) giderme tayini

### 1.2.5. Fenolik bileşikler

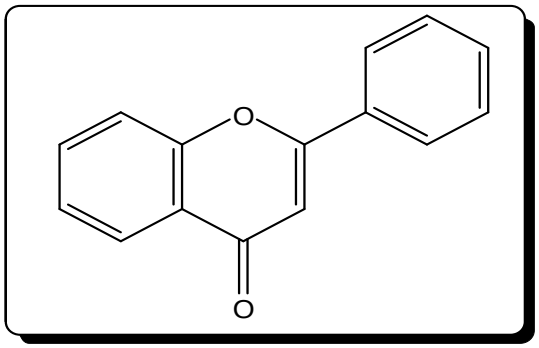
Fenolik bileşikler bütün bitki metabolizmalarında fenilpropanoit biyosentetik yolu izlenerek doğal olarak oluşan, bitki, meyve ve çiçeklere renk veren, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilerde koruma sağlayan sekonder metabolitlerdir (Kahkönen *et al.* 1999; Hua *et al*. 1999; Ergün vd 2002; Cemeroğlu 2004; Saldamlı 2007; Fidan vd 2007; Nizamlıoğlu ve Nas 2010). Bir veya daha fazla aromatik benzen halkasına hidroksil grubu veya gruplarının bağlanmasıyla oluşur (Tümer 2006). Fenolik bileşiklere beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkiler gösterdiğinden "biyoflavonoit" de denilmektedir. Ayrıca bazı kaynaklarda ise P vitamini olarak da adlandırılmaktadır (Cemeroğlu 2004; Saldamlı 2007).

Fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoitler olmak üzere iki grupta incelenir. Flavonoitler güçlü polifenolik antioksidanlardır (Cemeroğlu 2004). Flavonoitlerin serbest radikal tutucu ve metal bağlayıcı aktiviteleri ile güçlü antioksidan özelliklerinin olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Saija 1995; Saije *et al.* 1998; Gülçin and Daştan 2007).

Flavonoitler ksantin oksidaz, lipoksigenaz ve siklooksigenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlarla etkileşime girerek ve süperoksit anyonları, lipit peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest

radikalleri gidererek güçlü antioksidan etki göstermektedirler (Shi *et al.* 2001; Disilvestro 2004).

Flavonoitlerin yapısındaki OH grupları, oldukça reaktif olduğundan kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999). 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahip olan flavonoitler, 5' pozisyonda OH grubunun bulunmasıyla daha yüksek bir antioksidan özelliği taşımaktadır (Rice *et al.* 1996).

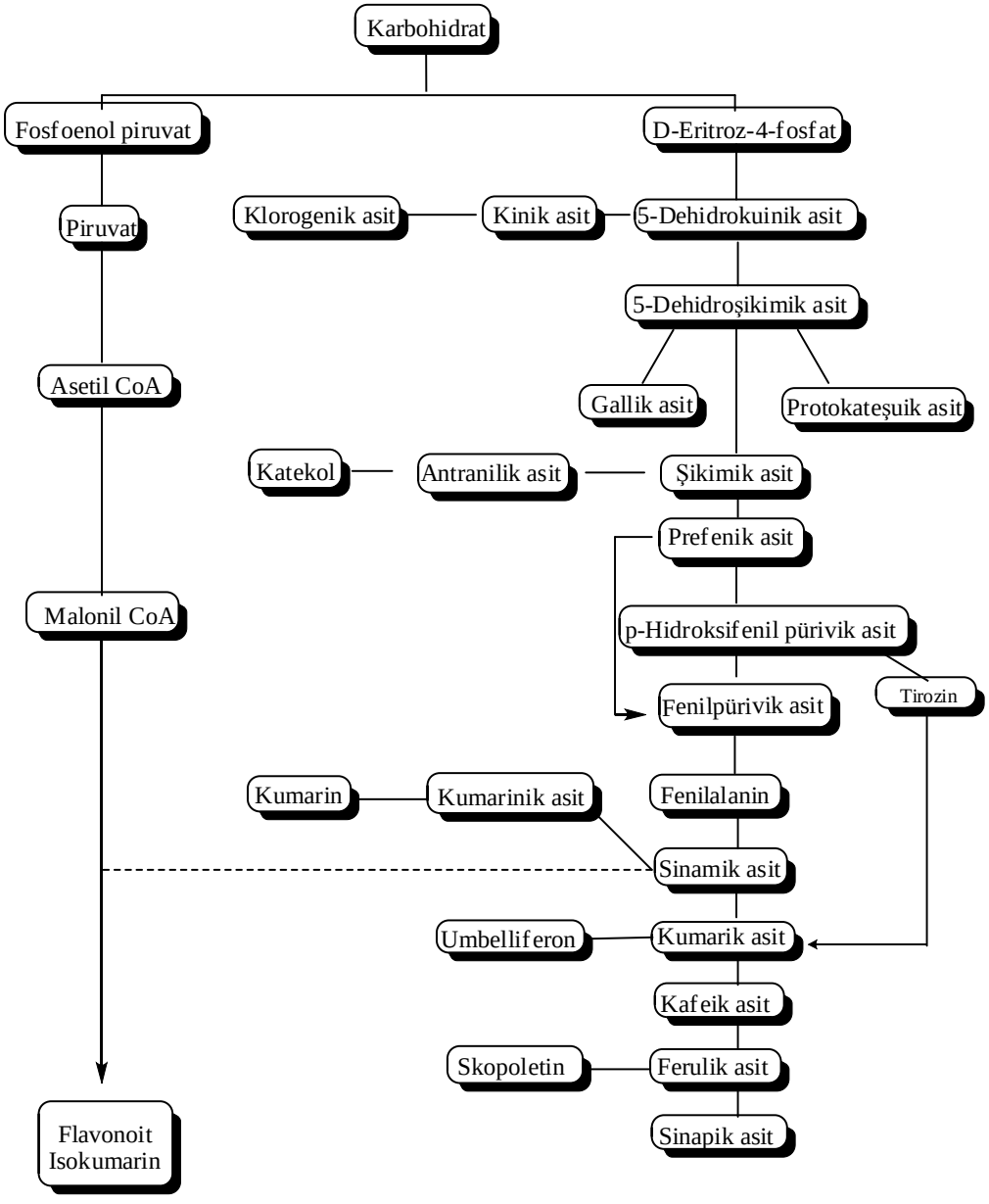



**Şekil 1.10**. Flavonoitlerin genel yapısı

Son zamanlardaki çalışmalarda, bitkilerdeki polifenolik bileşiklerin antioksidan özelliğinin, C ve E vitaminine göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Rene *et al.* 2001). Ayrıca düşük dansiteli lipoproteinler ve trombositler üzerine de fenolik bileşiklerin etkileri belirlenmiştir. Böylece kalp-damar hastalıklarında temel risk faktörlerini oldukça azaltmaktadırlar (Poyrazoğlu *et al.* 2002).

Fenolik bileşiklerin biyosentezi oldukça karmaşıktır. Fosfenol piruvik asit, klorogenik asit vasıtası ile D-eritroz fosfat ile birleşerek pentoz fosfat yoluyla 5-dehidrokuinik asidi oluşturmaktadır. 5-dehidrokuinik asit, 5-dehidroşikimik asite dönüşürken protokateşuik asit ve gallik asit meydana gelmektedir. 5-Dehidroşikimik asit, şikimik asite dönüşürken antranilik asit ve katekol sentezlenmektedir. Şikimik asit, prefenik asit şekline dönüşürken *p*-hidroksifenil piruvik asit veya fenilpiruvik asit oluşmaktadır. Tirozin, *p*-kumarik ürünlerini verirken, fenilalanin sinamik asit ürünlerini verir. Sinamik asit ard arda gelen, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit şekline dönüşür.

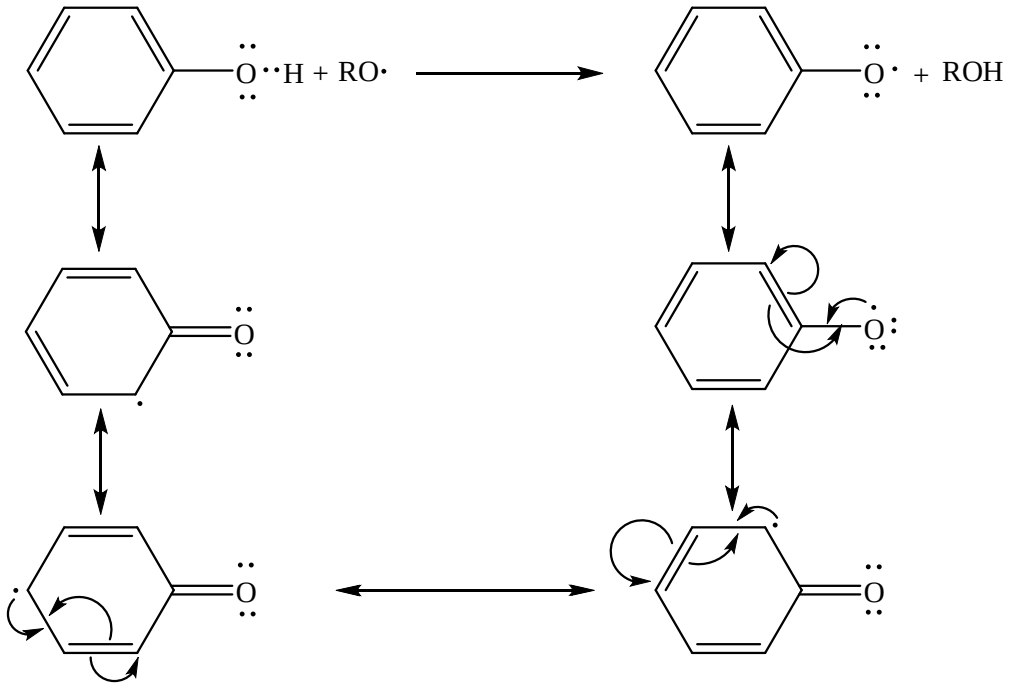
Kumarik asitten, umbelliferon; ferulik asitten skopoletin meydana gelir. Öte yandan Asetil Co-A, malonil Co-A'ya dönüşürken sinamik asit ilave edilmesiyle beraber çeşitli flavonoitler ve izokumarinler meydana gelmektedir (Harborne 1964).




**Şekil 1.11.** Fenoliklerin biyosentezi (Sarıkaya 2009).

Fenolik bileşikler rezonans kararlılıklarından dolayı antioksidan aktivite gösterirler. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri giderme (Rice-Evans *et al.*

1995; Pekkarinan *et al*. 1999), metal iyonları bağlama (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma (Rice-Evans *et al.* 1995) gibi özelliklere sahiptirler. Bu özellikler fenol radikalinin rezonans kararlılığından kaynaklanmaktadır (Şekil 1.12).




**Şekil 1.12.** Fenol radikalinin rezonans yapıları

Serbest radikaller, singlet ve triplet oksijenin nötralize edilmesinde veya peroksidazların dekompozisyonunda oldukça önemli rol oynamaktadırlar. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler (Javanmardi *et al.* 2003).

Siyah ve yeşil çay, brokoli, çilek, elma, domates lahana gibi meyve ve sebzeler antioksidan etki gösteren flavonoitlerce zengindirler (Ren and Lien 1997; Weber *et al.* 1997). Bu açıdan diyette koruyucu etki sağlamaktadırlar ve gıdalarda bulunabilirliği ve alınması gereken düzeylerinin bilinmesi oldukça önem arz etmektedir (Shahidi *et al.* 1992).

Yapılan birçok araştırmada fenoliklerin antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antirombotik gibi bir çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Macdougall 2002; Aras 2006). Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve Alzheimer gibi hastalıkları engellediği bildirilmiştir (MacDougall 2002; Pehlüvan ve Güleryüz 2004; Karadeniz 2006; Bakkalbaşı 2009;).

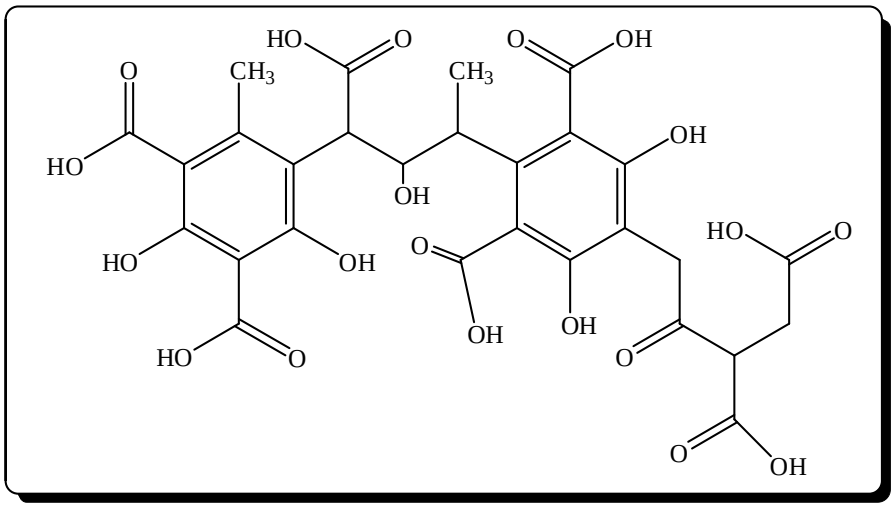
Fenolik bileşikler düşük konsantrasyonlarda enerji üretiminde yer alan enzim aktivitelerini de etkilemektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise proteinlerle kompleks oluşturarak, proteinleri çöktürmektedirler (Juven and Itenis 1972; Denyer and Stewart 1998). Bu nedenle meyve suyu endüstrisinde meyve sularının durultulması işlemi esnasında kullanılmaktadır (MEGEP 2006).

Fenolik bileşikler gübre, boya, tekstil ve plastik gibi pek çok materyalin üretiminde de kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2002). Ayrıca biyolojik özelliklerinden dolayı kozmetik ve farmakolojide de kullanımları oldukça yaygındır (Moure *et al.* 2001).

Bir ekstrenin toplam fenolik içeriği ekstrenin antioksidan aktivitesi ile paralellik göstermektedir. Bu nedenle çoğu bitki ekstresinin antioksidan aktivitesi ekstrede bulunan fenolik maddeleri içerdiğinden kaynaklanır (Schwarz *et al*. 2001).

### 1.2.5.a. Hümik Asit

Hümik asit, ayrışmış organik maddede, peat, kömür yatakları ve toprakta bulunan, özellikle demir gibi metal katyonlarla şelat oluşturma özelliğinde olan polimerik fenolik bileşikler içeren kompleks makro organik moleküllerdir (Nicolas and Melanis 1968). Hümik asitler, kolloidal boyutlarda çökelek oluşturan organik polielektrolitlerdir (Gezici 2004).




**Şekil 1.13.** Hümik asidin açık yapısı

Kömür oksitlendiği zaman bazik ortamda daha fazla ekstrakte edilebilir duruma gelmektedir. Genellikle bazik ortamda çözünen kesime hümik asit, çözünmeyen kısımlara ise hümin ismi verilir (Topkafa 2006).

Hümik asit, hümik maddelerin suda yüksek pH 'da çözünen, fakat düşük pH değerlerinde (pH<2.0) çözünmeyen fraksiyonudur. Elde edildiği kaynağa göre molekül ağırlığı birkaç yüz bin Daltona kadar olabilir.

Hümik asit bitki ve hayvan kalıntılarının ayrışmasıyla meydana gelen; proteinler, polisakkaritler ve polinükloititler gibi bileşiklere dönüşmeyen polikondanse moleküllerdir (Gezici 2004).

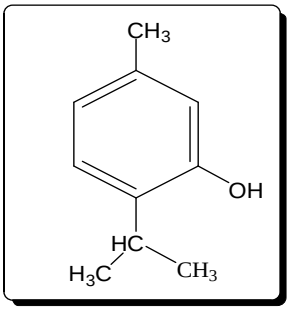
Kök gelişimi ve bitkilerin absorbe ettiği besin elementleri metabolizmalarını etkilemesi ile bitkilere doğrudan etki etmektedir. Yapılan araştırmalarda hümik asitin bitki gelişimini artırdığı, bitkilerdeki alüminyum zehirlenmesini engellediği belirlenmiştir (Tan and Bringer 1986).

Ayrıca hümik maddelerin düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerinin bitkiler tarafından alınabildiği, bu bileşenlerin hücre zarı geçirgenliğini artırdığı ve hormon benzeri

aktivite gösterebildiği de ortaya konulmuştur (Chen and Aviad 1990). Hümik maddeler yapılarında, aromatik yapıya bağlı karboksil, fenolik hidroksil ve alkil grupları ihtiva eden, birbirlerine alifatik, alisiklik ve eterik bağlarla bağlanmış çok sayıda hidrofilik grup içermektedirler (Dizman 2008).

Şelat halkaları içeren kompleksleri, şelat halkası içermeyen komplekslere göre daha dayanıklıdır (Gündüz 1998). Hümik maddeler, şelatlama ile indirgenmiş katyonları kararlı hale getirebilir. Şelatlaşma kapasiteleri oldukça yüksek olduğundan, metal kirliliklerin önlenmesinde kullanılabilmektedirler (Tan 1994). Hümik asitler sadece tarım alanında değil çevre teknolojileri ve kimya teknolojilerinde de kullanılmaktadır. Ayrıca insan sağlığı üzerine yapılan çalışmalarda AIDS başta olmak üzere astım, bronşit, grip, mide rahatsızlıkları, böbrek taşı oluşumunu engelleme, hemoroit, deri kanseri, kan koagulantı, kansızlık, aşırı uyku, iştahsızlık gibi problemlerin çözümünde önemli bir yer tutmaktadır (Dizman 2008).

### 1.2.5.b. Timol




**Şekil 1.14.** 5-Metil-2-izopropilfenol (timol)'ün açık yapısı

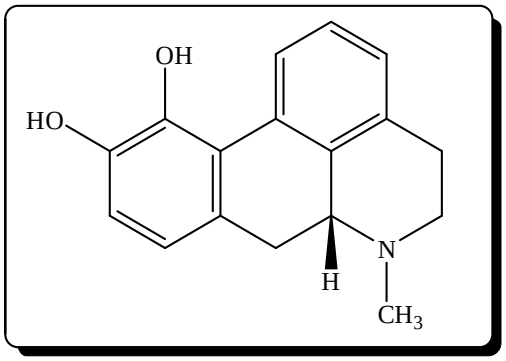
Timol (5-Methyl-2-isopropylphenol) monoterpenler grubu bileşikler arasında sınıflandırılan bitkisel bir fenolik bileşiktir (Balladin and Headley 1999). Kekik adıyla bilinen *Origanum* ve *Timus* türleri çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. *Timus* ve *Origanum* türlerinin içerdiği başlıca esansiyal yağlar; timol, karvakrol, borneol, cymol, cimen, tanen ve flavonlardır. Baharat olarak kullanılır ve sindirimi kolaylaştırırlar (Arkan 2008).

Kekik bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden su buharı distilasyonu yöntemi ile %2-8 oranında yakıcı, lezzetli, aromatik kokulu uçucu yağ elde edilir. Bu uçucu yağda monoterpen fenollerden karvakrol ve timol bulunmaktadır (Shadidi and Naczk 1995).

Timol'un antifungal, antimikrobiyal, antioksidan ve antiseptik özellikleri olduğu belirlenmiştir. Timolün fenolik grubunun lokalizasyonu antioksidan aktivitesini artırmıştır (Yenislieva *et al.* 1999). Timol anti inflamatuvar etkisini, interlökinler, lökotrienler ve prostonaidler gibi inflamatuvar metabolitlerin salınımını azaltarak göstermektedir (Skold *et al.* 1998; Yucel-Lindberg *et al.* 1999).

### 1.2.5.c. Apomorfin

Apomorfin kimyasal olarak morfinden elde edilen ancak özellik olarak morfinle ilişkili olmayan, nonopiad bir maddedir (Melis *et al.* 2009). Apomorfin, Parkinson Hastalığı (Chiara *et al.* 1978) olan hastaların tedavisinde bir nöroprotektif ajan olarak önerilen, hızlı bir şekilde beyine giden ve striyatumda biriken, güçlü bir D1ve D2 dopamin reseptör antagonisti ve potansiyel bir antioksidandır (Gassen *et al.* 1996; Bianchi and Landi 1985).




**Şekil 1.15.** Apomorfinin açık yapısı

Apomorfin L-Dopa ya benzer bir şekilde antiparkinson özellik gösterir ve özellikle hastalığın geç dönemlerinde Parkinson hastalarının tedavisinde rol oynamaktadır (Chiara and Gessa 1978; Pzedborski *et al*. 1995).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalar göstermiştir ki apomorfin antioksidan ve pro-oksidan aktiviteye sahiptir . Merkezi sinir sistemi üzerinde nöroprotektif veya nörotoksik etkileri bulunmaktadır. Apomorfinin bazı nörotoksik etkileri onun oksidasyon türevlerinden dolayı oluşmaktadır (Picada *et al.* 2005). Apomorfin kolayca okside olabilmektedir. Otooksidayonu sonucu toksik ürünler ve süperoksit radikalleri oluşumuna yol açan, kinon ve yarı-kinon türevleri üretir (Graham 1978; El-Bachá *et al.* 2001). Apomorfinin bazı nöronal etkilerinin, oluşturduğu bu otooksidasyon ürünleri sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (Bindolli *et al.* 1992).

Apomorfin pro-oksidan olarak hareket ettiğinde, DNA hasarına yol açmakta ve süperoksit radikal üretimi ile deoksiriboz bozulmalarına neden olmaktadır (Ubeda *et al.* 1993). Apomorfin *in vivo* ve *in vitro* olarak membran lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir (Gassen *et al*. 1996)

Apomorfin, SOD aktivitesini etkilemezken, CAT aktivitesinde artış meydana getirir. Apomorfinin biyotransformasyonu sonucu $H_2O_2$ oluşabilir. Bu şekilde $H_2O_2$ miktarında meydana gelen artış CAT aktivitesinde oldukça önemlidir (Halliwell and Gutteridge 1999).

Apomorfin demir ve bakır şelatlama özelliklerine (Khaliulin *et al.* 2003) ve biyolojik membranlardan hücre içine kolayca nüfuz etme yeteneğine (Gancher *et al.* 1989) sahiptir. Hidroksil radikallerine bağlı hücre ölümü riskini azaltır ve $H_2O_2$ oluşumunu önler (Youdim *et al.* 2000).

### 1.3. Çalışmanın amacı

Antioksidanlar diğer molleküllerin oksidasyonunu engelleyen moleküllerdir. Gıda açısından bir antioksidan, okside olabilen substratına nazaran daha düşük konsantrasyonlarda olsa bile onun okside olmasını önemli ölçüde engelleyen ve erteleyen bir maddedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1993; Halliwell 1995; Gülçin 2012). Antioksidanlar ayrıca insan vücudunu serbest radillerden ve ROS

etkilerinden korur. Bunlar lipit peroksidasyonunun yanısıra birçok kronik hastalığın ilerlemesini de engeller. Genellikle oksidasyon olayında radikal zincir reaksiyonunu önlemek amacıyla gıda bileşenlerine eklenerek ve bir dizi reaksiyona neden olan oluşum ve ilerleme basamaklarını inhibe ederek hareket eder, oksidasyonu geciktirir (Shahidi *et al.* 1992; Gülçin 2006a).

BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi fenolik yapılı sentetik antioksidanlar genellikle gıda ve farmakoloji uygulamalarında kullanılmaktadır. Katı ve sıvı yağların çözünürlüğünü artırmak için alkillerle yer değiştirirler (Hudson 1990). Ancak BHA ve BHT kullanımı, toksik ve kanserojen olmaları şüphesiyle yasal olarak sınırlandırılmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu nedenle gıda uygulamaları için daha güvenli ve doğal antioksidanlara ilgi artmakta ve tüketici tercihlerinde doğal antioksidanlara olan eğilim, antioksidan kaynaklarını keşfetmek için girişimlerin hızlanmasına neden olmuştur (Gülçin 2006b, 2007, 2012).

Besinlerin koku, tat, renk gibi kalitatif özelliklerini artırmak amacıyla kullanılan aromatik bileşikler ve baharatların içeriklerinde bulunan fenolik yapılar nedeniyle antioksidan olarak önem kazanmaktadır (Gülçin 2012). Fenolik doğal bileşiklerden apomorfin ve timol, bir çok farmakolojik özelliğe sahiptirler ve çeşitli hastalıkların tedavi sürecinde etkin rol oynamaktadırlar. Sentetik antioksidanların zararlı etkileri nedeniyle doğal antioksidanların araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Antioksidan çalışmalarının amacı apomorfin, timol ve hümik asit gibi doğal fenolik bileşiklerin standart olarak kullanılan sentetik antioksidanlarla da karşılaştırılıp, onlardan daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu ispatlamak , gıda ve ilaç uygulamalarında kullanılabileceğini ön görmektir.

Apomorfin; Parkinson ve erektil disfonksiyon gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan dopamin reseptör agonistidir (Yang *et al.* 2006; Oksay 2006). Apomorfinin demir ve bakır şelatlama özellikleri (Khaliulin *et al.* 2003) ve doğal fenolik yapısı nedeniyle güçlü bir antioksidan olabileceği ön görülmüştür.

Timol; Kekik ve Mercan köşkü yapısında bulunan antiseptik ve antimikrobiyal özelliği olan fenolik bir doğal bileşiktir. yapılan çalışmalarda timolün antimutajenik (Andersen 2006) ve antitümör özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Mezzouga 2007).

Hümik asit; hümik asitler ile "auxin" (hücrenin gerilip uzaması, bölünmesi gibi birçok değişik fonksiyonu düzenleyen çeşitli bitki hormonları) tipi reaksiyonların varlığı üzerine birçok makale yazılmıştır. İçeriğinde bol miktarda bulunan polifenol grupları sayesinde antioksidan özellik sergilemektedir (Senn and Kingman 1973). Şelatlama özelliği ile indirgenmiş katyonları kararlı hale getirebilir. Şelatlaşma kapasiteleri oldukça yüksek olduğundan, tarım ilaçları muhteviyatı olarak da bitkiler üzerinde kullanılmaktadır (Tan 1994).

Ayrıca açık formülleri verilen fenolik yapıya sahip bileşiklerin çalışmamız kapsamında antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve mekanizmalarının aydınlatılmasının yanısıra insan kanından kromatografik yöntemlerle saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerinde inhibisyon etkileri de araştırılmıştır. Bu çalışmada inhibitör olarak kullanılan fenolik doğal bileşikler sadece inhibisyon özellikleri değil antioksidan özellikleride araştırıldığından elde edilen sonuçların tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamit türevleri olan ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2003). Bununla birlikte birçok kimyasal maddeler ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler göz içi basıncını azalttıklarından dolayı başta glokom tedavisinde ilaç olarak, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda (Supuran and Scozzafava 2001; Beydemir and Gülçin 2004), pozitron, emisyon tomoğrafisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde

diagnostikte his materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak halen kliniklerde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Fenoliklerin CA inhibitörleri olarak araştırılmasının sebebi, basit fenollerin CA izoenzimlerinin tek yarışmalı inhibitörü olduğu belirtildiğindendir**.** Nair ve arkadaşları hCA-II ile fenollerin etkileşimini gösteren X-ray kristal yapısını aydınlatmak amacıyla enzimin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ ile fenollerin fonksiyonel -OH grubunun, katalitik bölge için oldukça önemli bir amino asit olan Thr199' un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla -OH'ını enzimin aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenolik bileşiklerin CA'ya bağlandığını göstermişlerdir (1994). Fenollerin fenil kısmı CA'nın fizyolojik substratı olan $CO_2$'nin bağlandığı prekatalitik kompleks bölgesine bağlanarak hCA-II'nin aktif bölgesinde hidrofobik part oluşturmaktadır ve böylece fenollerin CA'nın eşsiz yarışmalı inhibitörleri olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda bütün memeli CA-I / XV izoenzimlerinin, fenoller ve onların benzeri türevleriyle etkileşimleri milimolardan submikromolara kadar incelenmiştir (Innocenti *et al.* 2008). Gülçin ve çalışma arkadaşları tarafından da antioksidant ve radikal giderme aktiviteleri belirlenen bazı biyolojik moleküllerin son zamanlarda CA izoenzimleri üzerindeki etkileri yoğun şekilde çalışılmıştır. Bu anlamda dantrolen sodyum (Gülçin *et al.* 2004c), tokoferol (Arashisar *et al.* 2004), alabalık (*Oncorhyncytes mykiss*) kanı plazmasından elde edilen düşük molekül ağırlıklı plazma inhibitörleri (Hisar *et al.* 2005a), melatonin (Hisar *et al.* 2005b), morfin (Çoban *et al*. 2007), etanol (Çoban *et al.* 2008) ve doğal antioksidan fenollerin (Şentürk *et al*. 2009) farklı CA üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkileri incelenmiştir. Gerçekten de, yaptığımız çalışmada hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile kullandığımız doğal fenolik bileşikler arasındaki inhibisyon profilinin çeşitli olduğu, milimolar- submikromalar aralığında değişen inhibisyon sabitleri ile belirlenmiştir. Böylece spesifik CA inhibitörleri olan sulfonamit ve türevlerinin yerine alternatif olarak antioksidan özellikleriyle de dikkat çeken fenolik bileşiklerin kullanılabileceği ön görülmüştür.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Canlı organizmalar üzerinde yapılan ilk çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin yedi tane izoenzimi bulunmuştur. Eritrositlerden ilk kez 1933'te daha sonra 1946 ve 1960 yıllarında tükrük bezleri ve mitokondride CA enzimi olduğu saptanmıştır. Eritrositlerde hCA-I ve hCA-II, iskelet kasında hCA-III varlığı tespit edilmiştir. hCA-IV insan böbreğinde, mitokondride hCA-V, tükrük bezlerinde hCA-VI ve sitozolde ise hCA-VII'nin olduğu belirlenmiştir (Fernley 1988).

Şimdiye kadar ise karbonik anhidraz enziminin 16 tane izoenzimi olduğu belirlenmiş ve birçok dokudan saflaştırılarak molekül ağırlıkları tespit edilmiştir (Christie *et al*. 1997; Raisanen *et al*. 1999). 1992 yılında yüz sineği adı verilen *M. Autumnalis* larvalarından karbonik anhidraz enzimi saflaştırıldıktan sonra, enzimin doğal molekül ağırlığını belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisine tabi tutulmuş ve doğal molekül ağırlığı 31 kDa olarak bulunmuştur (Burt *et al*. 1992). Daha sonra yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak bu değere rastlanmıştır (Peterson *et al*. 1997; Krungkrai *et al*. 2001).

Falkbring ve arkadaşları ilk olarak 1972 yılında karbonik anhidraz için afinite kromatografisi yöntemini kullanarak saflaştırma yapmıştır. Sonraki yıllarda bu yöntem farklı çalışmalarda modifiye edilerek kullanılmıştır (Özdemir 1992; Çelik 1995).

Karbonik anhidraz enzimi en çok eritrositler, kas ve karaciğerde bulunmaktadır. Eritrositlerde 100 ml'lik kan numunesinde 0.16 g oranında CA olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çözünebilen kas proteinlerinin yaklaşık %5'ini karbonik anhidraz enzimlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (Carter *et al*. 1981; Yenson 1982).

hCA-II enzimi katalitik aktivitesi yani turnover sayısı en yüksek olan enzimdir ($1.10^6$ $sn^{-1}$). En düşük katalitik aktiviteye sahip olan enzim ise hCA-III'tür. hCA-I, hCA-II ve hCA-III sitozolde çözünmüş halde bulunmaktadır.

Tetrahedral geometriye sahip enzim aktif bölgelerinde, histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş $Zn^{2+}$ iyonu bulunmaktadır. $Zn^{2+}$ , karbonik anhidraz izoenzimlerinin prostetik grubudur ve $Zn^{2+}$ uzaklaştırılmış CA izoenzimleri aktiviteden yoksundurlar (Armstrong *et al*. 1966; Lindskog and Henderson, 1971).

Son yapılan araştırmalarda CA enzim ailesinin dört grupta incelendiği bildirilmiştir. Bunlardan α-CA yapısındaki CA enzimleri CA-III, CA-V ve *E.coli*'de bulunan bütün CA enzimleridir. hCA-I ve hCA-II kristal yapıdadır ancak β yapısında henüz CA enzimine rastlanmamıştır. γ-CA yapısı ise *M. Thermophila*'dan elde edilmiş ve α-CA'daki katlanmalardan farklı katlanmalara sahip olduğu gözlenmiştir. İnsan hCA-II enzimi ile yapı olarak benzerlik gösterdiğinden katalitik aktivitelerinin de yakın olduğu düşünülmüştür (Kisker *et al*. 1996).

Karbonik anhidraz enzimi aromatik ve heteroaromatik sülfanilamitler tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. Bunun nedeni sülfanilamidin iyonik yapıya kolayca geçebilmesidir. Yapılan çalışmalar sülfanilamidin karbonik anhidrazın inhibisyonunda önemli bir rol oynadığını ve ayrıca ligand olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Karbonik anhidraz üzerindeki anorganik inhibisyon etkisi ise tek değerlikli anyonlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu inhibitörlerin CA üzerindeki etkilerinin düşük pH'larda arttığı ancak aynı pH'da hCA-II enzimi üzerinde inhibisyon etkilerinin çok daha fazla olduğunu belirlenmiştir (Roughton and Booth 1946; Magid 1968; Maren and Conto 1979).

Antioksidanlar ise yağların ve diğer moleküllerin okside zincir reaksiyonlarındaki oksidasyonlarını engelleyen veya geciktiren bileşiklerdir. Antioksidanlar hücrelerin anomalileşmelerini yani tümör oluşturma eğilimlerini ortadan kaldırarak hücre yıkımını azaltır ve yaşam kalitesini artırır (Gülçin 2012).

Antioksidan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Radikal giderme, peroksidazların ayrışması, geçiş metali iyonları

katalizörlerinin bağlanması gibi birçok mekanizma bunlara örnek olarak verilmektedir (Gülçin *et al.* 2005a).

Doğal antioksidanlar gıda sektöründe stabilizatör olarak kullanılabildiği gibi ekstraktlar halinde hazırlanarak yine çeşitli gıda bileşimlerine eklenebilmektedir. Tokoferol ve skualen gibi antioksidanlar stabilizatör olarak antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca biberiye, adaçayı ve çay gibi bitkiler gıdalarda oksidasyonu kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır. Çay yüksek oranda polifenol içerdiğinden antioksidan etkiye sahiptir.

Sinamik asitten elde edilen fenilpropanoidler sınıfına ait olan fenolik bileşikler en aktif antioksidan aktiviteye sahip önemli antioksidan maddelerdir. Bunların malonil CoA ile etkileşimi sonucu flavoniodler ve izoflavonoidler meydana gelmektedir. Flavonoidler meyve ve sebzelerdeki sarı-beyaz pigmentlerdir. Üzüm, çilek (Abuja *et al.* 1998; Gülçin 2012; Gülçin and Beydemir 2012), elma gibi meyvelerde ayrıca çayda da önemli miktarda bulunmaktadır.

Buğday, mısır, pirinç gibi çeşitli tahıllarda, bitkisel yağlarda ve yeşil sebzelerde bulunan α-tokoferol, ayrıca meyvelere kırmızı rengi veren özellikle domateste (Abushita *et al.* 1997) bol miktarda bulunan likopen, üzümde bulnan rezveratrol (Gülçin 2010), zerdeçalda bulunan kurkumin (Ak and Gülçin 2008) ve karanfilde bulanan eugenol (Gülçin 2012) de önemli antioksidanlardandır. Likopen kanser ve kalp rahatsızlarında bağışıklık sistemini devreye sokan önemli bir maddedir.

Brokoli, havuç, ıspanak (Gil *et al*. 1999) gibi yeşil sebzeler kayısı ve şeftali gibi meyvelerde bulunan β-karoten, A vitaminin öncül maddesidir ve antioksidan özellik göstermektedir. Dubois ve Tressler tarafından yapılan çalışmalarda ilk kez baharat ve çeşitli otların da antioksidan aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir (1943).

Yapılan araştırmalarla antioksidan aktiviteleri belirlenmeye çalışılmış ve belirlenmesine devam maddelerin çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılabilecek potansiyel elemanlar olduğu gözlemlenmiştir.

Serotonin (Gülçin 2008), melatonin (Gülçin *et al*. 2002; Gülçin *et al*. 2003; Gülçin 2008), L-adrenalin, L-tirozin, L-dopa (Gülçin 2007; Gülçin 2009a) gibi önemli moleküllerin antioksidan aktiviteleri ve radikal giderme aktiviteleri belirlenerek farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Ayrıca karnabahar (Köksal and Gülçin, 2008), su mercimeği (Gülçin *et al*. 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısırgan (Gülçin 2002) gibi günlük tüketilebilen çeşitli bitkilerin ve meyve sularının da (Wen *et al*. 1999) yüksek antioksidant etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

Zeytinyağının başlıca fenolik bileşenlerinden olan hidroksitirozol, hücre zarlarına etki ederek, araşidonik asit lipoksigenazın etkinliğini inhibe edebilmektedir. Oleuropein ve hidroksitirozol, oksidasyona karşı BHT ve E vitamininden daha etkili antioksidanlardır (Tripoli *et al*. 2005; Gülçin *et al*. 2006a).

Çayın etkili antioksidan bileşikleri olan polifenoller kuru çayın %35'ini meydana getirmektedirler. Çayın polifenolik bileşikleri, lipit peroksidasyonunu önleme ve serbest radikal giderme özellikleri ile antioksidan etki göstermektedirler (Mukai *et al*. 2000). Tümör gelişimini ve yayılımını hücre zarı çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığını azaltarak, serbest radikal oluşumunda görev alan enzim sistemini inhibe ederek önler.

Baharatlarda bulunan eugenol, timol, humulan, lupulon, allil izotiyosiyanat gibi bileşiklerin antimikrobiyal etkiye sahip olması baharatların çoğunu gram (+) bakteriler ve küflere karşı etkili hale getirmektedir. Baharatların karışım halinde kullanılmalarının bu etkiyi daha da artırdığı bilinmektedir (Yalçın vd 1997). Kekik bitkisine kendine has kokusunu veren ve antioksidan özellik kazandıran yine fenolik bileşiklerdir (Botsoglou *et al*. 2003).

# 3. MATERYAL ve YÖNTEM

## 3.1. Materyal

### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2,2´-Azino-bis (3-etilbenztiyoazolin-6-sulfonik asit) (ABTS), N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolium (NBT), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH·) radikali, 3-(2-piridil)-5,6-bis (4-fenil-sülfonik asit)-1,2,4-triazin (Ferrozin), α-tokoferol, apomorfin, timol, hümik asit, aseton ve trikloroasetik asit (TCA) Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany'den satın alındı. Çalışmada kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin ve L-Tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamit, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetil aminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptoetanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamit, N,N'-metilen bisakrilamit, G-250, coomassie brillant blue R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

### 3.1.2. Yaralanılan alet ve cihazlar

| | |
|---|---|
| UV-VIS Spektrofotometre | : Shimadzu, UV-1208 |
| Derin dondurucular (-30 ve -86$^{o}$C) | : Sanyo, Japan |
| pH metre | : Hanna Instrument |
| Hassas terazi | : Scaltec SBA 41 |
| İnkübatör | : Elektro-Mag (0-300$^{o}$C) |
| Otomatik pipetler | : Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors |
| Çalkalayıcı | : Nüve SL 350 |
| Vorteks | : Fisons, Whirlimixer |
| Saf su cihazı | : Firstreem Calypso MK 1 Glass Still |

Magnetik karıştırıcı : Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti : 1 $cm^3$'lük Kuartz Küvet

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

### 3.1.3.a. $Fe^{3+}$-$Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,2 M pH:6,6 fosfat tamponunun hazırlanması: 6,24 g $Na_2HPO_4$ yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 200 ml olacak şekilde destile su ile tamamlandı.

**2.** %1'lik $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisinin hazırlanması: 1,5 g $K_3Fe(CN)_6$ destile suda çözündü ve toplam hacim 150 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**3.** %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanması: 15 g TCA destile suda çözündü ve toplam hacmi 150 ml'ye destile suyla tamamlandı.

**4.** %0,1'lik $FeCl_3$ çözeltisinin hazırlanması: 165 mg $FeCl_3.6H_2O$ destile suda çözüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 3.1.3.b. Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,01 M'lık $CuCl_2$ çözeltisinin hazırlanması: 47 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

**2.** $7,5x10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

**3.** 1 M'lık $CH_3COONH_4$ tamponunun hazırlanması (pH:6,5): 7,7 g $CH_3COONH_4$ alındı ve 80 ml saf suda çözüldü, pH-metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

### 3.1.3.c. FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,3 M'lık Asetat Tamponunun Hazırlanması: 2,46 g $NaCH_3COO$ alındı ve 80 ml destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**2.** 40 mM'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 0,334 ml %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**3.** 10 mM'lık TPTZ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,312 g TPTZ alındı ve 100 ml 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.

**4.** 20 mM'lık $FeCl_3$ Çözeltisinin Hazırlanması: 0,54 g $FeCl_3.6H_2O$ alındı ve 100 ml destile suda çözüldü.

**5.** FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 10 hacim 0,3M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisinden oluşur.

### 3.1.3.d. Bipiridil reaktifi ile metal şelatlama metodu ile ilgili çözeltiler

**1**. 0,1 M'lık Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması: 1,21 g Tris alındı ve 90 ml destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**2.** 0,2 M'lık HCl Çözeltisinin Hazırlanması: 1,60 ml %37 lik HCl çözeltisinden alındı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**3.** %0,2'lik Bipiridil Çözeltisinin Hazırlanması: 0,2 g Bipiridil alındı ve 100 ml'lık, 0,2 M'lık HCl çözeltisinde çözündü.

**4.** 2 mM'lık $FeSO_4$ Çözeltisinin Hazırlanması**:** 0,028 g $FeSO_4.7H_2O$ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

### 3.1.3.e. Metal şelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 2 mM'lık $FeCl_2$ çözeltisinin hazırlanması: 0,014 g $FeCl_2.3/4H_2O$ alındı ve 50 ml etanolda çözüldü.

**2.** 5 mM'lık ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 6,2 mg ferrozin 25 ml saf etanolda tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

### 3.1.3.f. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

**1.** $10^{-3}$ M'lık DPPH• çözeltisinin hazırlanması: 39 mg DPPH• 100 ml etanolda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca etanolda manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.

### 3.1.3.g. $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,4): 2,84 g $Na_2HPO_4$ 180 ml destile suda çözündü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

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

**3.** 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 66,25 mg $K_2O_8S_2$ 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

### 3.1.3.h. $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,1 M'lık asetat tamponunun hazırlanması (pH:5,25): 2,05 g $CH_3COONa$ 230 ml saf suda çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 5,25'e ayarlandı, toplam hacim destile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

**2.** 0,1 M'lık DMPD çözeltisinin hazırlanması: 209 mg DMPD 10 ml destile suda çözülerek hazırlandı.

**3.** 0,001 M'lık $DMPD^{+\bullet}$ çözeltisinin hazırlanması: 0,1 M'lık DMPD çözeltisinden 1 ml alındı 100 ml'lik ve 0,1 M'lık (pH 5,25) asetat tamponuna aktarıldı. Bunun üzerine 0,2 ml ve 0,05 M'lık $FeCl_3$ ilave edilerek hazırlandı.

**4.** 0,05 M'lık $FeCl_3$ çözeltisinin hazırlanması: 0,81 g $FeCl_3$ 100 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

### 3.1.3.i. Süperoksit radikali giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1.** 0,05 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,8): 1,42 g $Na_2HPO_4$ yaklaşık 180 ml destile suda çözüldü ve pH metre kullanılarak pH'sı 7,8'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 200 ml olacak şekilde tamamlandı.

**2.** 1,33x$10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltisinin hazırlanması: 12 mg riboflavin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.

**3.** 4,46x$10^{-5}$ M'lık metiyonin çözeltisinin hazırlanması: 0,665 mg metiyonin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı.

**4.** 8,15x$10^{-8}$ M'lık NBT çözeltisinin hazırlanması: 6,1 mg NBT alındı ve toplam hacim 50 ml'ye fosfat tamponuyla (pH:7,4, 0,1 M) tamamlandı.

### 3.1.3.j. Total antioksidan aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

**1**. 0.04 M pH:7,4 Fosfat Tamponu Hazırlanması: 0,48 g $NaH_2PO_4$ alındı ve 80 ml destile suda çözüldü, pH metre ile PH'sı 7,4'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**2.** Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması: 0,017 M linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için 265 μl linoleik asit 50 ml pH:7,4 fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.

**3.** %3,5'luk HCl Çözeltisinin Hazırlanması: %37'lik HCl'den 9,46 ml alınarak 100 ml'ye destile suyla tamamlandı.

**4.** 20 mM $FeCl_2$ Çözeltisi Hazırlanması: 281 mg $FeCl_2.3/4H_2O$, %3,5'luk HCl ile çözülerek hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamamlandı.

**5.** %30'luk $NH_4SCN$ Çözeltisinin Hazırlanması: 15 gr $NH_4SCN$ destile suda çözüldü, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

### 3.1.3.k. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

**1.** 0,2 M $NaHCO_3$, pH:8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g $NaHCO_3$, 950 ml destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**2.** 0,15 M $Na_2CO_3$/0,1 M $NaHCO_3$ pH:10 ($CO_2$-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 15,9 g (0,15 mol) $Na_2CO_3$ ve 8,4g (0,1 mol) $NaHCO_3$'ın 1 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

**3.** 25 mM Tris-HCl/0,1M $Na_2SO_4$, pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g $Na_2SO_4$, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

**4.** 25 mM Tris-HCl/22 mM $Na_2SO_4$ pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,03 g (25 mmol) Tris ve 3,12 g (22 mmol) $Na_2SO_4$, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye tamamlandı.

**5.** 25 mM $Na_2HPO_4$/1 M NaCl, pH:6,3 (kolona tutunmuş HCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g $Na_2HPO_4$ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH:6,3' e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı.

**6.** 0,05 M Tris-$SO_4$, pH:7,4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N $H_2SO_4$ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**7.** 0,1 M $CH_3COONa$/0,5 M $NaClO_4$, pH:5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g $NaClO_4$ tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol $CH_3COONa$, 120 ml destile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH' sı 5,6 ya kadar titre

edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

**8.** Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**9.** 0,025 M veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbitalin 900 ml suda çözülüp pH:8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

**10.** $CO_2$ çözeltisi ($CO_2$-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): $0^oC$'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinden $CO_2$ gazı geçirilerek hazırlandı.

**11.** İndikatör çözeltisi ($CO_2$-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,219 g $NaHCO_3$ ün 1 litre saf suda çözünmesiyle hazırlandı.

**12.** % 0,04'lük Brom Timol Mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içinde çözündükten sonra hacminin saf su ile 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

**13.** Stok fenolik doğal bileşik çözeltilerinin hazırlanması: 10 mg fenolik doğal bileşik çözeltileri (apomorfin, timol, hümik asit) 10 ml saf su içerisinde çözüldü.

**a)** 10 mg hümik asit üzerine 8 ml saf su eklendi. Üzerine damla damla çok bazik NaOH'den ilave ederek çözünmesi sağlandı. Son olarak hacim 10 ml'ye saf suyla tamamlandı.

### 3.1.3.l. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

**1.** SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH:6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi

karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β merkaptoetanol ilave edildi.

**2.** SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

**3.** Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brillant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

**4.** Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid karışımı 100 ml suda çözüldü.

**5.** %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS 90 g saf suda çözüldü.

**6.** 3 M'lık Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (pH:8,8): 36,3 g Tris alındı ve 48 ml 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

**7.** Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.

**8.** Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışım hazırlandı.

## 3.2. Antioksidan çalışmaları

### 3.2.1. $Fe^{3+}$-$Fe^{2+}$ indirgeme kapasitesi

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (1986). Bunun için öncelikle 1mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere aktarıldı, hacim destile suyla 1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH:6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyumferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] ilave edilerek karışım 50 $^oC$'de 20 dk inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 ml % 10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 ml alındı ve bunun üzerine 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0,5 ml $FeCl_3$ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

### 3.2.2. $Cu^{2+}$-$Cu^{+}$ indirgeme kapasitesi -Kuprak metodu

Fenolik yapıdaki bileşiklerin $Cu^{2+}$ indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif bir modifikasyonuyla yapıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşik tüplerine 0,25 ml $CuCl_2$ çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi ($7,5x10^{-3}$ M) ve 0,25 ml $CH_3COONH_4$ tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla eklendi. Yarım saat sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak destile su kullanıldı.

### 3.2.3. FRAP indirgeme kapasitesi

Total antioksidan için hazırlanan stok çözelti bu deneyde de kullanıldı. Öncelikle deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde fenolik bileşik çözeltileri ve standart çözeltiler aktarıldı. Hacimleri 0,5 ml'ye tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µl 20 mM'lık $FeCl_3$ çözeltisi ve 2250 µl FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacmin 5 mL olması sağlandı. Deney tüpleri Vortex'de karıştırıldı ve 10 dakika sonra 593 nm'de absorbansları kaydedildi.

Kör olarak asetat tamponu kullanıldı.

### 3.2.4. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi

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

### 3.2.5. Ferröz İyonları ($Fe^{+2}$) şelatlama aktivitesi

Fenolik yapıya sahip bileşiklerin metal şelatlama aktiviteleri Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (1994). Bu işlem için 2 mM'lik ve 0,05 ml $FeCl_2.4H_2O$ ve 0,35 ml saf su içeren çözelti, değişik konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde değişik miktarlarda fenolik bileşik ihtiva eden 0,2 ml'lik çözeltiye ilave edildi. Son hacim 4 ml olacak şekilde destile etanol ilave edildi. Reaksiyon 0,2 ml ve 5 mM'lik ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı. Çözelti vorteksde kuvvetli bir şekilde karıştırldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı etanolden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak da fenolik bileşikli numune hariç geriye kalan çözelti kullanıldı.

### 3.2.6. Süperoksit anyon radikali ($O_2^-$) giderme aktivitesi

Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikalleri giderme etkisi, nitroblue tetrazolium (NBT) ürünün spektrofotometrik ölçümüyle belirlendi. Bu amaçla Zhishen ve arkadaşlarının (1999) kullandığı metod hafif bir modifkasyonla kullanıldı. Daha önce hazırlanan stok çözelti bu amaç için de kullanıldı.

Bunun için numune ve standartların farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lık ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazırlandı. Numune içeren tampon çözeltiye riboflavin, metiyonin ve NBT'den $1{,}33x10^{-5}$, $4{,}46x10^{-5}$ ve $8{,}15x10^{-8}$ M konsantrayonlarına denk gelen miktarları sırasıyla ilave edildi. Oluşan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 40 dakika boyunca 20 W'lık floresan ışığı ile uyarıldı. Absorbans, sudan oluşan köre karşı 560 nm'de kaydedildi.

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

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak $DPPH^{\bullet}$'ın 1 mM'lık çözeltisisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullanıldı. Deney tüplerine sırasıya 10, 20 ve 30 μg/μl konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir nümune tüpüne stok $DPPH^{\bullet}$ çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml $DPPH^{\cdot}$ çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan $DPPH^{\cdot}$ çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi.

### 3.2.8. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalımaya göre belirlendi (1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 nM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretilildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 0,700±0,025 nm'ye ayarlandı.

ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan fenolik asitlerin farklı konsantrasyonlarına (10-30 μg/ml) birer ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildi ve yarım

saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar kaydedildi.

### 3.2.9. N,N´-dimethil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi

N,N´-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon ($DMPD^{\bullet+}$) elde edildi. Bunun için 100 ml'lik DMPD çözeltisinin (pH:5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 ml $FeCl_3$ ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 ml'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı.

$DMPD^{\bullet+}$ radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik dansitesi 0,1 M'lık ve pH'ı 5,3 olan fosfat tamponu ile 0,900±0,100 nm'ye ayarlandı. Günlük taze olarak hazırlanan $DMPD^{\bullet+}$ çözeltisinin absorbansı 12 saate kadar sabittir.

Fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10-30 µg/ml) deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 0,5 ml ye tamamlandı. Bunun üzerine 1 ml $DMPD^{\bullet+}$ çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorbans değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

### 3.2.10. Total antioksidan aktivitesi

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi tiyosiyanat metoduna göre belirlendi (Yen and Chen 1995). Bu amaçla daha önce hazırlanan fenolik bileşik stok çözeltileri kullanıldı. İstenilen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözeltiler vezin kaplarına otomatik pipetlerle aktarıldı ve toplam hacim tampon çözelti (0,01 M'lık pH:7,4) ile 2,5 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir vezin kabına 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu ilave edildi. Kontrol olarak da 2,5 ml tampon çözelti ve 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon $37^oC$'de ve karanlıkta gerçekleştirildi. Her 12 saatte bir vezin kaplarından 100'er µl alınarak 4,7 ml etanol bulunan deney tüplerine konuldu ve sırasıyla 100 µl $Fe^{+2}$ çözeltisi ve 100 µl $SCN^-$ çözeltisi ilave edildi.

Kör numune ise 4,8 ml etanole 100 µl $Fe^{+2}$ çözeltisi ve 100 µl $NH_4SCN$ çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları köre karşı okundu. İnkübasyon işlemine kontrol maksimum absorbansa ulaştığı noktadan sonra son verildi.

### 3.3. Deneyde Kullanılan Kanın Temini

İnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Deneylerde kullanılıncaya kadar +4$^{o}$C'de muhafaza edildi.

### 3.4. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

#### 3.4.1. CA enzim hemolizatının hazırlanması

Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500*x*g'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alınarak, tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500*x*g'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi.

Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4$^{o}$C'de 20.000*x*g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4$^{o}$C'de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

#### 3.4.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

##### 3.4.2.a. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu

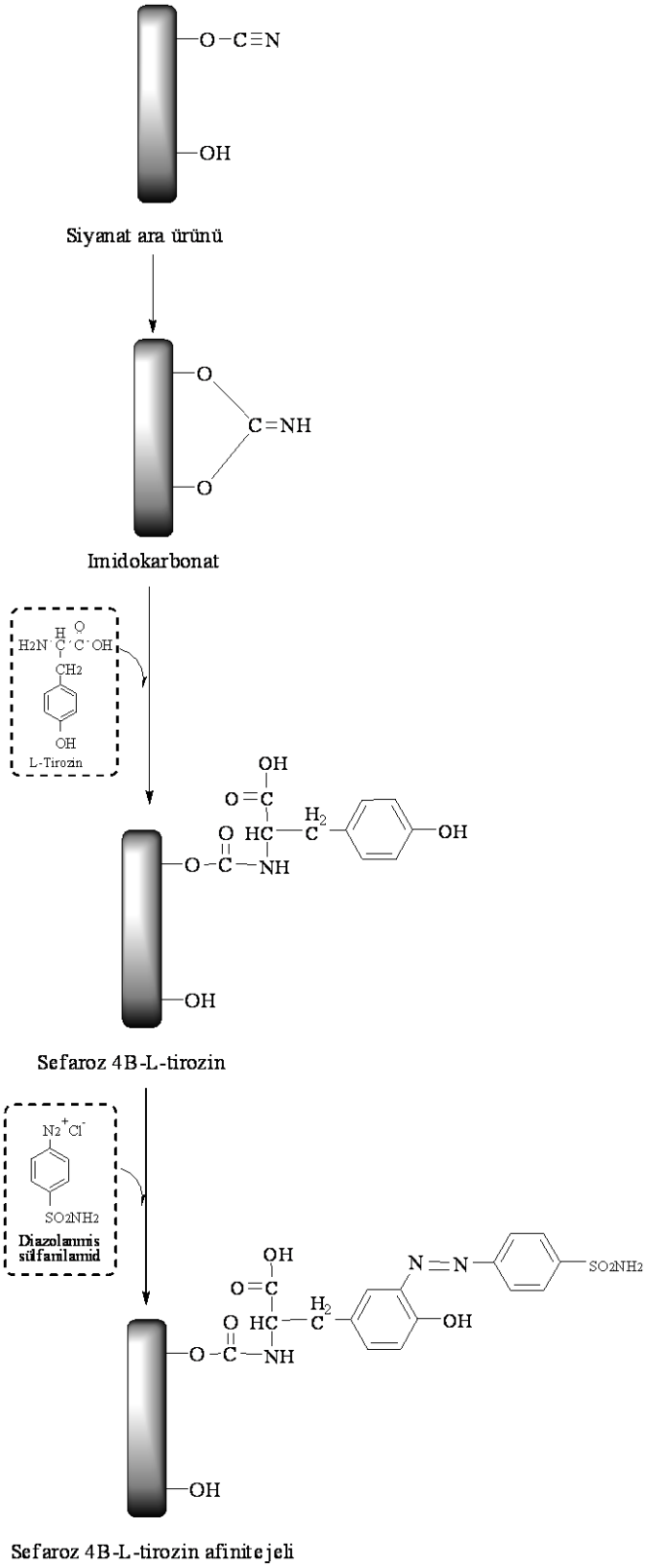
kolon materyaline L-Tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamit diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır.

Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

**CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye Tirozin takılması:** CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M $NaHCO_3$ tamponu (pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı.

Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlendi ve bundan sonra süspansiyon, $4^oC$'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca $4^oC$'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 ml 0,2 M $NaHCO_3$ tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

**Sülfanilamit kenetlendirilmesi:** 25 mg sülfanilamit, $0^oC$ civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg $NaNO_2$ bulunan $0^oC$'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-$SO_4$ (pH:7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterildi.




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

### 3.4.2.b. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### 3.4.2.c. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM $Na_2SO_4$ (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM $Na_2HPO_4$ (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek HCA-I enzimi daha sonra 0,1 M $NaCH_3COO$/0,5 M $NaClO_4$ (pH:5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip HCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.

## 3.5. CA Enzim Aktivitesi Tayini

### 3.5.1. Hidrataz aktivitesi

Hidrataz aktivitesi yöntemi modifiye edilmiş Wilbur-Anderson yöntemidir (1948). $CO_2$'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan $H^+$ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır (Rickli *et al*. 1964). Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1ml 0,025 M veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 ml % 0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml $CO_2$ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu.

Daha sonra bir kronometre yardımıyla $CO_2$ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi ($t_o$). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak $CO_2$ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi ($t_c$).

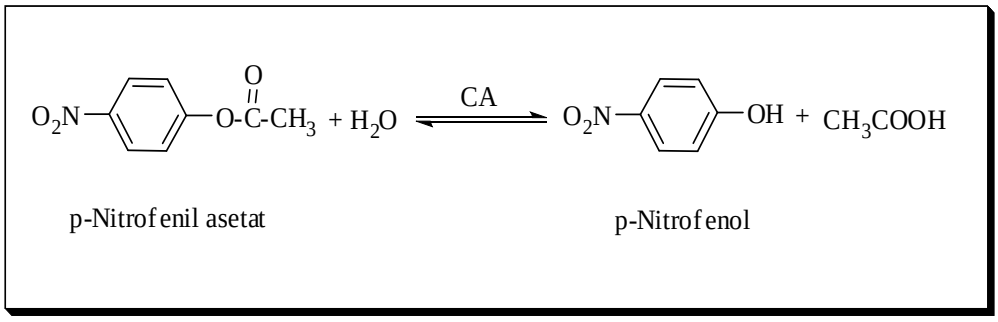
Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen $CO_2$ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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

### 3.5.2. Esteraz aktivitesi

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




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

348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki $H^+$ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

3 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

| **Kullanılan Maddeler** | **Kontrol Tüpü (Kör) (µl)** | **Numune Tüpü** |
|---|---|---|
| Tris-$SO_4$ (0,05 M, pH:7,4) | 1400 | 1400 |
| *p*-Nitrofenol asetat | 1000 | 1000 |
| Saf su | 600 | 500 |
| Enzim çözeltisi | - | 100 |
| Toplam hacim | 3000 | 300 |

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

| Kullanılan Maddeler | Kontrol Tüpü (Kör) (µl) | Numune Tüpü |
|---|---|---|
| Tris-$SO_4$ (0,05 M, pH:7,4) | 467 | 467 |
| *p*-Nitrofenol asetat | 333 | 333 |
| Saf su | 200 | 167 |
| Enzim çözeltisi | - | 33 |
| Toplam hacim | 1000 | 1000 |

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25$^{o}$C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişiğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

### 3.6. Protein Tayini

#### 3.6.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

### 3.6.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brillant Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlanarak 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu.

Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

## 3.7. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

### 3.7.1. Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

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

### 3.8. SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) metodu yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık dereceleri kontrol edildi (Laemmli 1970).

Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptoetanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konulup ve kıskaçlarla tutturulup jel hazırlama cihazına konuldu.

Cam plakaların altı agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra enjektörle plakalar arasına ilave edildi. Düzgün jel yüzeyi oluşturmak amacıyla %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu ve katılaşması için 15 dk bekletildi. Daha sonra yığma jeli yüzeye kadar ilave edildi ve üzerine numunelerin yerleştirilebilmesi için kuyular oluşturacak tarak yerleştirildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi.

Tanka yürütme tamponu ilave edildi, hazırlanan örnekler jeldeki yerlerine enjektörle tatbik edildi. Anot ve katot ayarlandıktan sonra yarım saat 80 voltta daha sonra 2 saat 120 voltta yürütme yapıldı. Jel cam plakalar arasından dikkatlice çıkarılarak daha sonra jele boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban *et al*. 2008).

**Ayırma jeli şöyle hazırlandı:** 5 ml 1 M Tris-HCl pH: 8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamit-%0,8 bisakrilamit, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, $(NH_4)_2S_2O_8$] eklendi.

**Yığma jeli şöyle hazırlandı:** 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH: 6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamit-%0,8 bisakrilamit, 0,03 ml % 0,1'lik SDS, 0,03 ml % 5'lik TEMED ve 2,45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

### 3.9. hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Fenolik Doğal Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesi

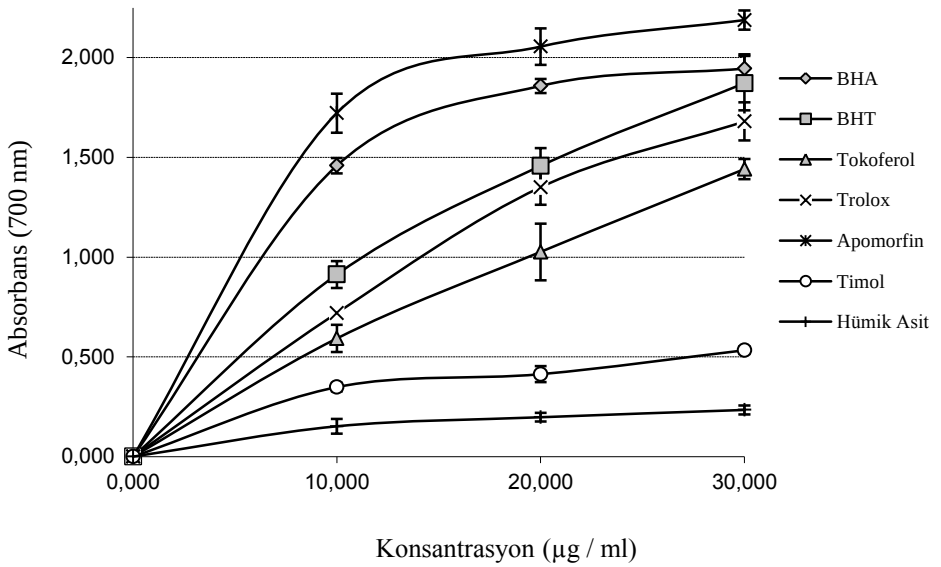
Yukarıda verilen fenolik doğal bileşiklerin, saflaştırılacak olan CA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hem hidrataz hem de esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. Daha sonra $I_{50}$ ve $K_i$ değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

## 4.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

### 4.1.1. $Fe^{3+}$- $Fe^{2+}$ indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (Gülçin 2006a; Gülçin *et al.* 2006a). Çalışmada kullanılan doğal fenolik bileşiklerin indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Fenoliklerin indirgeme potansiyelleri farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.1).



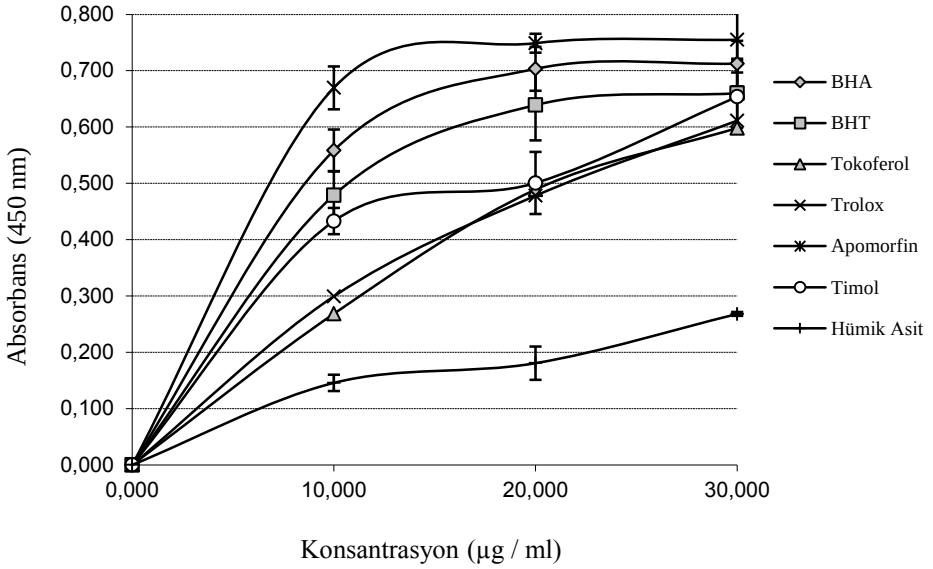

**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) doğal fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.1) her bir standart antioksidan ve fenolik bileşik için 20 μg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

Bu konsantrasyonda fenolik bileşikler ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları: Apomorfin > BHA > BHT > troloks > α-Tokoferol > Timol > Hümik asit şeklinde olduğu belirlendi. Ayrıca çizelge 4.1'de gösterilen yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

### 4.1.2. Kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) kupröz iyonlarına ($Cu^{+}$) indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları

Doğal fenolik çözeltilerinin kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kapasitesi, çözeltilerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Fenoliklerin kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30 μg/ml) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (Şekil 4.2). Fenolik çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.2) her bir standart ve fenolik bileşik için 20 μg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

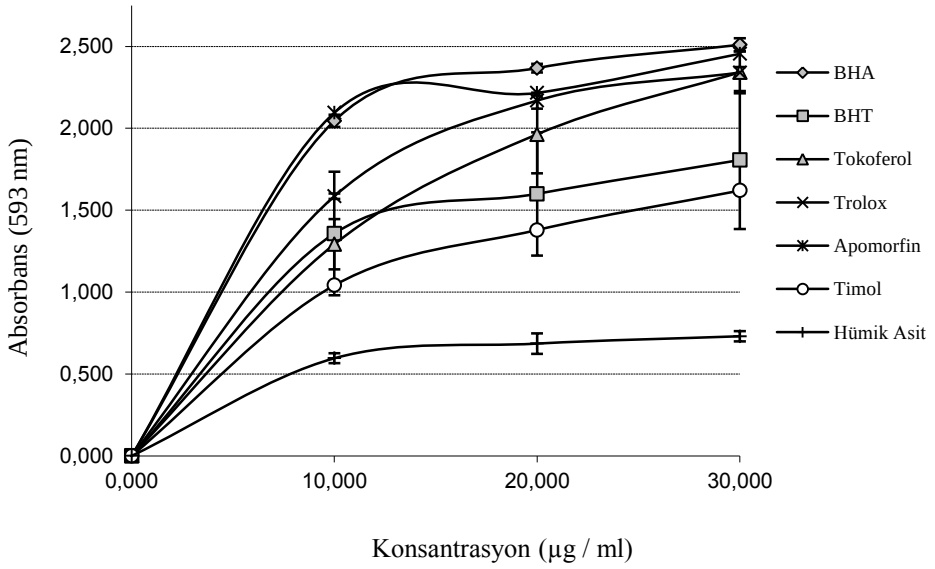



**Şekil 4.2.** Fenoliklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

20 µg/ml konsantrasyonunda fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları: Apomorfin > BHA > BHT > Timol > α-Tokoferol > Troloks > Humik asit.

### 4.1.3. Ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kuvveti (FRAP metodu) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottur. Bu metotta ferrik iyonları ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgenir. Oluşan ferröz ($Fe^{2+}$) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluştur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans gösterir. Fenolik bileşiklerin FRAP metoduna göre ferrik iyonları ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.3).




**Şekil 4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetlerinin (FRAP) birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Doğal fenolik bileşik çözeltilerinin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.3) her bir standart ve fenolik bileşik için 20 µg/ml'ye karşılık gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

20 µg/ml konsantrasyonunda fenoliklerin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları: BHA > Apomorfin > Troloks > α-Tokoferol > BHT > Timol > Hümik asit. Ayrıca Çizelge 4.1'de yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

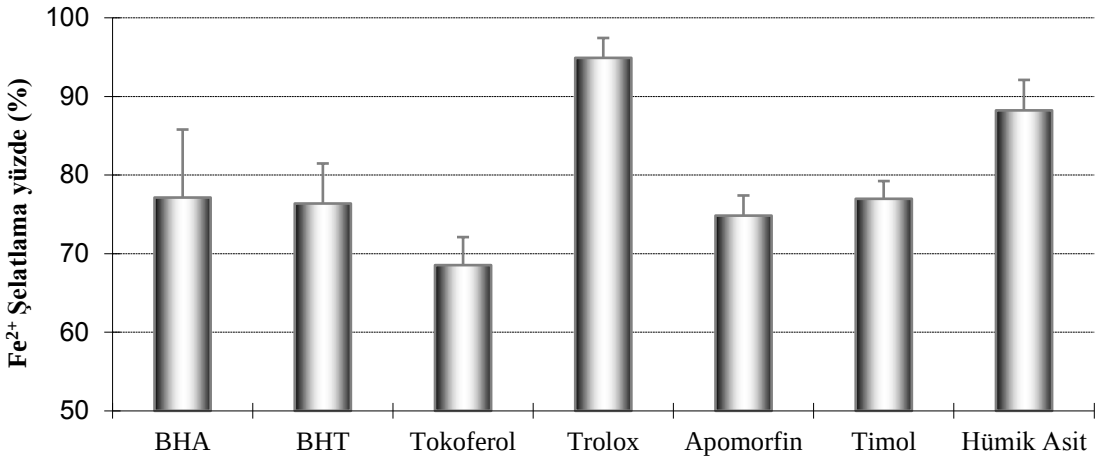
**Çizelge 4.1.** 20 µg/ml konsantrasyonunda fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ve kuprik ($Cu^{2+}$) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

| **Antioksdanlar** | **Absorbans (700 nm)** | **Absorbans (593 nm)** | **Absorbans (450 nm)** |
|---|---|---|---|
| BHA | 1,858 | 2,368 | 0,703 |
| BHT | 1,457 | 1,600 | 0,639 |
| α-Tokoferol | 1,026 | 1,963 | 0,489 |
| Troloks | 1,350 | 2,169 | 0,478 |
| Apomorfin | 2,055 | 2,216 | 0,749 |
| Timol | 0,413 | 1,379 | 0,501 |
| Hümik Asit | 0,197 | 0,686 | 0,181 |

### 4.1.4. Bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi bulguları

$Fe^{2+}$ şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının belirlediği metoda göre yapıldı. 0,25 ml $FeSO_4$ çözeltisi (2 mM), 0,120 ml fenolik doğal bileşik çözeltisi, 1 ml Tris-HCl tamponu (pH:7,4) 1,5 ml bipiridil çözeltisi (%0,2'lik 0,2M HCl içerisinde), 2,5 ml etanol ve 0,630 ml saf su içeren numunenin absorbansı 522 nm'de ölçüldü.

Fenolik doğal bileşiklerin ve standart antioksidanların metal şelatlama aktiviteleri bipiridil kullanılarak belirlendi. Bu tayinde konsantrasyona bağlı bir artış gözlenmedi 30 µg/ml konsantrasyonlarına karşılık gelen metal şelatlama yüzdeleri Şekil 4.4'da verildi.




**Şekil 4.4.** Fenolik doğal bileşiklerin (30 µg/ml) bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

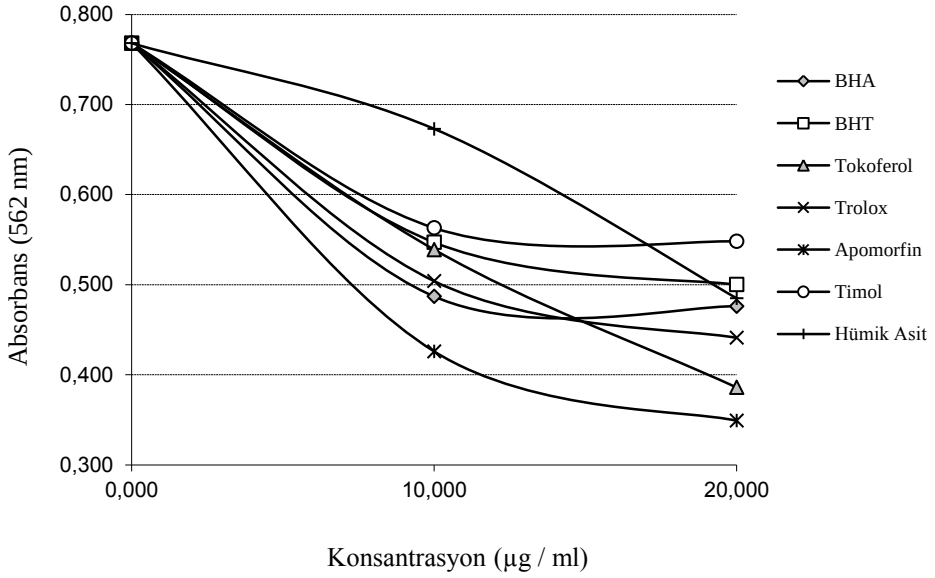
Aynı konsantrasyonda (30 µg/ml) apomorfin, timol ve humik asitin ve kullanılan standart antioksidan moleküller bipiridil metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları α-Tokoferol > Apomorfin > BHT > Timol > BHA > Humik asit > Troloks şeklinde olduğu gözlendi.

### 4.1.5. Ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi bulguları

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

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

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




**Şekil 4.5.** Fenolik doğal bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µg/ml) metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşiklerin metal iyonlarını şelatlama aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.5) her bir standart ve doğal fenolik bileşik için ayrı ayrı $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik doğal bileşiklerin ferröz iyonlarının ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

| **Standartlar ve fenolik bileşikler** | **[$IC_{50}$] (µg/ml)** |
|---|---|
| BHA | 24,57 |
| BHT | 28,87 |
| α-Tokoferol | 20,02 |
| Troloks | 22,64 |
| Apomorfin | 16,00 |
| Timol | 35,17 |
| Hümik Asit | 29,09 |

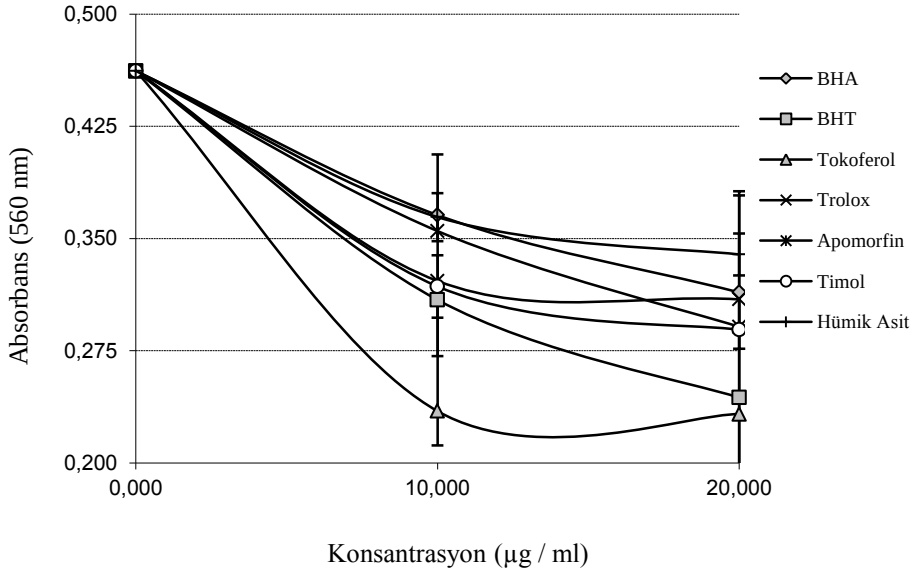
Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi sergilediler: Apomorfin > α-Tokoferol > Troloks > BHA > BHT > Humik asit > Timol.

### 4.1.6. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri riboflavin / metiyonin / ışık metoduna göre yapıldı. Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

$$O_2^{\bullet -} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = \left( \frac{\lambda_{560\text{–K}} - \lambda_{560\text{–N}}}{\lambda_{560\text{–K}}} \right) \times 100$$

Formülde verilen $\lambda_{560\text{-K}}$ kontrol nümunesinin absorbans değeridir. $\lambda_{560\text{-N}}$ ise çalışmada kullanılan antioksidan numunelerin absorbans değeridir (Gülçin *et al*. 2004b).




**Şekil 4.6.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşik çözeltilerinin (10–30 µg/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşiklerin süperoksit radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.6) her bir standart ve fenolik için ayrı ayrı $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler ve standart antioksidanların süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinde $IC_{50}$ değerleri

| **Antioksidanlar** | **[$IC_{50}$] (µg/ml)** |
|---|---|
| BHA | 34,47 |
| BHT | 20,62 |
| α-Tokoferol | 16,90 |
| Troloks | 29,74 |
| Apomorfin | 29,11 |
| Timol | 26,45 |
| Hümik asit | 40,52 |

Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidanlar sırasıyla şu şekilde süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi sergilediler: α-Tokoferol > BHT > Timol > Apomorfin > Troloks > BHA > Humik asit.

### 4.1.7. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Fenolik bileşikler ve çalışmada kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivite tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2$: 0,9966, Şekil 4.7).

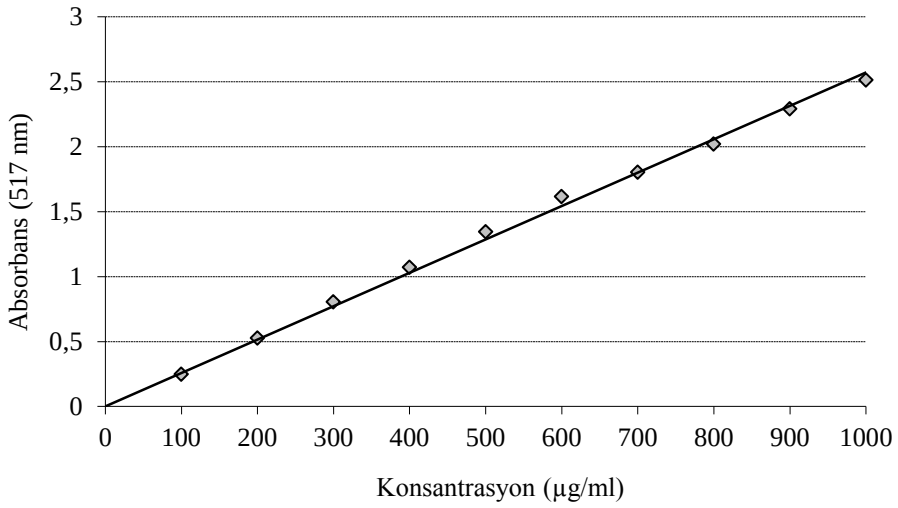
DPPH radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{517\text{nm}}) = 0{,}0026\text{x } [\text{DPPH}]$$

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

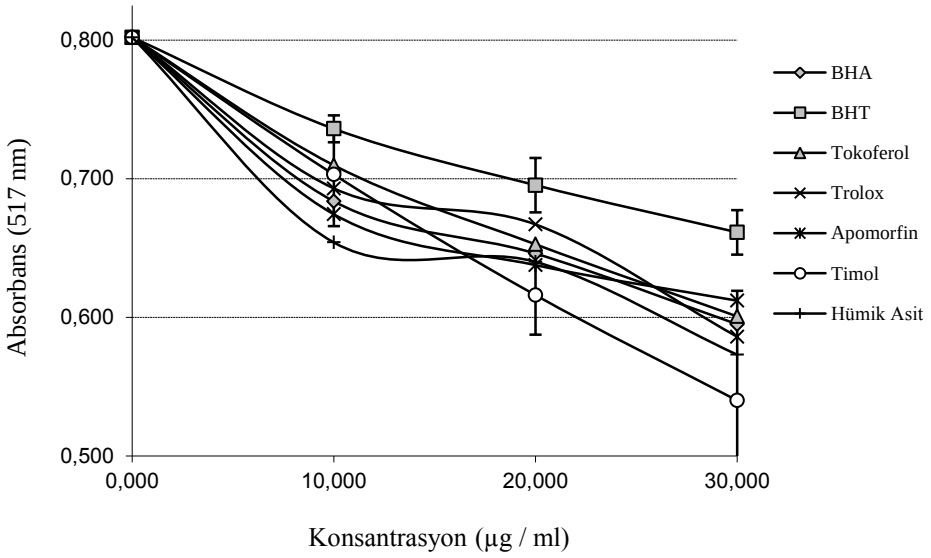
$$\text{DPPH} \cdot \text{giderme aktivitesi (\%)} = \left(1 - \frac{\lambda_{517\text{-N}}}{\lambda_{517\text{–K}}}\right) \times 100$$

Burada $\lambda_{517\text{-N}}$ DPPH radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $\lambda_{517\text{-K}}$ ise sadece DPPH radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı.




**Şekil 4.7.** DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart DPPH grafiği

Fenolik bileşik çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.8' da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.




**Şekil 4.8.** Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşik çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.8) her bir standart ve fenolik bileşik için ayrı ayrı $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** Fenolik bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

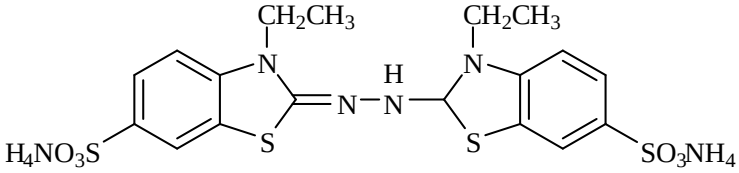
| **Antioksidanlar** | **[$IC_{50}$] (µg/ml)** |
|---|---|
| BHA | 65,37 |
| BHT | 80,00 |
| α-Tokoferol | 69,30 |
| Troloks | 66,63 |
| Apomorfin | 67,28 |
| Timol | 44,55 |
| Hümik asit | 58,23 |

Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH serbest radikali giderme aktivitesi sergilediler: Timol > Hümik asit > Troloks > BHA > α-Tokoferol > Apomorfin > BHT .

### 4.1.8. ABTS serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi de sulu karışımların, içeceklerin, ekstrelerin veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller *et al.* 1996; Gülçin *et al.* 2007a). Bunun için öncellikle ABTS'den $ABTS^{\bullet+}$'nin oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 4.9 'de görülmektedir. Bu amaçla bir erlen içerisinde 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin 2007).

Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı. Manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbans değeri 0.750±0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi.




**Şekil 4.9.** ABTS'nin açık kimyasal yapısı

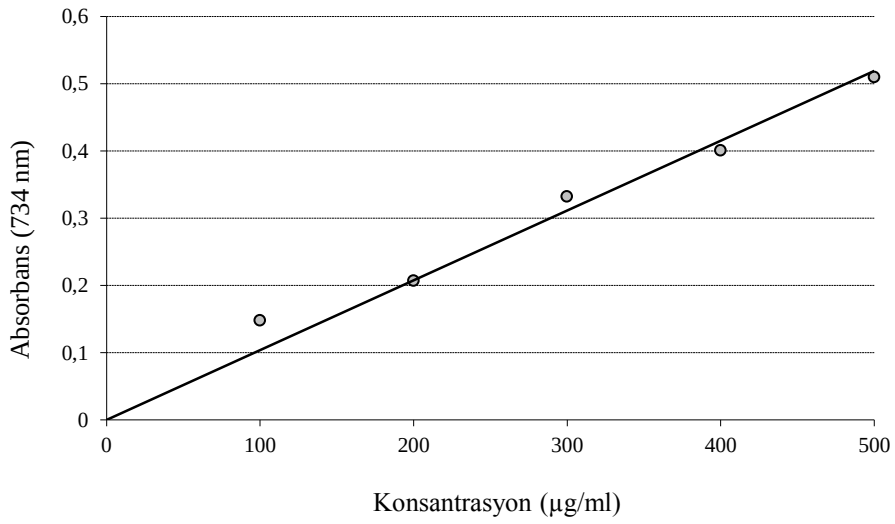
Bu aşamadan sonra fenolik asitlerle çalışmada kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2$:0,9688, Şekil 4.10). $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan $ABTS^{\bullet+}$ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda da verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{734\text{nm}}) = 0{,}001 \text{ x } [\text{ABTS}^{\bullet+}]$$

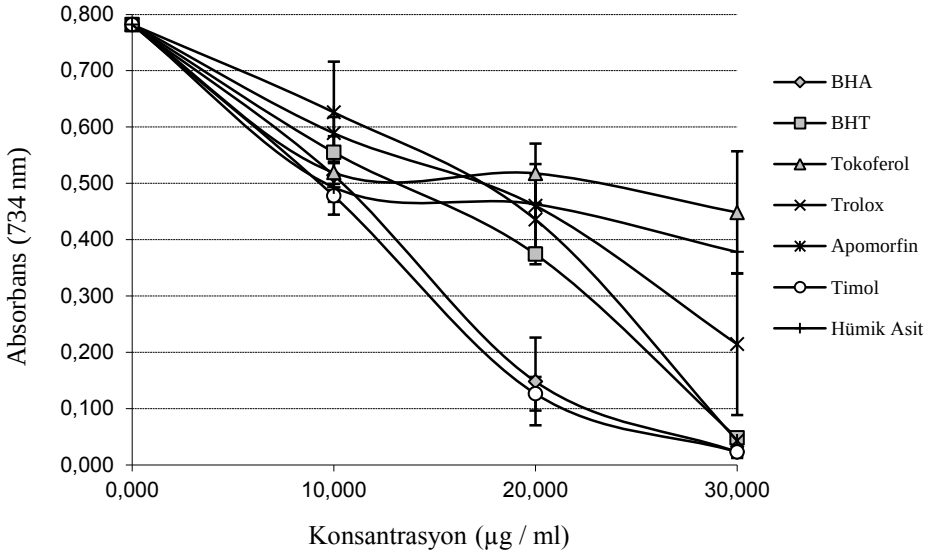
$ABTS^{\bullet+}$ giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada $\lambda_{734\text{-N}}$ $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $\lambda_{734\text{-K}}$ ise sadece $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.11).




**Şekil 4.10.** $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayininde kullanılan $ABTS^{\bullet+}$ için hazırlanan standart grafik




**Şekil 4.11.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin (10-30 µg/ml) $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşik çözeltilerinin $ABTS^{\bullet+}$ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.11) herbir standart ve fenolik bileşik için ayrı ayrı $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesinde $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

| **Antioksidanlar** | **[$IC_{50}$] (µg/ml)** |
|---|---|
| BHA | 14,37 |
| BHT | 16,85 |
| α-Tokoferol | 33,47 |
| Troloks | 21,60 |
| Apomorfin | 17,85 |
| Timol | 14,06 |
| Hümik asit | 26,25 |

Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi sergilediler: Timol > BHA > BHT > Apomorfin > Troloks > Hümik asit > α-Tokoferol.

### 4.1.9. DMPD serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Çalışmalarda kullanılan fenolik bileşik çözeltileri, BHA ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik hazırlandı ($r^2$:0.9725, Şekil 4.12).

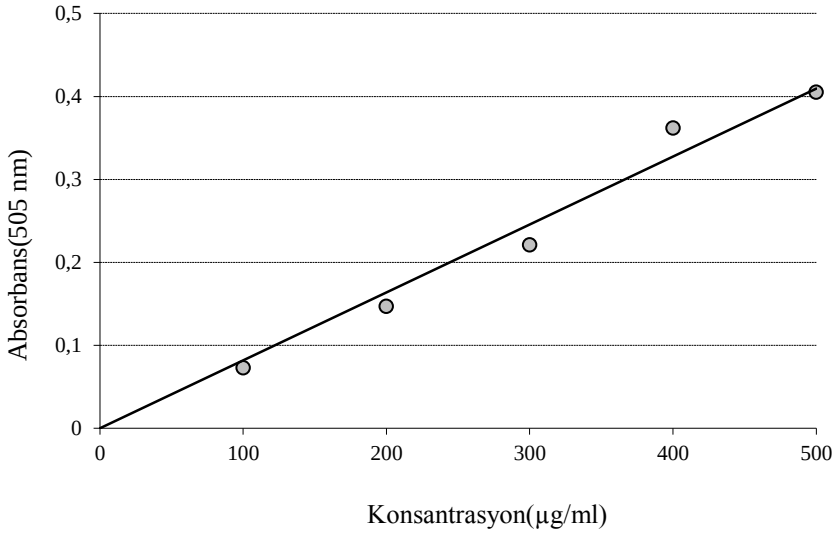
$DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan $DMPD^{\bullet+}$ miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{505nm}) = 0{,}0008 \text{ x } [DMPD^{\bullet+}]$$

$DMPD^{\bullet+}$ miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

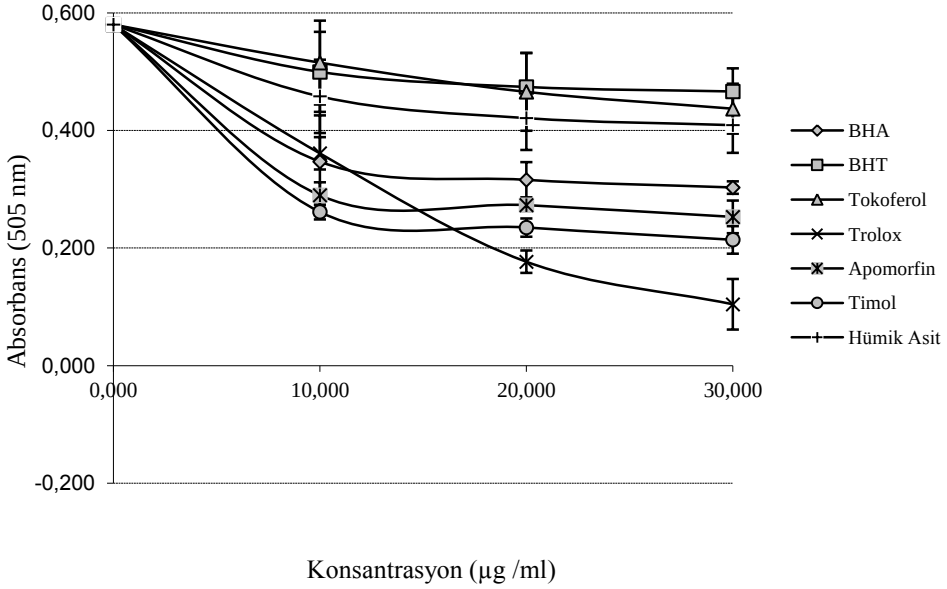
$$[DMPD^{\bullet+}] \text{ giderme aktivitesi } (\%) = \left(1 - \frac{\lambda_{505-N}}{\lambda_{505-K}}\right) \times 100$$

Burada $\lambda_{505\text{-}N}$, $DMPD^{\bullet+}$ çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, $\lambda_{505\text{-}K}$ ise sadece $DMPD^{\bullet+}$ çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı (Şekil 4.13).




**Şekil 4.12.** $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

Fenolik bileşik çözeltilerinin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi Şekil 4.13' te görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.




**Şekil 4.13.** Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Fenolik bileşiklerin $DMPD^{\bullet+}$ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.13) her bir fenolik bileşik ve standart için ayrı ayrı $IC_{50}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Fenolik bileşiklerin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitelerinin $IC_{50}$ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırmaları

| **Antioksidanlar** | **[$IC_{50}$] (µg/ml)** |
|---|---|
| BHA | 26,34 |
| Troloks | 12,13 |
| Apomorfin | 20,68 |
| Timol | 17,32 |
| Hümik asit | 50,58 |

Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi sergilediler: Troloks > Timol > Apomorfin > BHA > Hümik asit.

Anlatılan antioksidan metotlarda grafiklerdeki üstel denklemler kullanılarak $IC_{50}$ değerleri hesaplandı.

### 4.1.10. Total Antioksidan aktivitesi bulguları

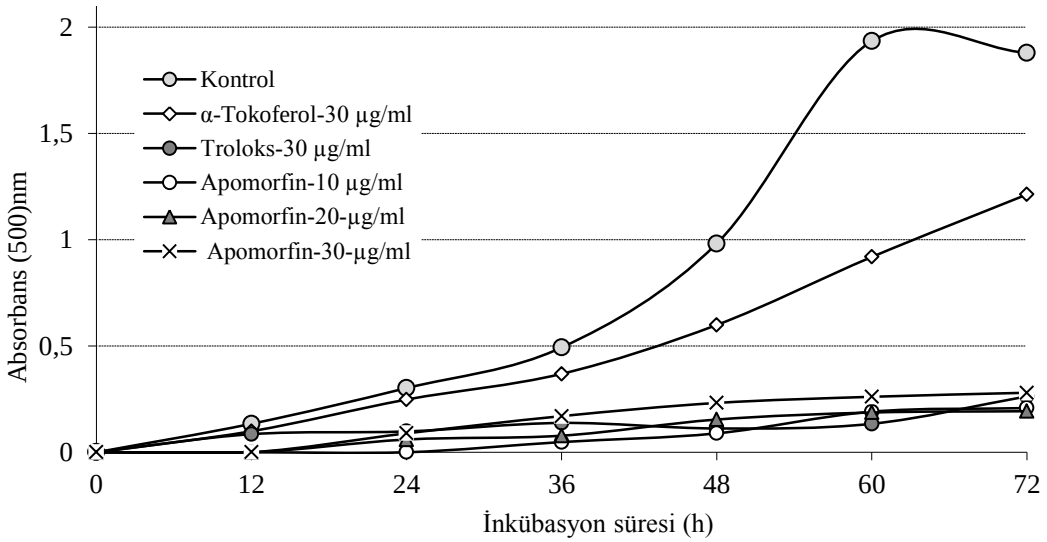
Doğal fenolik bileşiklerin total antioksidan aktivitesi "Tiosiyanat Metoduna" göre belirlendi. Bu metotta linoleik asit emülsiyonunun oto-oksidasyonu sonucu oluşan peroksitler ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) ferik iyonlarına ($Fe^{3+}$) yükseltger. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları ($Fe^{3+}$) tiyosiyanat ($SCN^{-}$) ile $Fe(SCN)^{2+}$ kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleksin ise spektrofotometrik olarak 500 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasiyon sonucu oluşan peroksit miktarının fazlalığını gösterir. Total antioksidan aktivite her bir fenolik bileşik için 10-30 µg/ml konsantrasyonlarındaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin 500 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.14, 4.15, 4.16).

Şekillerde de görüldüğü gibi antioksidan aktivite, fenolik bileşiklerin artan miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Doğal fenolik bileşikler ile standart antioksidan moleküllerin 500 nm'deki absorbansları aynı şekilde ölçülmüştür.

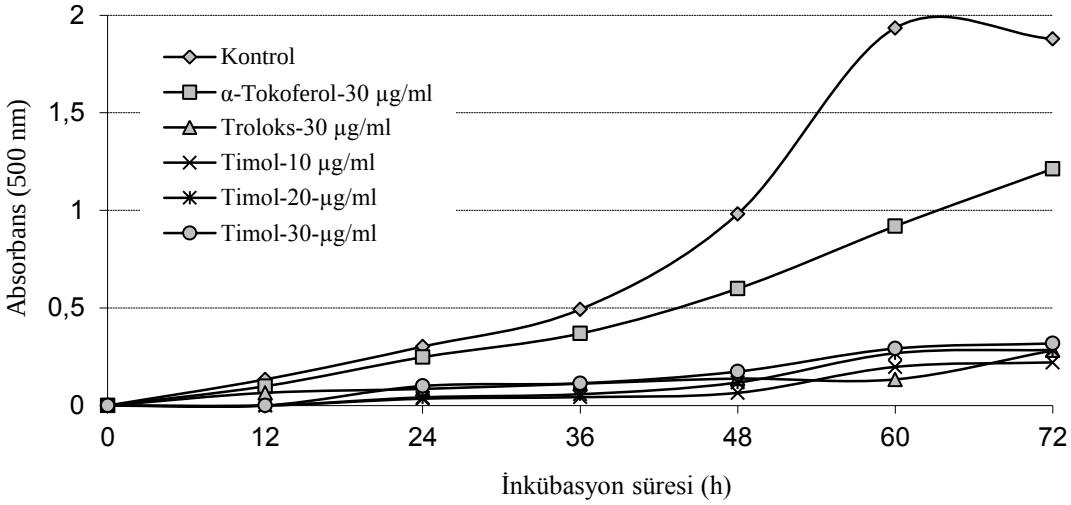
Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

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

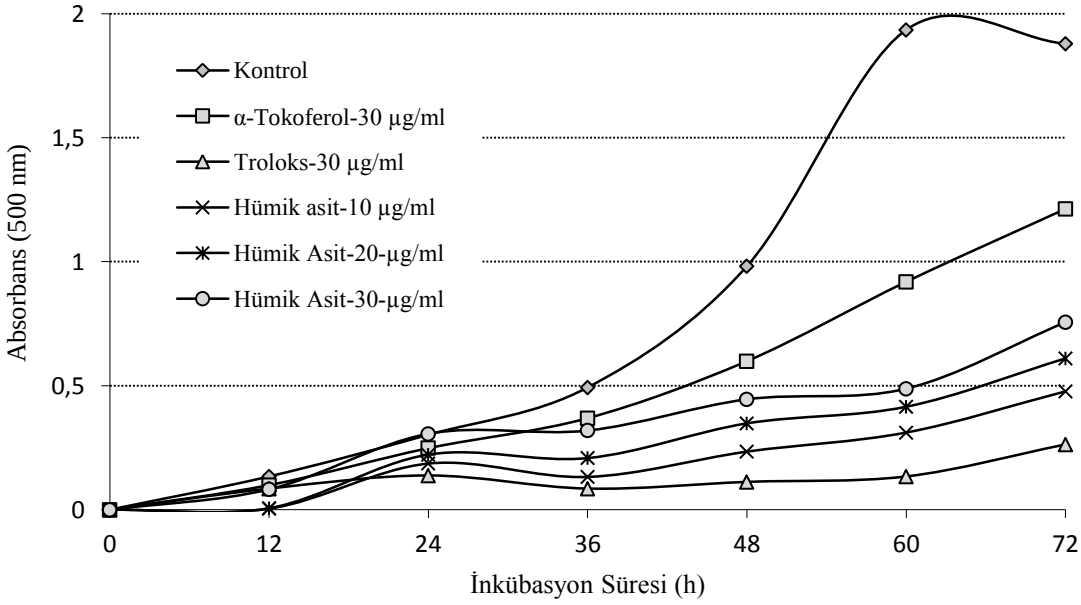
Burada $\lambda_{500\text{-N}}$, numune veya standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değeri, $\lambda_{500\text{-K}}$ ise linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorbans değeri ifade eder. Pozitif kontrol olarak α-tokoferol ve troloks kullanıldı.




**Şekil 4.14.** Apomorfinin (10-30 µg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması




**Şekil 4.15.** Timolün (10- 30 µg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması




**Şekil 4.16.** Hümik asitin (10-30 µg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

Doğal fenolik bileşiklerin, total antioksidan aktivite bulguları sonucu elde edilen lipit peroksidasyon inhibisyon (%) değerlerine göre 30 µg/ml ve 60. saate karşılık gelen % giderme aktivitesi değerleri hesaplandı (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların 30 µg/ml ve 60. saate karşılık gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri

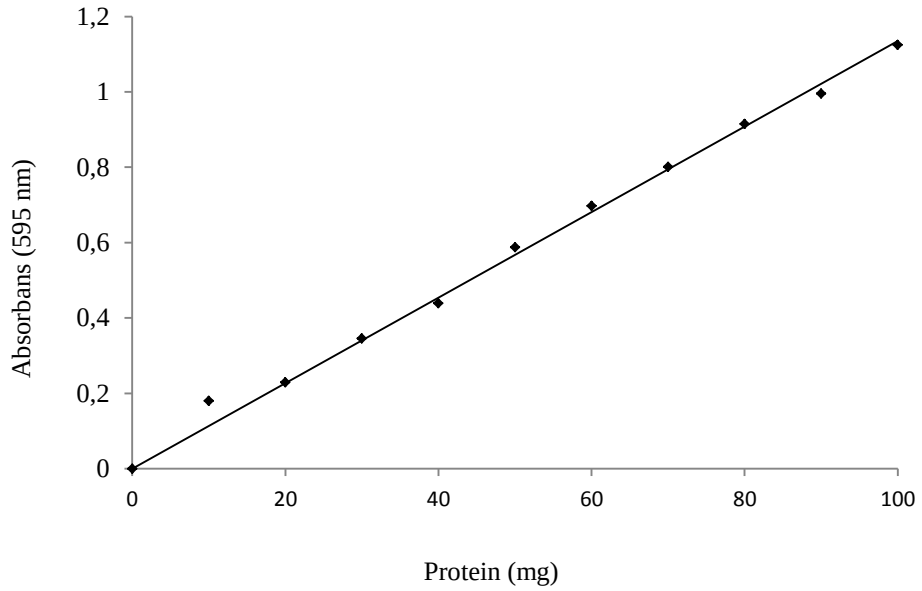
| **Antioksidanlar** | **% giderme (30 µg/ml - 60 h)** |
|---|---|
| α-Tokoferol | 52,51 |
| Troloks | 93,07 |
| Apomorfin | 86,51 |
| Timol | 84,90 |
| Hümik asit | 74,78 |

Linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı hümik asit için %74,9, timol için %84,9, apomorfin için %86,5 iken troloks için %93,1 ve α-tokoferol için %52,5 olarak bulunmuştur. Buna göre doğal fenolik bileşiklerin total antioksidan aktivite kapasitesi karşılaştırıldığında: Troloks > Apomorfin > Timol > Hümik asit > α-Tokoferol olarak belirlenmiştir.

## 4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

### 4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brillant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brillant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.17'den elde edilen denklemden hesaplandı ($r^2$ : 0,996).

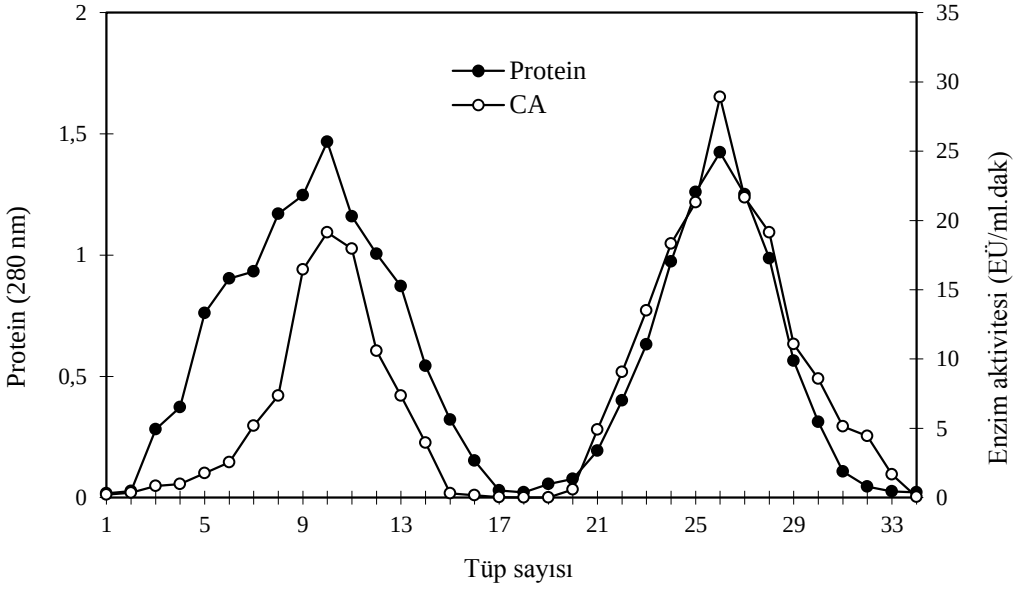



**Şekil 4.17.** Coomassie Brillant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak hazırlanan protein tayini için hazırlanan standart grafik

### 4.2.2. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması Sonuçları

İnsan eritrositlerinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı. Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona yüklendi.

Kolondan önce 1 M NaCl/25 mM $Na_2HPO_4$ (pH:6,3) tamponu geçirilerek hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M $NaCH_3COO$/0,5 M $NaClO_4$ (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için $CO_2$ hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.18' de gösterildi.




**Şekil 4.18.** İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/25 mM $Na_2HPO_4$ pH:6,3 ve 0,1 M $NaCH_3COO$/0,5 M $NaClO_4$ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği (Kolon çapı 1,3 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml)

### 4.2.3. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları

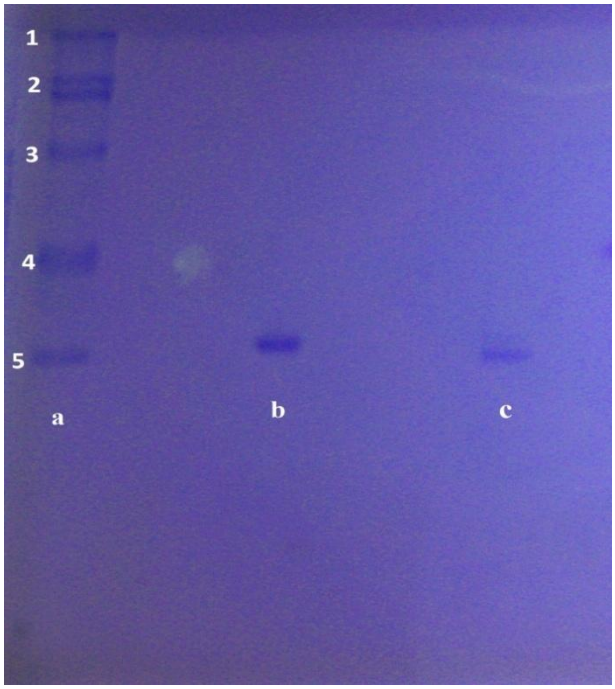
İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er ml numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brillant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizatın Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterildi.

**Çizelge 4.8.** Afinite kolonundan insan kanından elde edilen enzim hemolizatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

| Saflaştırma Basamakları | Aktivite (EU/ml) | Toplam hacim (ml) | Protein (mg/ml) | Toplam protein (mg) | Toplam aktivite (EU) | Spesifik akivite (EU/mg) | Verim (%) | Saflaştırma katsayısı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Hemolizat** | 144 | 30 | 23,55 | 706.5 | 4320 | 6.11 | 100 | 1 |
| **Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolon kromatografisi** CA I | 428 | 6 | 0,36 | 2,16 | 2568 | 1188,9 | 59,4 | 194,5 |
| CA II | 712 | 4 | 0,14 | 0,56 | 2848 | 5085,7 | 65,9 | 832,4 |

### 4.2.4. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi daha önce anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezine insandan saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.19).

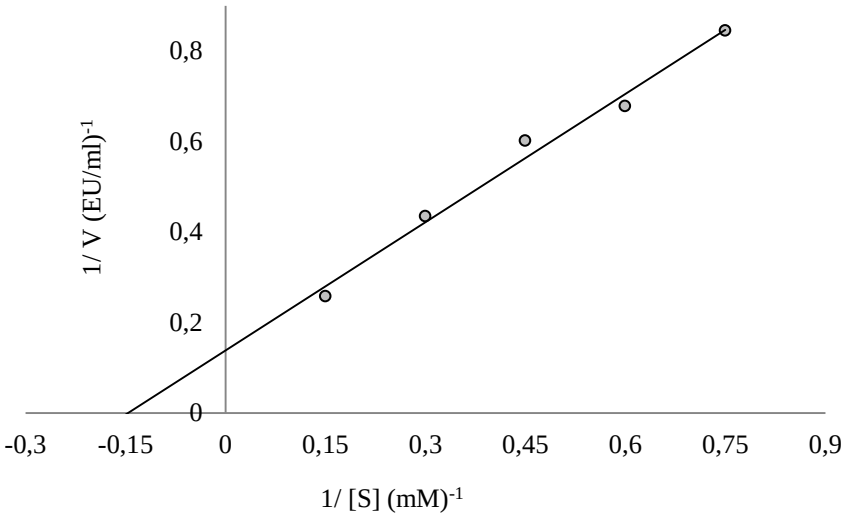



**Şekil 4.19.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı
***a:** Standart proteinler (**1:** 116 kDa β-Galaktozidaz (*E. Coli)*, **2:** 97 kDa fosforilaz (tavşan kası), **3:** 66 kDa Albumin (sığır), **4:** 45kDa Albumin (Ovalbumin), **5:** 29 kDa karbonik anhidraz (sığır eritrositi), **b:** hCA-I, **c:** hCA-II)

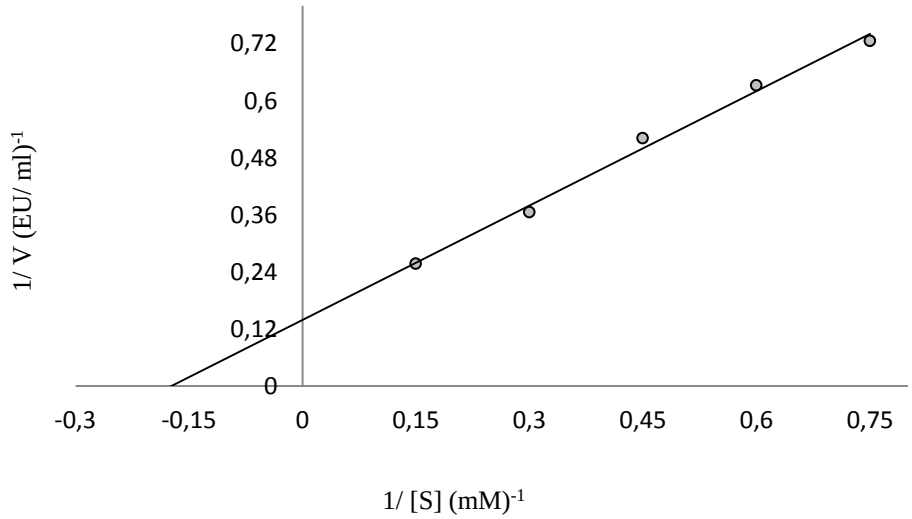
### 4.2.5. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmaların sonuçları

#### 4.2.5.a. Enzim için $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmaların sonuçları

İnsan kanından saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin belirlenmesi için enaz 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek ve bu grafiklerden her bir izoenzim için $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri hesaplandı (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).




**Şekil 4.20.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği




**Şekil 4.21.** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA-II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak bulundu. hCA-I izoenzimi için $K_m$ 6,82 mM, $V_{max}$ ise 7,22 EU/ml.dak olarak hesaplandı. hCA-II izoenzimi için $K_m$ 5,79 mM, $V_{max}$ ise 7,21 EU/ml.dak olarak hesaplandı.

### 4.2.6. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine doğal fenolik bileşiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapılan çalışma sonuçları

### 4.2.6.a. hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-I izoenzimi için 3 farklı fenolik asitin, saflaştırılan hCA-I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir doğal fenolik bileşik için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizildi.

Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ($I_{50}$ değerleri) hesaplandı.

Şekil 4.21'den elde edilen $y=100e^{-5,36x}$ denkleminde hümik asit için $I_{50}$ değerinin nasıl bulunduğunu hesaplarsak;

$y=100e^{-5,36x}$ (y = Enzim aktivitesi; x = Hümik asit konsantrasyonu = [ Hümik asit] (mM))

y yerine $I_{50}$'yi ifade eden %50'yi koyulursa; $50 = -100^{-5,36[\text{Hümik Asit}]}$

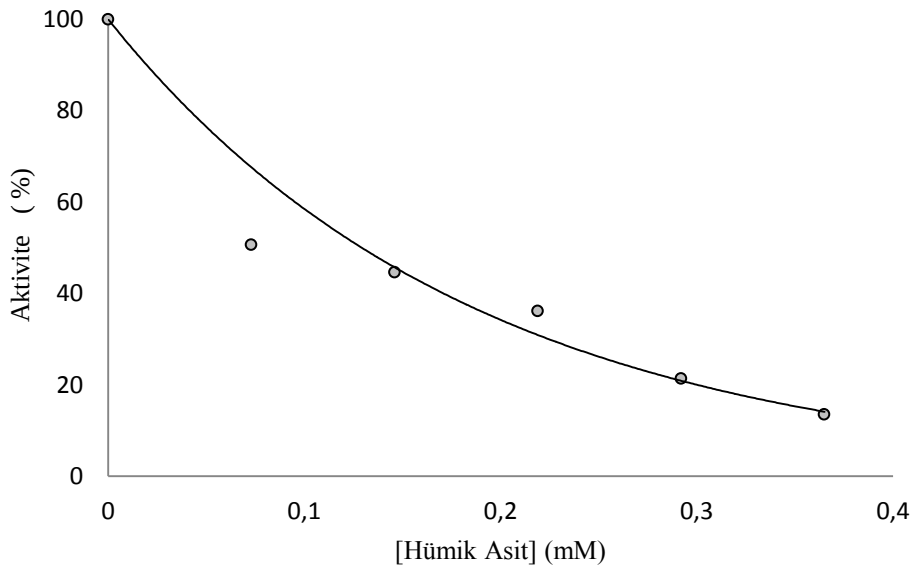
$50 = -100^{-5,36\times[\text{Hümik asit}]}$ (Eşitliğin her iki tarafıda 100'e bölünür ve ln logaritması alınırsa )

$\ln(e^{-5,36\times[\text{Hümik asit}]}) = \ln 0,504$ (ln 0,504= -0,684'dür)

$-5,36\times[\text{Hümik asit}] = -0,684$

$$[\text{Hümik asit}] = \frac{-0,684}{-5,36} \Rightarrow [\text{Hümik asit}] = 0,127\text{mM}$$

Hümik asit için $I_{50}$=0,127 mM olarak bulunur.

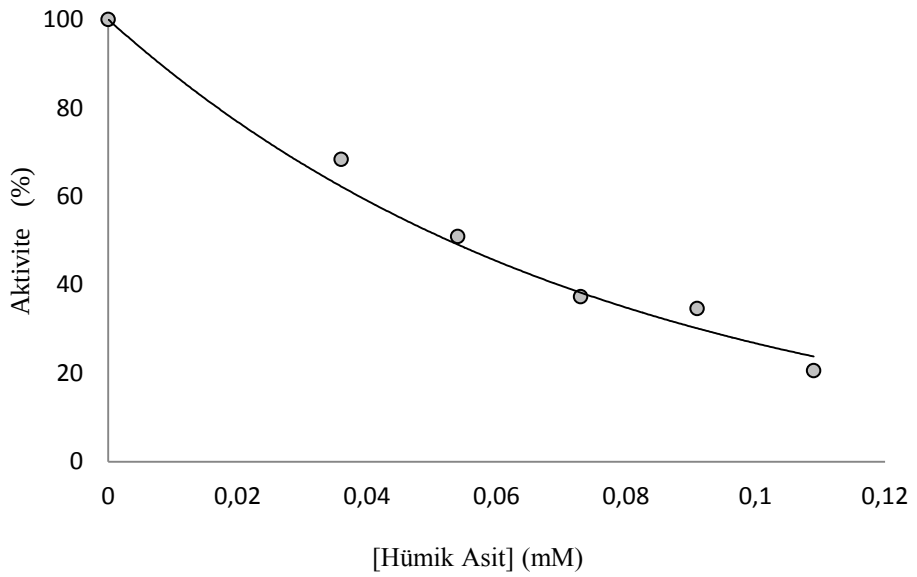



**Şekil 4.22.** hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda $I_{50}$ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği

### 4.2.6.b. hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-II izoenzimi için 3 farklı doğal fenolik bileşiğin, saflaştırılan hCA-II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik için aktivite(%)-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ($I_{50}$ değerleri) hesaplandı.




**Şekil 4.23.** hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda $I_{50}$ değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Hümik asit] grafiği

### 4.2.6.c. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerin $[I]_{50}$ değeri sonuçları

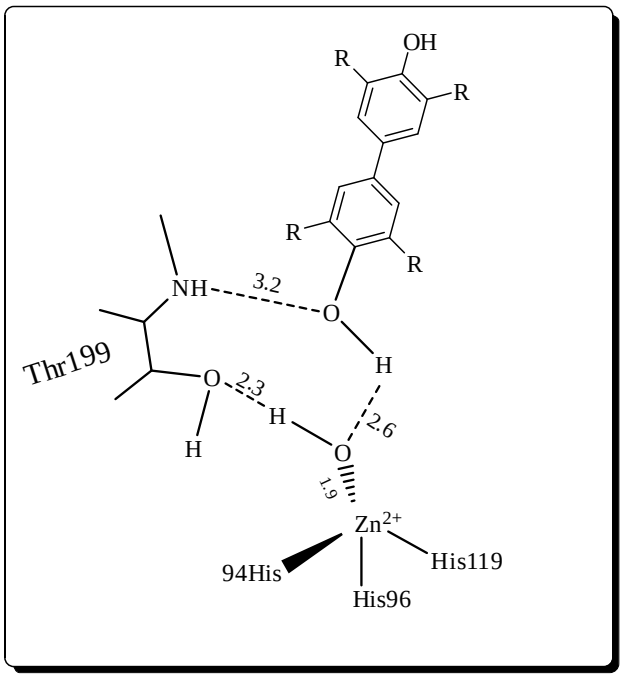
% Aktivite-[I] grafikleri çizilen her bir fenolik bileşiğin daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ($I_{50}$ değerleri) hesaplandı. Tüm verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için bu değerler bir tablo halinde gösterildi (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ($I_{50}$ değerleri)

| **[I] (mM)** | Hümik asit |
|---|---|
| **[$I_{50}$] hCA-I** | 0,127 |
| **[$I_{50}$] hCA-II** | 0,052 |

***** Hidrataz aktivitesi tayini sonuçlarına göre apomorfin ve timol fenolik doğal bileşiklerinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği saptanmıştır.

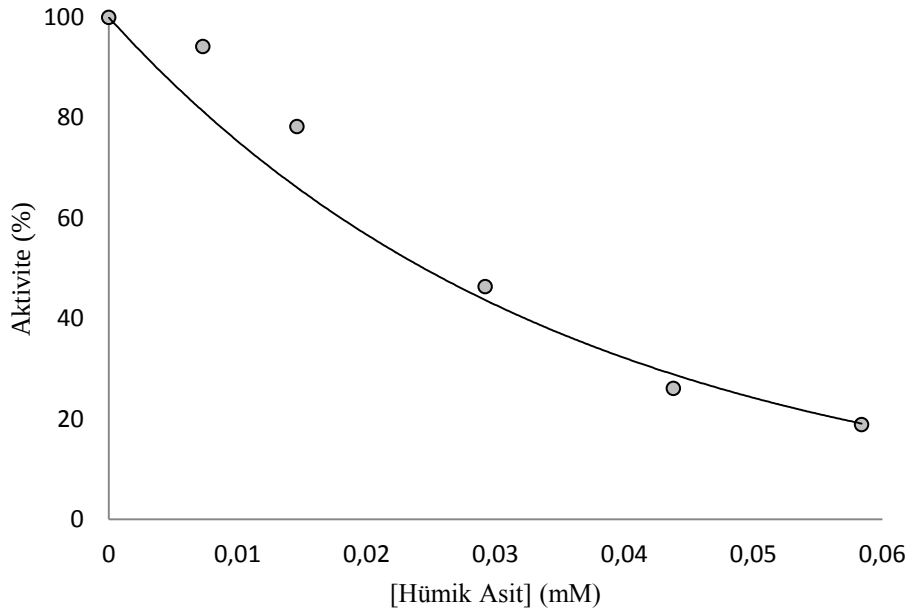
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ iyonuna hidroksil ve metoksi gruplarının iyonik etkileşmeyle veya direk bağlanarak inhbisyon gösterdiği sanılmaktadır. İnhibitörlerin bağlanma modeli aşağıdaki gibi önerilmiştir (Şentürk *et al.* 2009).



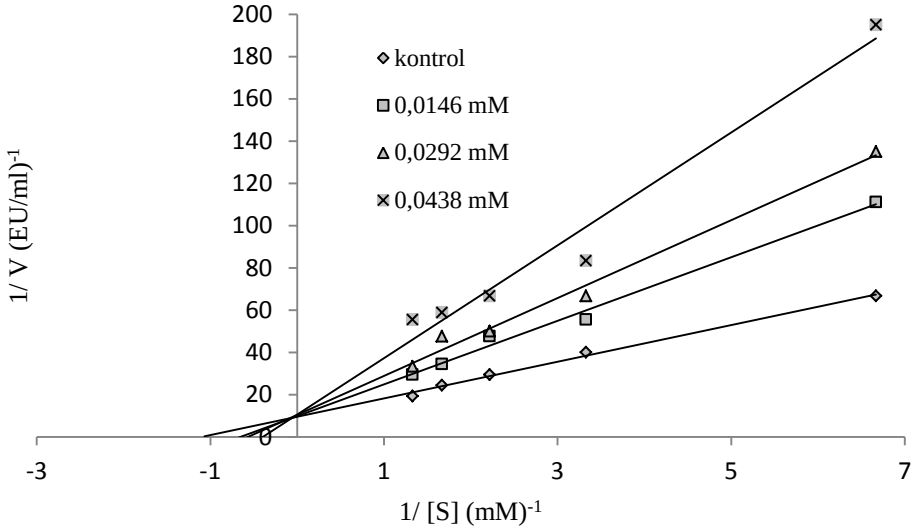

**Şekil 4.24.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ iyonuna fenolik antioksidan inhibitörlerin bağlanma modeli

### 4.2.6.d. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları

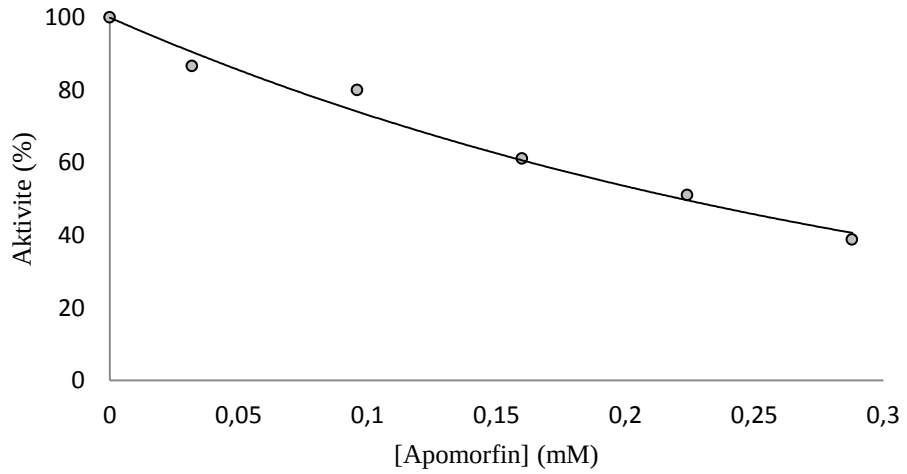
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-I izoenzimi için 3 farklı doğal fenolik bileşiğin, saflaştırılan hCA-I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik için aktivite(%)-[I] ve $K_i$ grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir fenolik bileşik için $K_i$ değerleri hesaplandı.



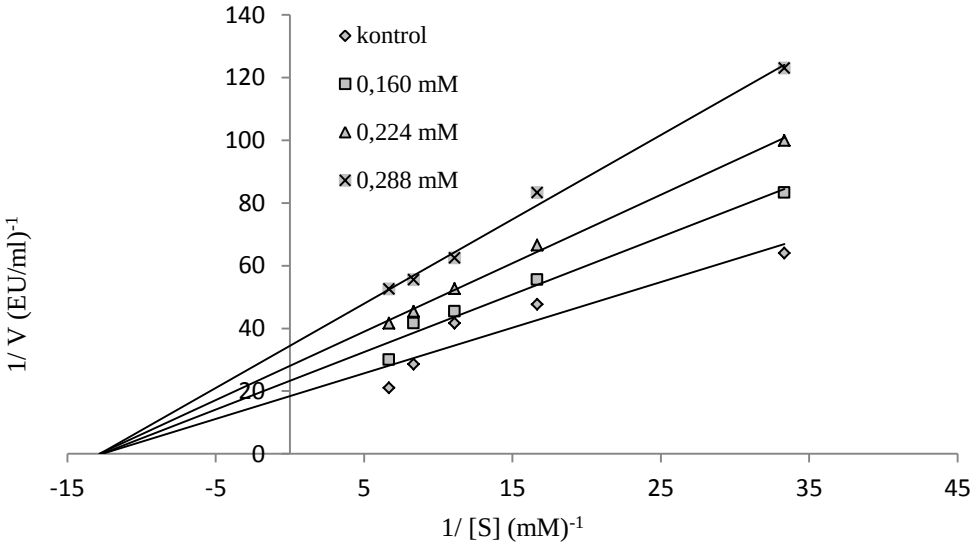

**Şekil 4.25.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği



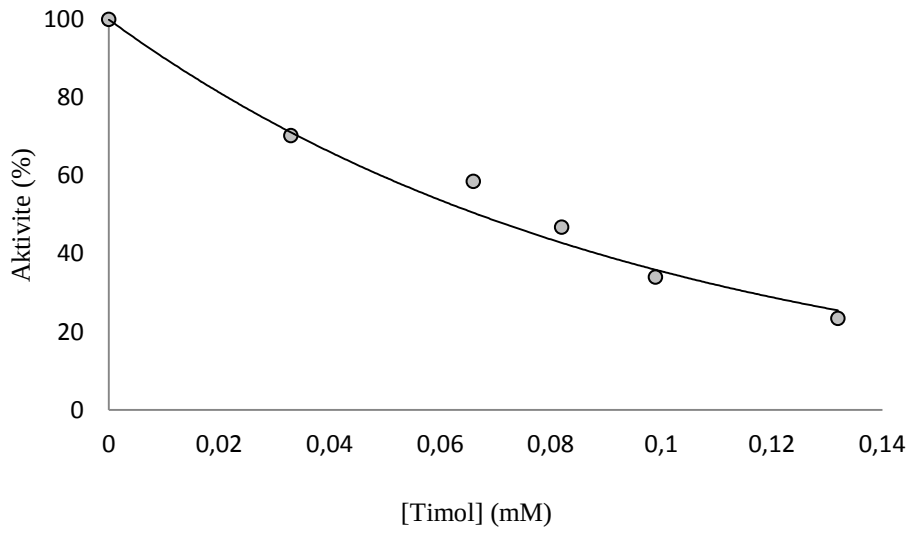

**Şekil 4.26.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



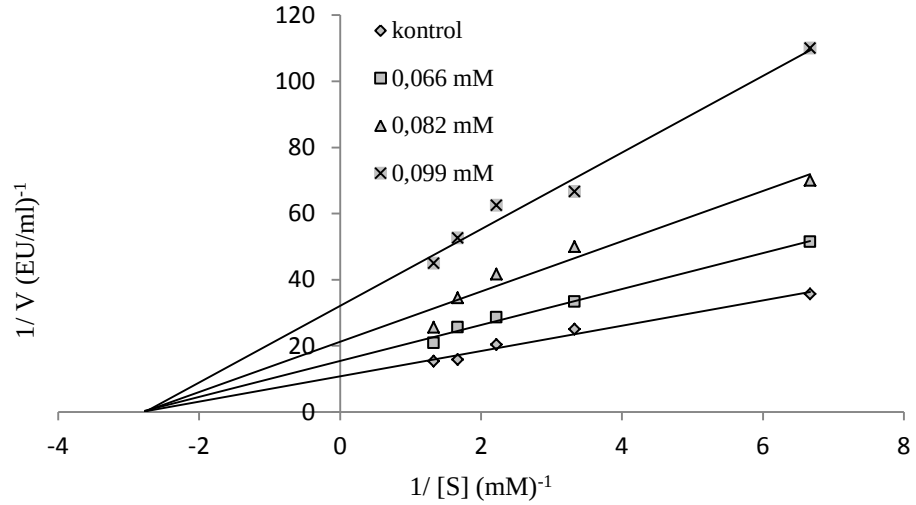

**Şekil 4.27.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorfin] grafiği




**Şekil 4.28.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği




**Şekil 4.29.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği




**Şekil 4.30.** hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

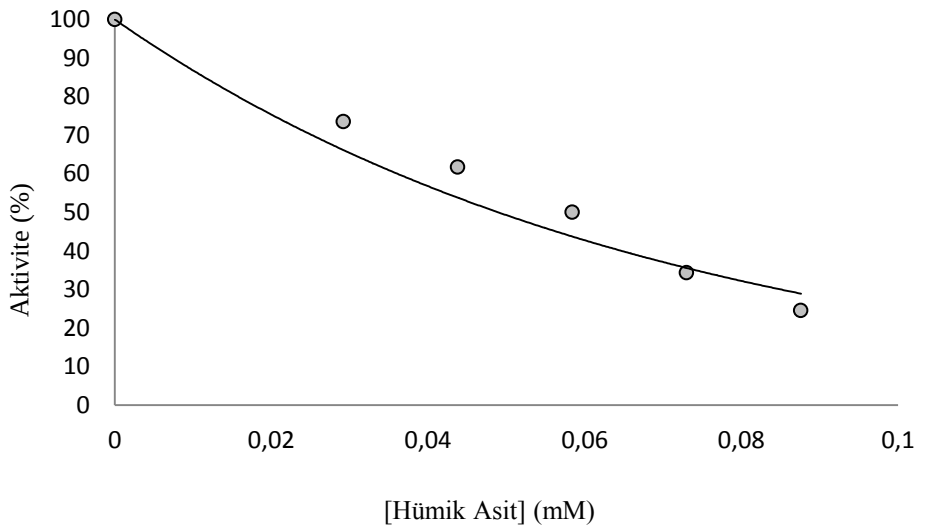
**Çizelge 4.10.** hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin $K_i$ değerleri ve inhibisyon türleri

| İnhibitör | $I_{50}$ (mM) | [I] (mM) | $K_i$ değerleri | Ortalama $K_i$ (mM) | İnhibisyon türü |
|---|---|---|---|---|---|
| Hümik asit | 0,024 | 0,015 | 0,022 | 0,0205±0,005 | Yarışmalı |
| | | 0,029 | 0,015 | | |
| | | 0,044 | 0,024 | | |
| Apomorfin | 0,219 | 0,160 | 0,611 | 0,457±0,142 | Yarışmasız |
| | | 0,224 | 0,430 | | |
| | | 0,288 | 0,331 | | |
| Timol | 0,066 | 0,066 | 0,154 | 0,096±0,053 | Yarışmasız |
| | | 0,082 | 0,085 | | |
| | | 0,099 | 0,050 | | |

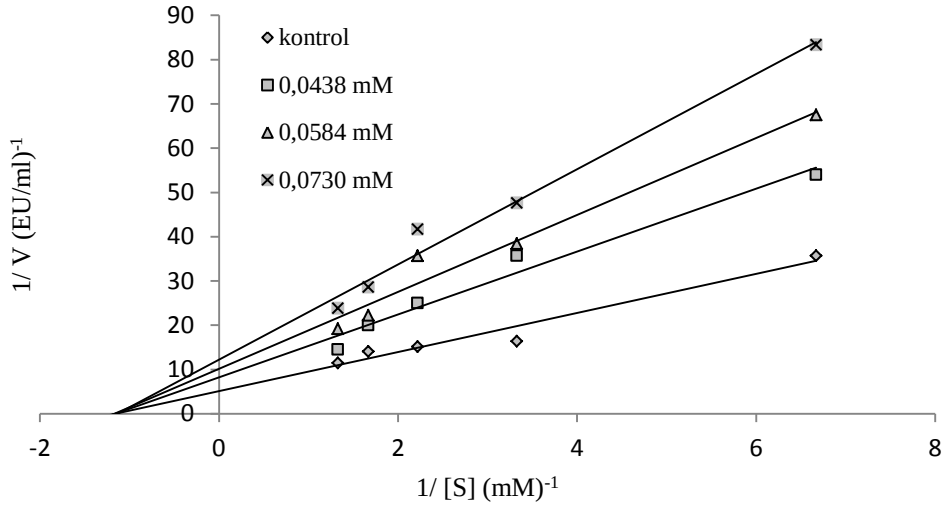
### 4.2.6.e. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-II izoenzimi için 3 farklı fenolik bileşiğin, saflaştırılan hCA-II izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

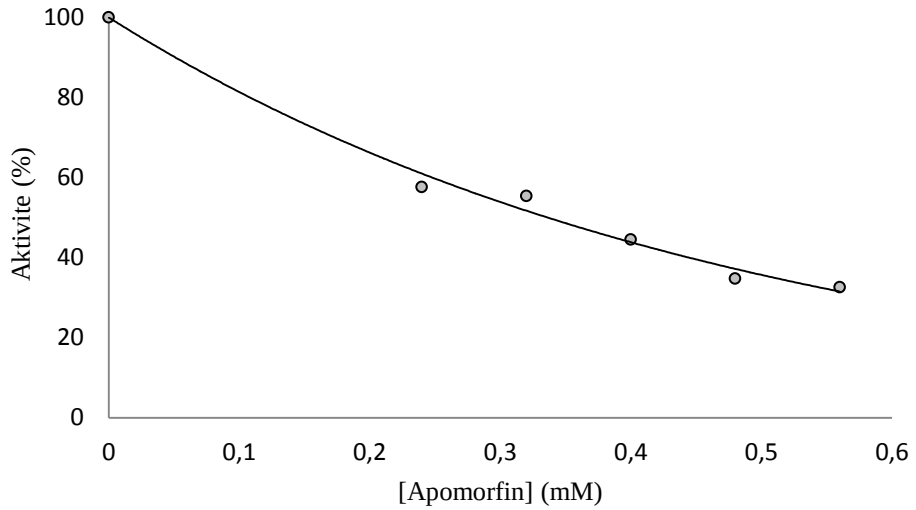
Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik için aktivite (%)-[I] ve $K_i$ grafikleri çizildi. Ve çizilen grafiklerden her bir fenolik bileşik için $K_i$ değerleri hesaplandı.



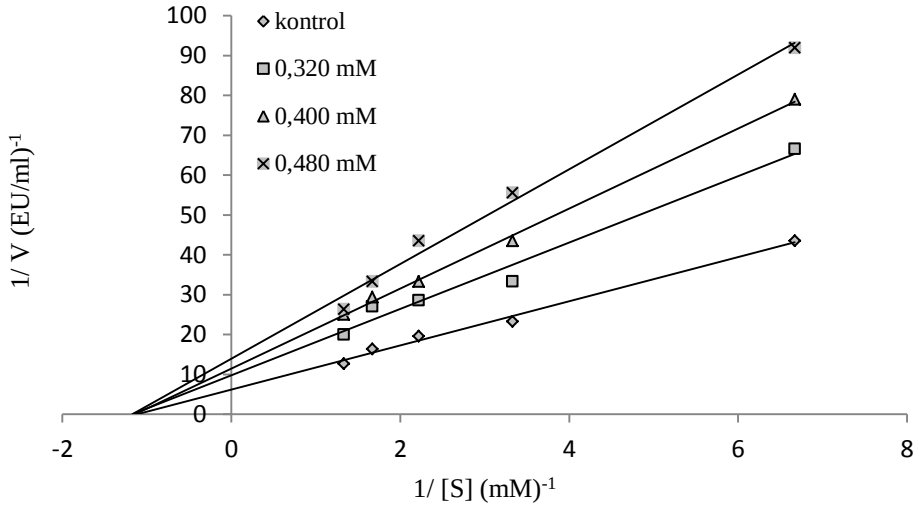

**Şekil 4.31.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği



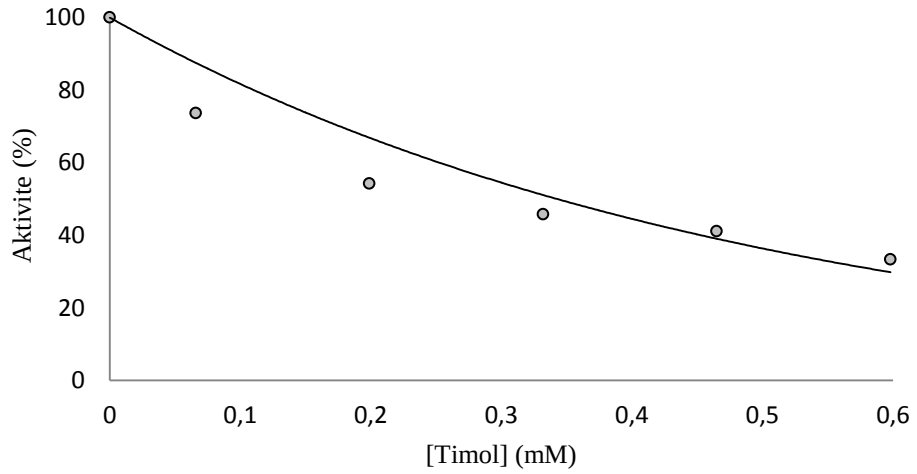

**Şekil 4.32.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



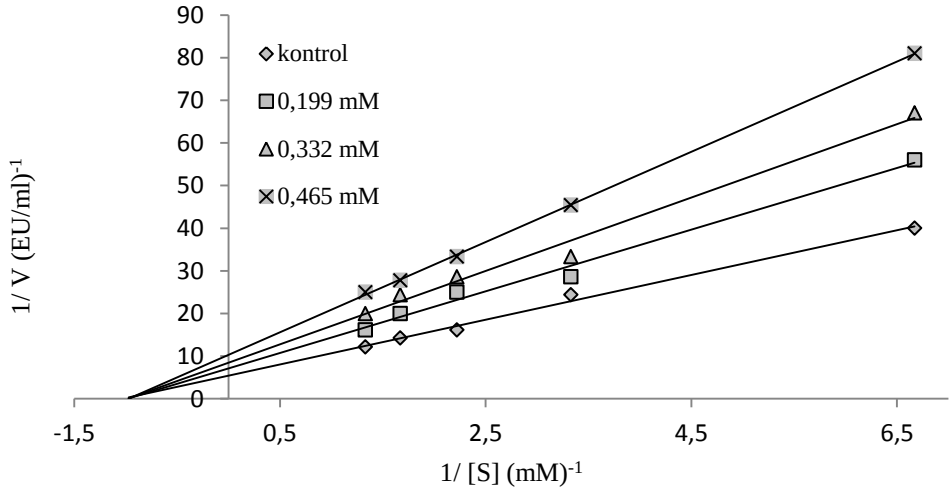

**Şekil 4.33.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorfin] grafiği




**Şekil 4.34.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği




**Şekil 4.35.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği




**Şekil 4.36.** hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.11.** hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin $K_i$ değerleri ve inhibisyon türleri

| **İnhibitör** | **$I_{50}$ (mM)** | **[I] (mM)** | **$K_i$ değerleri** | **Ortalama $K_i$ (mM)** | **İnhibisyon türü** |
|---|---|---|---|---|---|
| Hümik asit | 0,056 | 0,0438 | 0,072 | 0,061±0,010 | Yarışmasız |
| | | 0,0584 | 0,059 | | |
| | | 0,0730 | 0,052 | | |
| Apomorfin | 0,331 | 0,320 | 0,556 | 0,468±0,087 | Yarışmasız |
| | | 0,400 | 0,468 | | |
| | | 0,480 | 0,382 | | |
| Timol | 0,338 | 0,199 | 0,642 | 0,584±0,062 | Yarışmasız |
| | | 0,332 | 0,592 | | |
| | | 0,465 | 0,518 | | |

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan araştırmalar apomorfin, timol ve hümik asitin şelatlama gibi özelliklerinden dolayı birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin sergiledikleri antioksidan aktivitelere benzer etkilere sahip olan bu doğal bileşikler kansere karşı koruyucu özellik de göstermektedir. Mevcut çalışma kapsamında bu doğal fenolik bileşiklerin antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarla, tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, $Fe^{3+}$-$Fe^{2+}$ transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre $Cu^{2+}$-$Cu^{+}$ indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre $Fe^{3+}$-TPTZ indirgeme kapasitesi, ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, $ABTS^{\cdot+}$ giderme aktivitesi, $DMPD^{\cdot+}$ giderme aktivitesi, riboflavin-metiyonin-ışık sisteminde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi ve total antioksidan kapasitesi gibi farklı biyoanalitik metotlar kullanılarak apomorfin, timol ve hümik asitin antioksidan aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda belirlendi. Çalışılan antioksidan ve antiradikal yöntemlerde bulunan aktiviteler gıda ve farmokoloji sanayinde yaygın olarak kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve α-tokoferolün suda çözünen analogu olan troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile karşılaştırmalar yapıldı. Zhu ve arkadaşlarının 2002 de yapmış oldukları çalışmalarda çeşitli kronik hastalıkların ve gelişiminde ortaya çıkan sorunların serbest radikal gelişiminin sonlandırılmasıyla yakından ilgili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Fenolik doğal bileşiklerin çalışılan konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml), artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak total antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamalarda, DPPH ve ABTS giderme aktivitelerinde de artış gözlenmiştir. Ancak ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi ve DMPD ile süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde ise konsantrasyon ile pozitif bir korelasyon gözlenmedi.

Antioksidan ve antiradikal çalışmalarının mukayesesinde BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks gibi standart maddeler kullanıldı. Bazı antioksidan analizlerde apomorfin, timol ve hümik asit aktivitelerinin kullanılan standartların aynı konsantrasyonlardaki aktivitelerinden daha yüksek olduğu gözlendi.

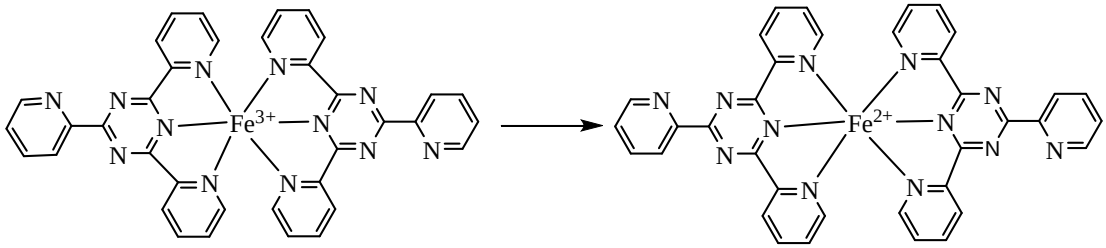
Doğal fenolik bileşiklerin toplam antioksidan özellikleri ile indirgeme kapasiteleri arasında korelasyonun olduğu görülmektedir. Fenolik bileşikler özellikle flavonoitler hidroksil gruplarında bulunan hidrojenlerini kolaylıkla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arasındaki bağ, oluşacak fenol radikalinin rezonans kararlılığından dolayı kolaylıkla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylıkla verilebilir.

Bir kimyasalın indirgenmesi, elektron kazanımı olarak tanımlanmaktadır. Oksidasyon ise elektron kaybı olarak tanımlanır. Bir indirgeyici ajan elektron veren ve böylece diğer bir reaktantın indirgenmesine neden olan bir maddedir. Bir oksidan ve bir oksitleyici ajan ise elektronları kabul eden ve diğer bir reaktantın yükseltgenmesine neden olur. Oksidasyon, sistemde başka bir yerde indirgenme olmadan mümkün değildir. Kimyasal reaksiyonu karakterize eden bu indirgenme, yükseltgenme olaylarına redoks reaksiyonları adı verilmektedir. Redoks reaksiyonları biyolojik oksidasyonların temel reaksiyonudur ve kimyasal zincir reaksiyonları sayesinde havadan aldığımız oksijenle besinlerin yıkımından oluşan kimyasalları okside ederek canlı sistemler için enerji sağlamaktayız. Ayrıca, antioksidanlar, pro-oksidanların etkilerini önemli ölçüde azaltırken $Fe^{3+}$'yı indirgemeyebilir. Bir antioksidan bir indirgeyicidir fakat her indirgeyici bir antioksidan olmak zorunda değildir (Prior and Cao 1999). Bir çok çalışmada bildirildiği gibi, hastalıkları etkileyen doğal antioksidan aktiviteleri patojenik bakteriyel gelişimi inhibisyonu, mutasyonlar, kanser oluşumu ve DNA hasarının engellenmesi gibi yeteneğe sahip olmasıyla yakından ilişkilidir (Roginsky and Lissi 2005). Fenolik doğal bileşiklerin indirgeme kapasitelerinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlendi. İndirgeme kapasitesi bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür (Meir *et al*. 1995).

Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden yürüyebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. Ama bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile böyle bir sistemde oksidasyonu durduracak veya hızını yavaşlatacaktır. Enzimatik sistemlerde katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin antioksidan özelliği, onların indirgeme güçlerinden veya fenolik bileşik içeriklerinden değil, hidrojen peroksidi uzaklaştırabilme özelliklerinden kaynaklanır. Oksidasyonun singlet oksijen tarafından indüklendiği sistemlerde ise etkili antioksidanlar karotenoitlerde olduğu gibi singlet oksijeni giderebilen bileşiklerdir (Halliwell and Gutteridge 1989). Özetle antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock 1997; Mavi 2005).

İndirgeme çalışmalarından biri ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kuvveti olan ve FRAP metodu diye adlandırılan yöntemdir. FRAP, asidik ortamda ferrik iyonunu 2,4,6-tripridil-s-triazin kompleksi $[Fe^{3+}\text{-}(TPTZ)_2]^{3+}$ yoğun mavi renkli ferröz kompleksine $[Fe^{2+}\text{-}(TPTZ)_2]^{2+}$ indirgeyebilen antioksidanları ölçmekte kullanılır (Benzie and Strain 1996, 1999). Bu metot plazmadaki gücün indirgenmesinde ölçü olarak kullanılırken, aynı zamanda farklı yiyecek ve içecekler (Pellegrini *et al.* 2003), çay (Benzie and Szeto 1999), baharatlar (Gülçin *et al*. 2004a, 2005b), sebzeler (Ou *et al*. 2002b), meyve suları (Gil 2000) ve meyvelerdeki (Proteggente *et al.* 2002; Gülçin *et al.* 2005b; Gülçin *et al.* 2011a, 2011b; Bursal and Gülçin 2011) antioksidanların belirlenmesi için uyarlanmış ve kullanılmıştır.

Şekil 5.1'de görüldüğü gibi reaksiyon ferrik 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ)'nin renkli ürüne indirgenmesini ölçer (Benzie 1996; Benzie and Strain 1996).



**$Fe^{3+}$-TPTZ** **$Fe^{2+}$-TPTZ**

**Şekil 5.1.** FRAP metoduna göre $[Fe^{3+}\text{-}(TPTZ)_2]^{3+}$ - $[Fe^{2+}\text{-}(TPTZ)_2]^{2+}$ indirgenme sistemi

FRAP, asidik pH:3,6 'da demir çözünürlüğünü korumak amacıyla gerçekleştirilir. Düşük pH'daki reaksiyon elektron transferini kullanan iyonlaşma potansiyelini azaltırken, baskın reaksiyon mekanizmasını değiştiren redoks potansiyelini artırır (Simic and Jovanovic 1994; Hagerman *et al.* 1998). FRAP mekanizması tek elektron ve hidrojen atomu aktarılması yerine bir total elektron aktarmasıdır, bu nedenle diğer metotlarla kombinasyonu, farklı antioksidanlarla ayırt edilen baskın mekanizmalar için oldukça yararlıdır (Prior *et al.* 2005). FRAP değerleri 593 nm'de absorbans artışı ile ölçülür ve demir iyonları standart çözeltisi veya bir antioksidan standart çözeltisi ile ilişkilendirilerek hesaplanır. Absorbanstaki değişme antioksidan bileşiğin kombine FRAP değeri ile orantılıdır (Ou *et al*. 2002a, 2002b). Reaksiyon anından bir kaç saat sonra, absorbsiyon kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kuersetin gibi polifenoller için oldukça yavaş bir şekilde artar. Bundan dolayı tek bir nokta absorbsiyonu sonlanması, tamamlanmış bir reaksiyonu temsil etmeyebilir (Prior *et al.* 2005).

Kendi sınırlamalarıyla ilgili olarak redoks potansiyeli $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ redoks çiftinden daha düşük olan herhangi bir bileşik, FRAP değerlerine ve hatalı yüksek sonuçların azaltılmasına katkıda bulunmak için $Fe^{3+}$'ü $Fe^{2+}$'ya indirgeyebilir. Öte taraftan bütün antioksidanlar gözlem süresi içinde kendi ölçümünü yapabilmesi için yeterince hızlı bir oranda $Fe^{3+}$'ü indirgemez. Hipotezlerden elde edilen FRAP testlerine göre redoks reaksiyonu çok hızlı bir şekilde devam etmektedir ve bütün reaksiyonlar sırasıyla 5 ve 10 dk içinde tamamlanır. Fakat bu her zaman doğru değildir. FRAP sonuçları tamamen zaman ölçeğine bağlı olarak değişebilir.

Demire bağlanan veya, farklı ve daha düşük reaktiviteyle bileşikleri yıkıma uğratan hızlı reaktif fenoller, kısa reaksiyon zamanı ile daha iyi şekilde analiz edilir. Ancak bazı polifenoller daha yavaş reaksiyona girer ve belirlenmesi için çok daha uzun reaksiyon süresi gerekir. Bu davranışı sergileyen polifenoller, kafeik asit, ferulik asit, kuersetin ve tannik asittir. Ayrıca FRAP analizi glutatyon gibi tiyol antioksidanlarını ölçmez. FRAP aslında, mekanistik ve fizyolojik antioksidan aktiviteyle ilgili olmayan ferrik iyon temelli indirgeme kapasitesini ölçer. Bununla birlikte FRAP diğer analiz yöntemlerinin aksine basit, hızlı, pahalı olmayan, sağlam ve özel ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Ek olarak, FRAP yöntemi bazı dezavantajlara da sahiptir. Sistem içerisinde serbest radikaller olmadığından dolayı, antioksidan kapasitenin farklı türlerdeki radikallerle karşılaştırılması mümkün değildir.

FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi ferrik iyonlarının ($Fe^{3+}$) indirgenmesine dayalıdır. Antioksidanlar radikal söndürücü olarak hareket ederler. FRAP metodu, demir iyonlarıyla ($Fe^{2+}$) reaksiyona giren ve SH- grubu içeren antioksidanlar gibi belirli bazı antioksidanların, antioksidan kapasitesini ölçemez (Somogyi *et al.* 2007). Bir FRAP birimi, 1 M ferrik iyonunun ($Fe^{3+}$), $Fe^{2+}$ iyonuna redüksiyonu olarak tanımlanır (MacDonald-Wicks *et al.* 2006). Son olarak, belirlenen dalga boyunda absorbe olan bileşikler FRAP değerinin abartılmasını engelleyebilir. Örneğin, Benzie ve Strain'in 1999'da bilirubin için alışılmadık bir FRAP değeri bildirmişlerdir, çünkü bilirubin, 593 nm'de oldukça absorbe olan biliverdine okside olmuştur. Aynı zamanda bu metot için gerekli olan düşük pH (3,6), süt örneklerindeki kazein gibi bazı proteinlerin çökmesine yol açabilir (Chen *et al.* 2003). Fizyolojik koşullarla (pH:7,4) uygulanan düşük pH değeri karşılaştırıldığında, FRAP dolaylı olarak antioksidan kapasitesini yansıtabilir, ayrıca hidrojen atom transferi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir.

Mevcut çalışmada fenolik doğal bileşiklerin FRAP aktiviteleri incelendiğinde ferrik iyonları indirgeme kapasitesiyle korelasyon sergilediği gözlenmiştir. Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bilinmektedir (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006).

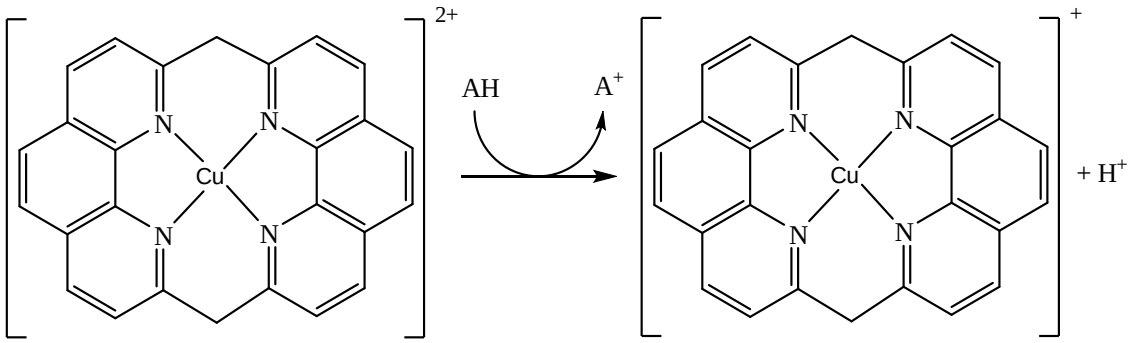
Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenmesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilzasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi $Fe[(CN)_6]^{+3}$'nin $Fe[(CN)6]^{+2}$'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne $Fe^{3+}$'ün ilavesi, 700 nm'de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $Fe_4[Fe(CN)_6]$ oluşumuna yol açar. Absorbansdaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir.

$$\text{İndirgeyici ajan} + Fe(CN)_6^{3-} \rightarrow Fe(CN)_6^{4-}$$

$$Fe(CN)_6^{4-} + FeCl_3 \rightarrow Fe_4[(Fe(CN)_6]_3$$

Bu analizde test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir (Benzie and Strain 1996). İndirgeme potansiyelini ölçmek için tasarlanmış pek çok sayıda analiz modeli vardır (Wood *et al.* 2006). Mevcut çalışmada ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) indirgeme kapasitesinin yanı sıra kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) kupröz iyonlarına ($Cu^{+}$) indirgeme kapasitesi de araştırıldı.

Kuprak metodu son zamanlarda Apak ve grubu tarafından indirgeme gücü analizi için geliştirilen diğer önemli bir metottur (2006). Bu metot, düşük maliyetli ile beraber hızlı ve kararlı bir metottur. Ayrıca indirgeyici ajanın tipine veya hidrofilikliğine bakılmaksızın, farklı antioksidanlar için uygulanabilir bir metottur. Kuprak metodu bir kromojenik redoks reaksiyonu olup fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7) gerçekleştirilir (Apak *et al.* 2005; Köksal *et al.* 2009). Bu metot, glutatyon gibi tiyol gurubu içeren antioksidanların aktivitelerinin ölçümünde sıklıkla da kullanılabilir (Huang *et al.* 2005).




**Şekil 5.2.** Bir antioksidan molekülü ile KUPRAK reaksiyonu.
*AH: antioksidan molekül, $A^+$: okside antioksidan molekül.

Tepkime içinde serbest kalan protonlar amonyum tamponu ile nötralize edilmiştir (Gülçin 2008). Yapılan çalışmalarda fenolik doğal moleküllerin her iki indirgeme metodu arasında bir korelasyon gözlendi ve artan konsantrasyona bağlı olarak indirgeme kapasitelerinde de artış gözlenmektedir (Çizelge 5.1).

Her iki metotta kullanılan fenolik doğal bileşiklerden apomorfinin standartlar içerisinde BHA ve BHT'ye benzer aktivite sergilediği ve bu aktivitenin α-tokoferol ve troloksdan da daha yüksek olduğu bulundu.

Kullanılan fenolik doğal bileşiklerin içerisinde en yüksek ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ferröz iyonlarına ($Fe^{2+}$) ve kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) kupröz iyonlarına ($Cu^{+}$) indirgeme apomorfinde gözlendi. Bunun sebebi ise moleküle bakıldığında her bir apomorfin molekülünde aromatik halkaya bağlı iki adet OH gurubunun olduğu gözlenmektedir. Yine benzer şekilde her iki indirgeme metodunda da nispeten en düşük indirgeme kapasitesinin humik asitte gözlenmesi ise gayet normaldir.

**Çizelge 5.1.** Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin 20 µg/ml konsantrasyonunda ferrik iyonlarını ($Fe^{3+}$) ve kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) indirgeme kapasiteleri

| **Antioksidanlar** | **Absorbans (700 nm)** | **Absorbans (593 nm)** | **Absorbans (450 nm)** |
|---|---|---|---|
| BHA | 1,858* | 2,368* | 0,703 |
| BHT | 1,457 | 1,600* | 0,639 |
| α-Tokoferol | 1,026 | 1,963* | 0,489 |
| Troloks | 1,350 | 2,169* | 0,478 |
| Apomorfin | 2,055* | 2,216* | 0,749 |
| Timol | 0,413 | 1,379 | 0,501 |
| Hümik Asit | 0,197 | 0,686 | 0,181 |

.*:Absorbans değerleri 1,500'ü geçen metotlar seyreltilerek çalışılmıştır.

*In vivo* olarak serbest demir ve bakırın varlığı kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafından emilir ve transferin proteinleri tarafından ferrik iyonları ($Fe^{3+}$) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taşınır ve ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şeklinde ferritin ve hemosiferin proteinlerinde depolanır. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonlarına katılmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer "demir havuzu" olan ferritin ve hemosiferinde depolanırlar. İnsan plazmasında bulunan bakırın büyük bir kısmı serbest radikal reaksiyonlarını uyarmayan bir formda olup, seruloplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Bazı hemostatik durumlar değiştiğinde hidroksil radikali oluşur (Chevion *et al.* 1993).

Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya liziz olmuş hücrelerden geçiş metal iyonlarının yayılması sonucu serbest oksijen türleri oluşabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısıyla doku hasarını daha da hızlandırır. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonlarına bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalığı, beyinde substantia nigrada mevcut hücrelerin ölümü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu açığa çıkmaktadır. Böylece Parkinson hastalığına yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalır.

Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigranın dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapılarında bulunan amino asitlerin tiyol guruplarını da oksitleyerek deaktive ederler. Ayrıca hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini de oksitleyerek hücre hasarlarına da sebep olmaktadır (Haugaard 1968; Pacific *et al.* 1991).

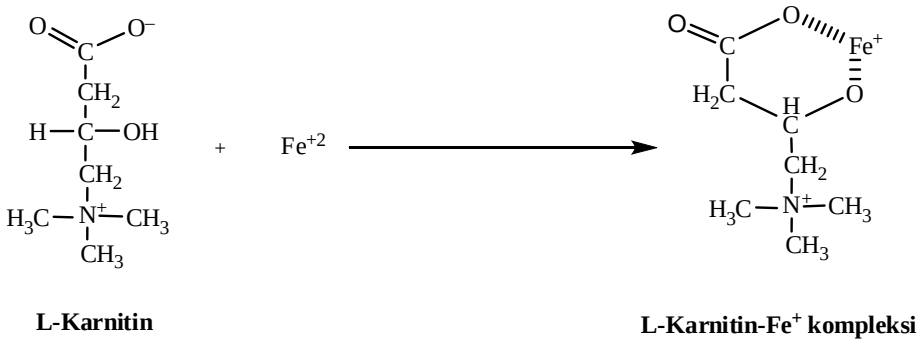
Ferröz ($Fe^{2+}$) iyonu gibi iyonik türler, organizmada ROS üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Demir organizmalar için esansiyel bir mineraldir, fakat aşırısı hücre hasarına sebep olabilir. Geçiş metalleri arasında demir yüksek aktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir.

Metal iyonları arasında, ferröz iyonları ($Fe^{2+}$), bilinen en önemli prooksidan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar ($Fe^{3+}$) da meydana gelebilir. Ferröz iyonları ($Fe^{2+}$), ferrik iyonlarından ($Fe^{3+}$) on kata daha fazla reaktiftirler (Miller 1996). Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radikalleri de oluşabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1984; Gülçin 2007).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \text{ (Fenton reaksiyonu)}$$

Böylece ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Gülçin *et al.* 2007b). Ferrozin, ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) gibi iki değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbans göstermektedir.

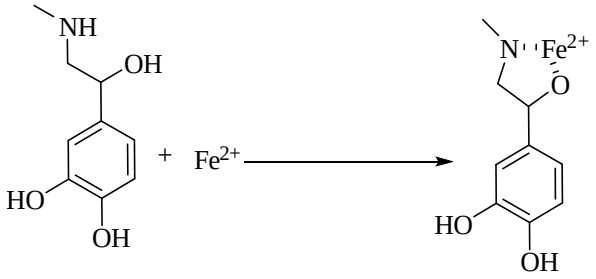
Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal şelasyonunun bir göstergesidir. Daha önce Gülçin tarafından L-karnitinin antioksidan aktivitesinin araştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada L-karnitinin ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) konsantrasyona bağlı olarak şelatladığı gözlenmiş ve Şekil 5.1'de görüldüğü gibi L-karnitin ile ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) arasındaki metal şelatlama mekanizması aydınlatılmıştır (Gülçin 2006b). Şekilde de görüldüğü gibi bir L-karnitin molekülünün karboksil gurubu ile yine aynı L-karnitin molekülünün γ-karbonuna bağlı hidroksil gurubu ararsında bir metal köprüsü oluşarak bir ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) şelatlanır.




**L-Karnitin** **L-Karnitin-$Fe^{+}$ kompleksi**

**Şekil 5.3.** L-Karnitin ile ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) arasındaki öne sürülen metal şelatlama mekanizması

Yine benzer şekilde L-Adrenalin ile ilgili çalışmaya bakıldığında bir L-Adrenalin molekülünün amin gurubu ile aynı molekülün OH gurubunun bir ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak L-Adrenalin-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturduğu gözlenmektedir (Gülçin 2009a).



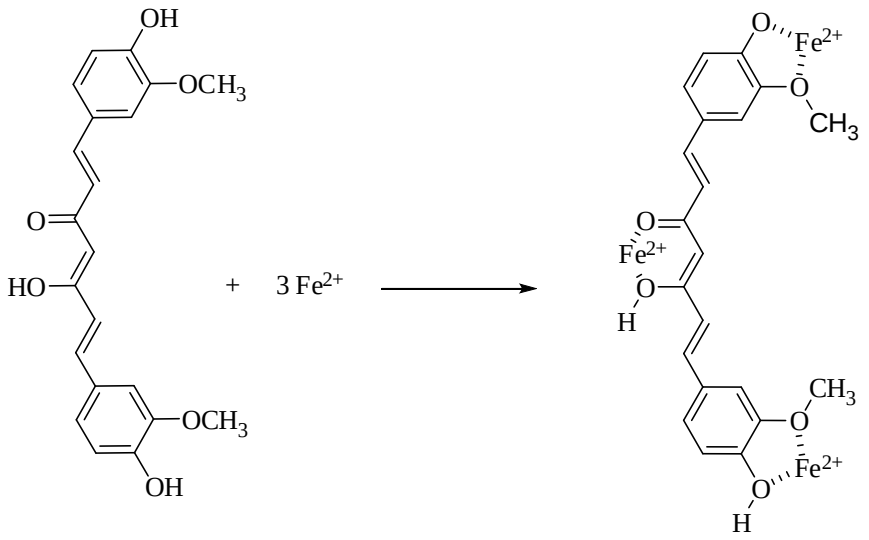

L-Adrenalin L-Adrenalin-$Fe^{2+}$ kompleksi

**Şekil 5.4.** L-Adrenalinin bir ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak L-Adrenalin-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması

Benzer mekanizmalar Kazazica ve arkadaşları tarafından da ileri sürülmüştür (2006). Son zamanlarda yapılan bu çalışmada kamferol gibi bir flavonoitin kuprik iyonlarını ($Cu^{2+}$) ve ferröz iyonlarını ($Fe^{2+}$) fonksiyonel karboksil gurupları üzerinden şelatladığı bildirilmiştir.

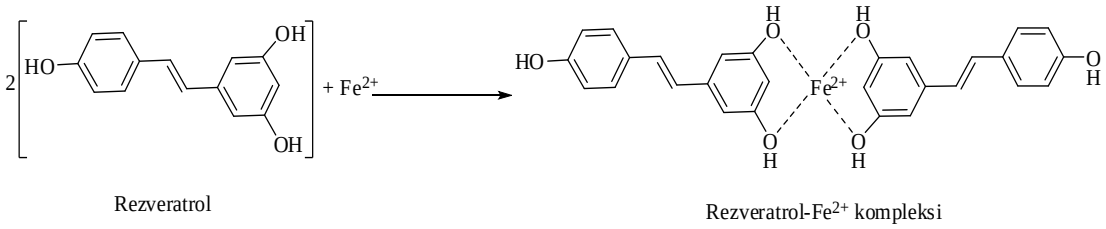
Bununla beraber, –OH, –SH, –COOH, $–H_2PO_3$, C=O, $–NR_2$, –S– ve –O– fonksiyonel guruplardan iki veya daha fazlasına sahip olan moleküllerin metalleri kolaylıkla şelatlayabilecikleri bilinmektedir. Bu gurupların bulunması antioksidan molekülün metal şelatlamada yapı-fonksiyon konfügrasyonunun lehinedir (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2009a).

Kurkumin molekülüne bakıldığında ise daha farklı bir durum göze çarpmaktadır (Ak and Gülçin 2008). Kurkumin molekülünün ihtiva ettiği her iki aromatik halkaya bağlı metoksi gurupları ile hidroksil fonksiyonel gurupları arasında ikişer adet ferröz iyonlarının ($Fe^{2+}$) şelatlamanın yanı sıra hidrokarbon ara zincirindeki enol ve keto gurupları tarafından da bir adet ferröz iyonlarının ($Fe^{2+}$) şelatlaması da kuvvetle muhtemeldir.




**Şekil 5.5.** Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak kurkumin-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması

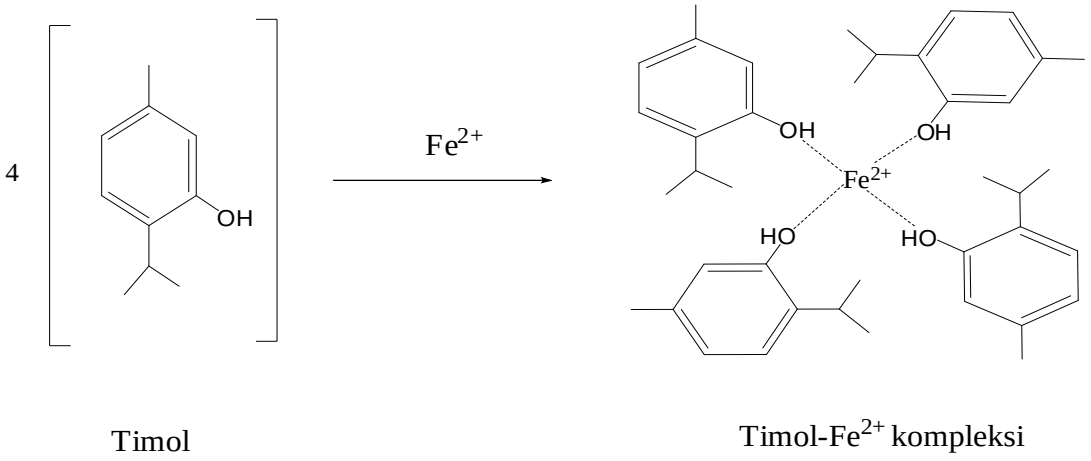
Son zamanlarda yapılan diğer bir çalışmada ise üzüm ve üzüm ürünlerde bol miktarda bulunan trifenolik bir bileşik olan rezveratrolün ferröz iyonları ($Fe^{2+}$) şelatlama aktivitesi için mümkün olan mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır (Gülçin 2009b). İki rezveratrol molekülünün ihtiva ettiği her iki difenolik aromatik halkalar arasında bir adet ferröz iyonunun ($Fe^{2+}$) şelatladığı gözlenmiştir.




**Şekil 5.6.** İki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak Rezveratrol-$Fe^{2+}$ kompleksi oluşturması

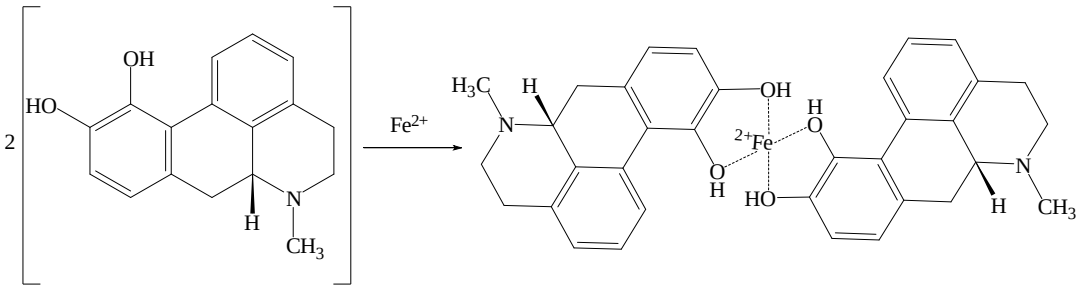
Yukarıda metal şelatlama ile ilgili verilen bilgiler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamız çerçevesinde kullanılan fenolik doğal bileşiklerin metal şelatlama kapasiteleri ile ilgili olarak pratikte en kuvvetli metal bağlama kapasitesi apomorfinde gözlenmesi gerekir.

Gerçekten de deneysel çalışmalara bakıldığında en kuvvetli metal bağlamanın yine apomorfinde meydana geldiği görüldü. Apomorfin ve timolün muhtemel bağlanma şekli ise Şekil 5.7'de gösterilmiştir.




Timol

Timol-$Fe^{2+}$ kompleksi




Apomorfin

Apomorfin-$Fe^{2+}$ kompleksi

**Şekil 5.7.** Apomorfin ve timolün ferröz iyonu ($Fe^{2+}$) ile bağlanarak oluşturduğu kompleks

Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin içerisinde en kuvvetli metal şelatlama apomorfinde gözlendi. Metal şelatlama aktivitelerinin $IC_{50}$ değerleri ile diğer antioksidanların $IC_{50}$ değerleri mukayese edildiğinde ise timol için 35 µg/ml, apomorfin için 16 µg/ml ve hümik asit için bu değer 29 µg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 5.2). Standart antioksidanların metal şelatlama aktivitelerine ait $IC_{50}$ değerleriyle mukayese edildiğinde humik asitin BHT ile benzer aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bitkisel

kaynaklardan izole edilip karakterize edilen bazı saf antioksidanlar ile karşılaştırıldıklarında ise oldukça yüksek oldukları gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin metal şelatlama aktivitelerinin $IC_{50}$ değerleri 15-35 μg/ml arasında iken α-hederin, hederasaponin C, hederakolşizit ve E hederakolşizit F gibi doğal antioksidanların metal şelatlama aktivitelerinin $IC_{50}$ değerleri sırasıyla 51, 53, 71 ve 61 μg/ml olarak bulunmuştur (Gülçin *et al*. 2004d). Bipiridil metal şelatlama aktivitesine bakıldığında apomorfinin yüksek şelatlama kapasitesine sahip olduğu teyit edilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Standartlar ve fenolik doğal bileşiklere ait DPPH•, $ABTS^{+\bullet}$, $DMPD^{+\bullet}$ ve $O_2^{-\bullet}$ ve metal şelatlama aktiviteleri ile ilgili $IC_{50}$ (μg/ml) değerleri

| **Antioksidanlar** | $Fe^{2+}$ şelatlama | $O_2^{\bullet -}$giderme | DPPH• giderme | $ABTS^{\bullet +}$ giderme | $DMPD^{\bullet +}$ giderme |
|---|---|---|---|---|---|
| BHA | 24,57 | 34,47 | 63,37 | 14,37 | 26,34 |
| BHT | 28,87 | 20,62 | 80,00 | 16,85 | - |
| α-Tokoferol | 20,02 | 16,90 | 69,30 | 33,47 | - |
| Troloks | 22,64 | 29,74 | 66,63 | 21,60 | 12,13 |
| Apomorfin | 16,00 | 29,11 | 67,28 | 17,85 | 20,68 |
| Timol | 35,17 | 26,45 | 44,55 | 14,06 | 17,32 |
| Hümik asit | 29,09 | 40,52 | 58,23 | 26,25 | 50,58 |

Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri, biyolojik sistemlerde, gıda ve farmasötik sanayilerinde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından oldukça önemlidir. Bu sistemlerde serbest radikaller meydana gelmekte ve dolayısıyla farmasötik ve gıda sanayinde lipit peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir (Min 1998).

Son zamanlarda sentetik serbest radikallerin giderilmesi ile ilgili birçok metot geliştirilmiştir. Bunların başında DPPH radikal giderme aktivitesi (Gülçin 2006b),

$ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi (Gülçin *et al.* 2006a), $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesi (Basile *et al.* 2006), PMS-NADH-NBT sistemi (Gülçin 2005), ksantin-ksantin oksidaz sistemi (Nagai *et al.* 2001) ve riboflavin-metiyonin-ışık sistemi (Zhishen *et al.* 1999) gibi sistemlerde oluşturulan süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi gibi radikal giderme metotları kullanılmaktadır.

Bu kromojen radikal giderme metotları uygulama kolaylığı, hassaslıkları ve analizlerin kısa sürede uygulanabilirliği gibi avantajlardan dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Awika *et al.* 2003; Van den Berg *et al.* 2000; Yu *et al.* 2002). Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin içerisinde en kuvvetli süperoksit giderme aktivitesi timolde gözlendi.

Fenolik bileşiklerin süperoksit giderme aktivitesi $IC_{50}$ değerleri ise 25-40 μg/ml civarında iken α-hederin, hederasaponin C, hederakolşizit ve E hederakolşizit F gibi doğal antioksidanların $IC_{50}$ değerleri sırasıyla 51, 46, 46 ve 45 μg/ml olarak bulunmuştur (Gülçin *et al.* 2004d). Bu da literatürdeki maddelerle karşılaştırıldığında süperoksit giderme aktivitelerinin diğerlerine göre daha yüksek değerde olduğunu kanıtlamıştır.

DPPH•, $ABTS^{\bullet+}$ ve $DMPD^{\bullet+}$ radikallerinin kullanımına dayanan metotlar, saf maddelerin, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstrelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan popüler spektrofotometrik metotlardır. Ayrıca DPPH•, $ABTS^{\bullet+}$ ve $DMPD^{\bullet+}$giderme metotları hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı saf maddelerin, ekstre veya izole bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik *et al.* 2003). Bir antioksidan madde, bu radikal çözeltilerinden birine eklendiğinde; DPPH•, $ABTS^{\bullet+}$ ve $DMPD^{\bullet+}$ oluşumunu tersine çevirir ve bu reaktif türleri indirgeyerek bir renksizleşme oluşur.

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH_2 + A^{\bullet}$$

$$ABTS^{\bullet+} + AH \rightarrow +ABTS^{+} + A^{\bullet}$$

$$DMPD^{\bullet+} + AH \rightarrow +DMPD^{+} + A^{\bullet}$$

Menekşe renkli DPPH•, pembe renkli $DMPD^{\bullet+}$ ve yeşil-mavi renkli $ABTS^{\bullet+}$ kromojenlerini kullanmak kolaydır. Bu metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir ve aynı zamanda çok sayıda paralel çalışmanın analizine rahatlıkla uygulanabilir (Awika *et al.* 2003).

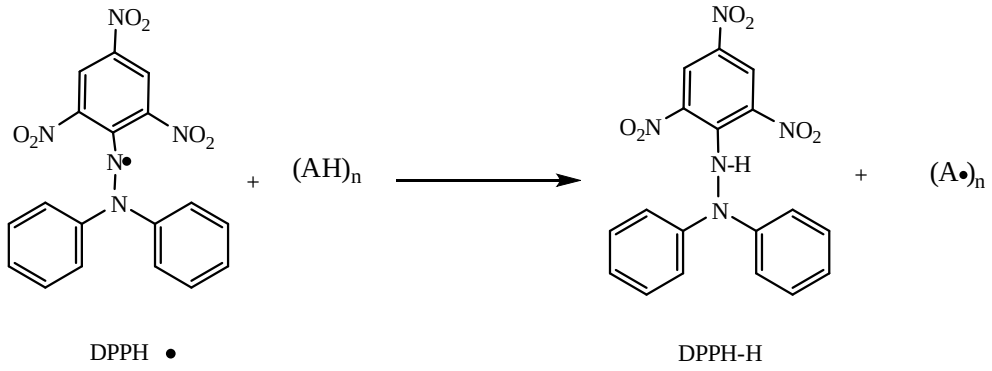
Bu kromojenlerden DPPH radikali uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik *et al.* 2003). DPPH giderme dolaylı olarak antioksidan aktivitenin belirlenmesi için kullanılan en eski metotlardan biridir. 1950'lerde doğal malzemelerdeki hidrojen verici grupların keşfi için önerilmiştir. Daha sonraları hem fenolik bileşiklerin hem de gıdaların biyolojik olarak uygun örneklerinin antioksidan potansiyelleri belirlemeye yönelik test edilmiştir (Roginsky and Lissi 2005).

Bu metotta antioksidan maddeler DPPH radikallerini, sarı renkli difenil-pikrilhidrazine indirger. Bu metodun esası hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. Şekil 5.8'de görüldüğü gibi redüksiyon sonucu oluşan, 517 nm'de herhangi bir absorbans vermeyen ve radikal olmayan bir DPPH-H molekülü oluşmaktadır. Dolayısıyla DPPH radikali miktarındaki azalma 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Ortamda bulunan radikal giderici antioksidan veya antiradikal türlerin [$(AH)_n$] varlığında DPPH radikali Şekil 5.8'de belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).

Çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan fenolik bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili $IC_{50}$ değerleri 40-70 µg arasında değiştiği gözlenmektedir (Çizelge 5.2).

Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında ise benzer değerlere sahip oldukları gözlenmektedir. DPPH radikali giderme aktivitesinin $IC_{50}$ değeri, L-

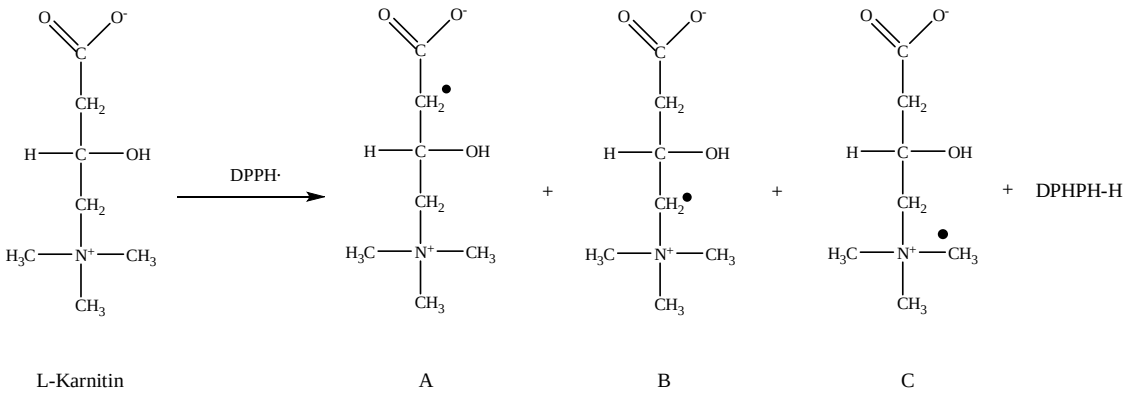
Adrenalin (Gülçin 2009a) için 30,6 µg, kurkumin için 34,9 µg (Ak and Gülçin 2008), silmarin için 20,8 (Gülçin *et al.* 2009d) ve α-hederin için 69,4 µg (Gülçin *et al* 2004d) olarak bulunmuştur.




**Şekil 5.8.** Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

Radikal giderme aktivitesi ile ilgi yoğun çalışmalar olmasına rağmen son zamanlarda mekanizmaların aydınlatılması ile ilgili birçok çalışma da mevcuttur.

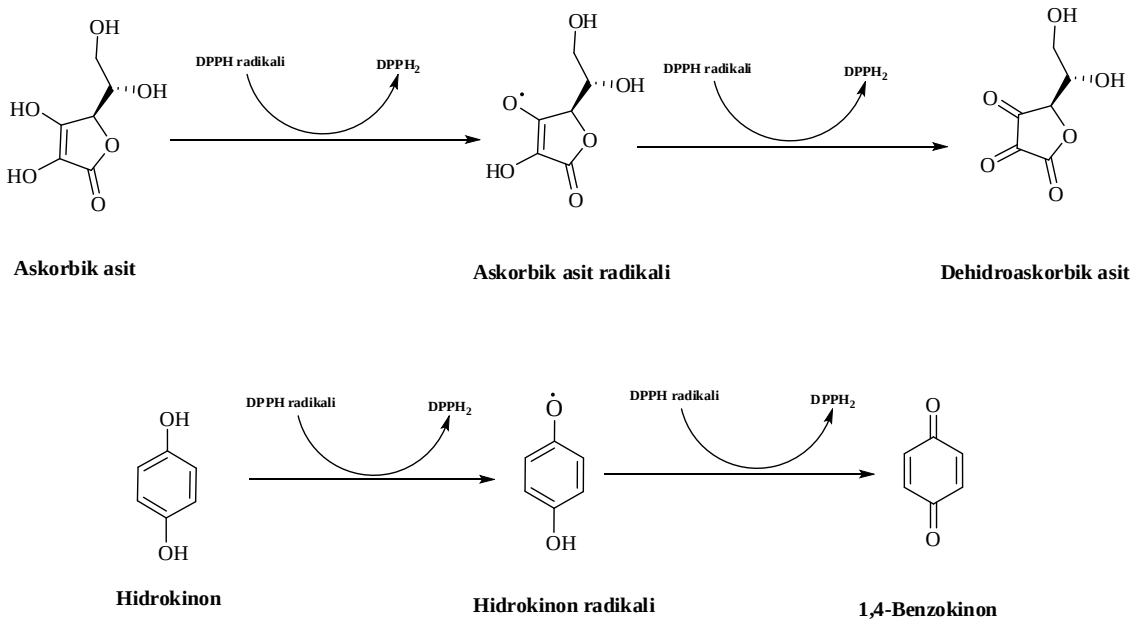
Gülçin tarafından DPPH radikal giderme aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada L-karnitin ile DPPH radikal giderme aktivitesi arasındaki mekanizma aydınlatılmıştır ve bu mekanizma Şekil 5.9'da özetlenmiştir (Gülçin 2006b).




**Şekil 5.9.** L-Karnitin ile DPPH radikali arasında öne sürülen radikal giderme mekanizması

L-Karnitinde bulunan karbonil gurubu, α-karbonundaki konjugasyon ile oluşan radikali stabil hale getirir. L-Karnitin molekülünde karboksilat gurubu bir adet karbonil birimine sahiptir. L-Karnitindeki iki nolu karbon atomundan bir hidrojeni kolayca koparılabilir ve bir L-karnitin ara ürün radikali oluşabilir. Koparılan hidrojen tarafından da DPPH radikali söndürülebilir. Teorik olarak enerji hesaplamaları yapıldığında da gerçekten Şekil 5.9'da görüldüğü gibi L-karnitin ara ürün radikallerinden A'nın oluşumunun daha muhtemel olduğu ve diğer ara ürünlerden daha stabil bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

Benzer bir mekanizma Nishizawa ve arkadaşları tarafından konjuge guruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon için de öne sürülmüştür (2005). DPPH radikalleri giderme aktivitesi antioksidan vitaminler ile polyhidroksi aromatik bileşiklerin değerlendirmesinde uzun zamandan beri sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Yoshida *et al.* 1989; Nishizawa *et al*. 2005)




**Şekil 5.10.** Konjuge gruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH radikalleri arasında meydana gelen reaksiyon

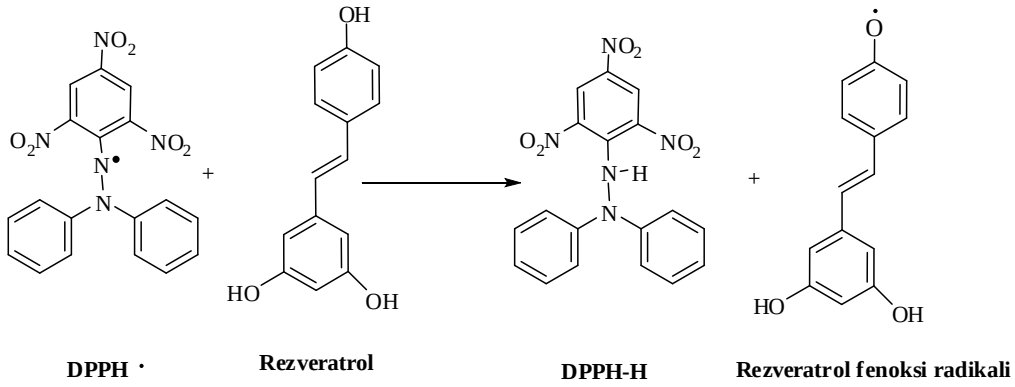
Askorbik asit DPPH radikalleri etkileştiğinde askorbik asidin üç nolu karbon atomuna bağlı olan hidroksil gurubundan bir adet hidrojen homolitik olarak ayrılarak DPPH•'ı

indirgeyerek DPPH-H oluşmasını sağlar. Bu arada askorbik asit askorbil radikaline dönüşür. Askorbik asit ikinci bir DPPH• radikali ile etkileştiğinde ise bu radikali söndürür ve kendisi de Dehidroksi askorbik aside dönüşür. Benzer mekanizma hidrokinonun antioksidan aktivitesinde de görülmektedir. Hidrokinon benzer şekilde birinci DPPH• etkileşerek hidrokinon radikaline ve ikinci DPPH• ile etkileştikten sonra da 1,4-benzokinona dönüşerek iki radikali söndürür.

Gıda bileşenlerinin güçlü $DPPH^{\cdot}$ giderme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yine Gülçin tarafından yapılan diğer çalışmada farklı moleküllerin DPPH serbest radikali ile etkileşme mekanizmalarına açıklık getirilmiştir.

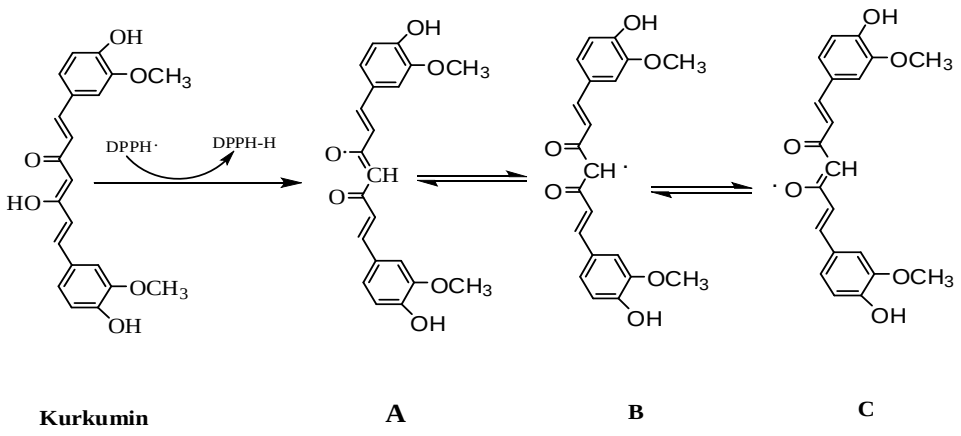
Bu anlamda rezveratrol ile ilgili yapılan bir çalışmada (Şekil 5.11) bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürdüğü ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluştuğu bildirilmiştir. Daha sonra oluşan bu radikalık ara ürünün radikal formunun fenolik halka tarafından süspanse edilerek dağıtıldığı bildirilmiştir (Gülçin 2009b).

Rezveratrol üzümün ana bileşenidir. Son yıllarda Gülçin yaptığı çalışmalarda rezveratrolün belirgin olarak radikal giderme aktivitesini sergiledi (2010). Bilindiği gibi fenolik bileşiklerin antioksidan gibi hareket etme yeteneği onların sahip olduğu fenolik hidroksil gruplarının redoks özelliğine ve kimyasal yapıları boyunca elektron delokalizasyonu potansiyeline bağlıdır. Rezveratrolün yapısı $DPPH^{\cdot}$ da etkileşime yol açan kromoforik bir sistem sağlar. Rezveratrolün DPPH radikal kapasitesi şekilde özetlenmiştir.




**Şekil 5.11.** Bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluşumu

Ayrıca fenolik gruplar rezonans yapıları ile birlikte fenolik karbon üzerinde oluşturulmuş bir radikal stabilize eder. Rezveratrolün monofenol ve difenol olmak üzere iki fenolik halkası vardır. Monofenolik bir hidroksil grubundan bir hidrojen atomu almak kolaylıkla meydana gelebilir. Farklı bir mekanizma ise kurkumin molekülü üzerinde görülmüştür. (Ak and Gülçin 2008).

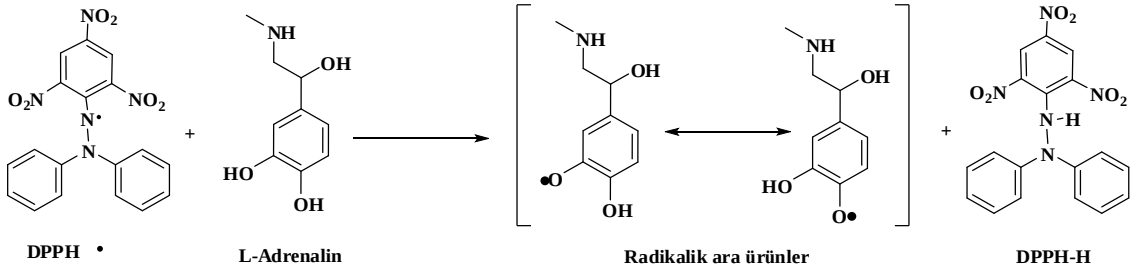



**Şekil 5.12.** DPPH radikali ile kurkumin arasında önerilen reaksiyon mekanizması

Şekil 5.12'de görüldüğü gibi, keto formundaki kurkuminde, iki metoksifenol halkası arasındaki heptadienon bağlantısı son derece aktive olmuş karbon atomu içerir. Aynı şekilde kurkumin bu karbon atomundan bir hidrojen atomunu kolaylıkla koparabilir. Kurkuminin fenolik hidrojen atomu komşu metoksi gruplarına molekül içi H bağı ile

bağlı olduğundan dolayı, fenolik halkadan hidrojen atomu koparmak zordur. Teorik hesaplamalara göre B nin A, B, C ara maddeleri arasında en kararlı olduğu görülmektedir. DPPH radikali, "mükemmel antioksidan" özellikteli kurkuminden sorumlu olan serbest hidroksil gruplarından H atomunu kolayca koparır. sonuç olarak alkol ortamındaki kurkumin DPPH radilallerini azaltmakta ve kurkuminin fenolik kısmı elektron vericisi olarak reaksiyonda yer almaktadır (Jovanovic *et al.* 1999). Kurkuminin elektron verme yeteneği, DPPH radikaline tek elektron transferinin ölçümüyle değerlendirilebilir.

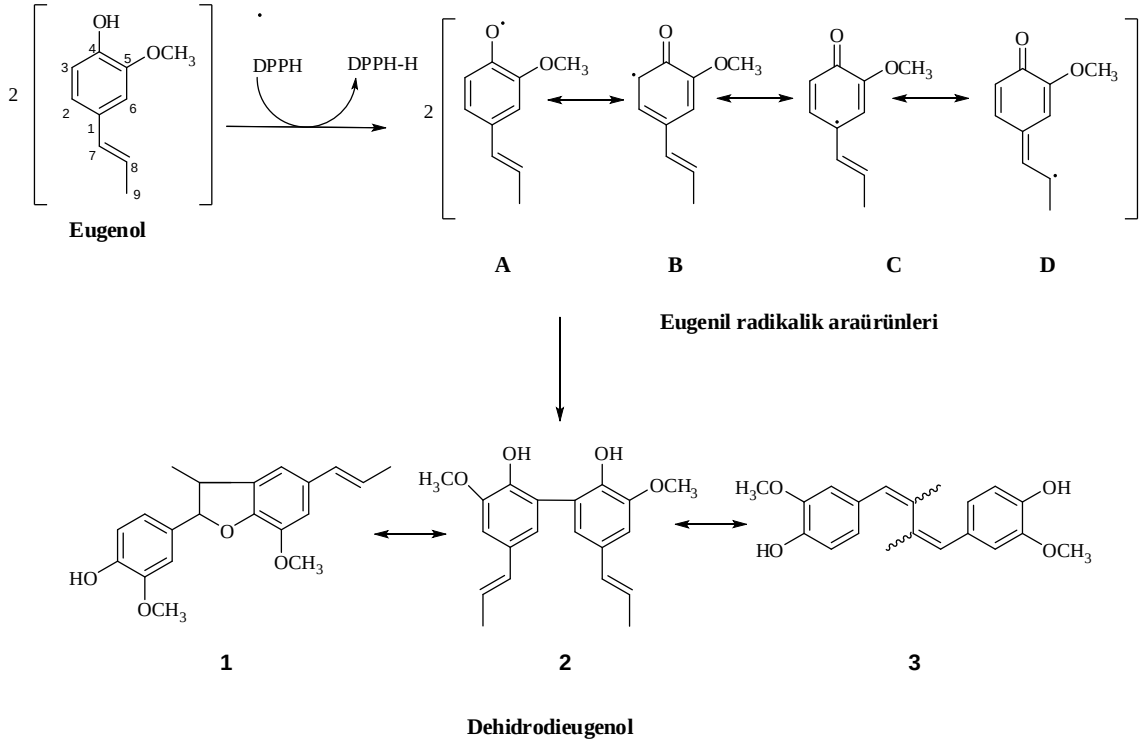
Diğer bir çalışmada ise benzer mekanizma da metabolizmada organizmayı acil harekete hazırlama, kanın iç organlar ve deriden kaslara sevk edilmesi, karaciğerdeki glikojenin glikoza dönüşmesi ve böylelikle acil bir enerji kaynağı sağlanması etkisine sahip olan L-Adrenalin için öngörülmüştür (Gülçin 2009a). Bu çalışmada L-Adrenalin'in rezveratrol ile benzer bir DPPH• radikali giderme mekanizmasına sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.13).




**Şekil 5.13.** Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve L-adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu

Öte yandan Kawabata ve arkadaşları DPPH radikali ile reaksiyonundan sonra, gallik ve protokatekoik acitlerinin dimerlerinin oluşumunu bildirmiştir (2002). ayrıca DPPH'ın BHT, eugenol ve izoeugenol ile olası mekanizmaları üzerinde çalışan Brand-Williams ve arkadaşlarının 1995'te ve Bondet ve arkadaşlarının 1997'de yapmış oldukları çalışmalarda dimerik türler içeren çok daha kompleks reaksiyon mekanizmalarının müdahalesini önerdiler. Yan zincir üzerinde yapılan gözlemleri onaylamak adına, üç

monofenol grubu, yani izoeugenol, dihidroeugenol ve eugenolün bir çift bağ ve/ veya zincirdeki pozisyonlarının da farklı olduğu görülmüştür.



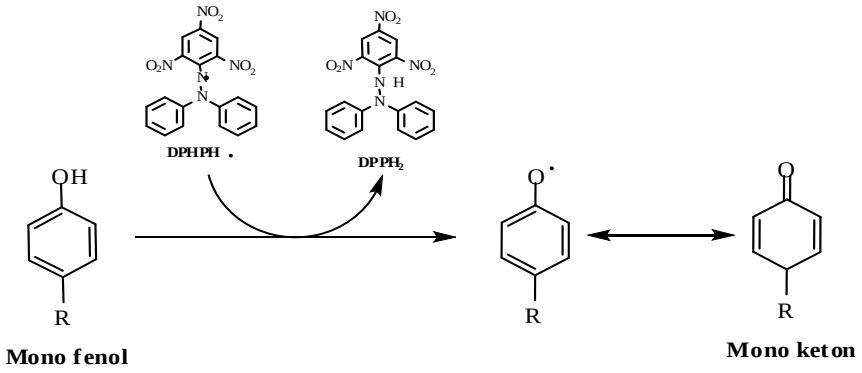

**Şekil 5.14.** Eugenol'ün DPPH radikal giderme mekanizması ve eşleme tepkimesiyle dehidrodieugenol oluşumu

Hidroksil gruplarındaki hidrojen varlığına rağmen eugenol iki veya daha fazla DPPH radikalini indirger ve farklı monofenolik bileşiklerin antiradikal etkilerini açıklamak için farklı hipotezler mevcuttur (Brand-Williams *et al.* 1995; Mastelic *et al.* 2008).

Eugenol bir aromatik halkaya sahiptir. Bu fenolik grup eugenol molekülü içindeki konjugasyonla karbon atomu üzerinde oluşan bir radikal meydana getirir. Eugenol bu aromatik halkadaki radikali giderir. Benzer şekilde diğer aromatik bileşik yapıları DPPH içinde etkileşime yol açan kromoforik sistemlere yol açmaktadır.

Fenolik halkaya sahip olan bu moleküllerin DPPH• radikali giderme ile ilgili mekanistik çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda fenolik asitlerin DPPH• radikalini giderme

mekanizmaları tahmin edilebilir. p-Hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit gibi mono fenoller için muhtemel DPPH• radikalini giderme mekanizması aşağıdaki gibi verilebilir.




**Şekil 5.15.** Mono fenoller için muhtemel DPPH• radikali giderme mekanizması

Tek fark hidrokinon bir DPPH• ile etkileşerek hidrokinon radikaline ve ikinci bir DPPH• ile etkileştikten sonra da 1,4-benzokinona dönüşken iki radikali söndürür. Timol gibi mono fenoller ise bir fenolik grup kapalı olduğu için ancak bir DPPH• ile etkileşebilirler.

Apomorfin iki, timol bir adet fenolik OH gurubuna sahipken, hümik asit ise polifenol grubuna sahiptir. Bundan dolayı hümik asidin apomorfin ve timole göre daha kuvvetli DPPH• giderme aktivitesin sahip olması gerekir. Ancak Şekil 4.6 ve Çizelge 4.4 veya 5.2'deki sonuçlara bakıldığında hümik asidin DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin apomorfine ait $IC_{50}$ değerinden daha yüksek iken timolden daha düşük olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni timolün kendi içindeki rezonans kararlılığındandır. Apomorfin, timol ve hümik asitin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait $IC_{50}$ değerleri sırasıyla 67,28, 44,55 ve 58,23 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan diğer bir radikal giderme metodu ABTS ile yapılmıştır.

ABTS, bir oksidan tarafından okside edilerek yoğun renkli radikal katyonu olan $ABTS^{\cdot+}$'ye çevrilir ve antioksidan kapasitesi, deney bileşiklerinin doğrudan ABTS radikali ile oluşan renk reaksiyonunu azaltma yeteneği olarak ölçülür. $ABTS^{\cdot+}$ hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler için uygulanabilir. $ABTS^{\cdot+}$ radikalleri $DPPH^{\cdot}$ radikalinden daha aktiftir ve hidrojen atom transferi içeren DPPH radikal reaksiyonlarının aksine, $ABTS^{\cdot+}$ radikal reaksiyonları hem hidrojen atom transferi hem de tek elektron transferi içermektedir. $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun üretilmesi, saf maddelerin, sulu karışımların ve içeceklerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturur (Gülçin 2009a).

Uygulamalar sırasında ele alınan en uygun format, kabul edilmiş antioksidan reaksiyonlarından önce sabit bir formda doğrudan üretilen radikalde renksizleştirme tekniklerinin uygulanmasıdır. $ABTS^{\cdot+}$ sulu ortamda (414, 734 ve 815 nm) ve alkol ortamında (414, 730 ve 873 nm) maksimum absorbansa sahiptir. İlk olarak $ABTS^{\cdot+}$ giderme çalışmaları Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (1993). Bu yöntem, $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu oluşturmak üzere ABTS ile reaksiyona girdikten sonra $H_2O_2$ ile ferrilmiyoglobin radikali oluşturmak için peroksidaz olarak hareket eden metmiyoglobin aktivasyonunu esas alırdı (Re *et al*. 1999).

Başlangıçta, ABTS'nin $ABTS^{\cdot+}$ formuna reaksiyonundan sonra ferrilmiyoglobini oluşturmak için $H_2O_2$ ve metmiyoglobin kullanır (Miller *et al.* 1993). Test koşullarına göre, referans antioksidanların seçimi, uygun dalga boyunun tesbiti, uygulanan reaksiyon süresi ve ABTS üretimi için farklı stratejiler uygulamaya konulmuştur. ABTS, oksidan tarafından okside edilerek radikal katyonu olan $ABTS^{\cdot+}$'ye çevrilir.

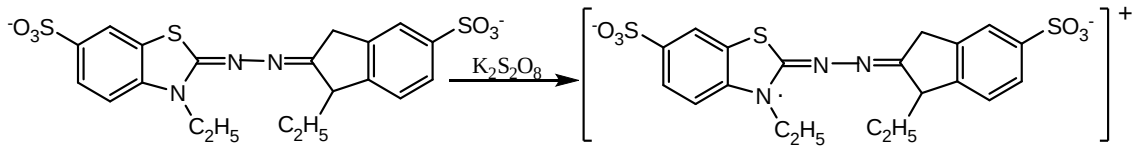
Bu amaçla $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyon $MnO_2$'nin önemli reaksiyonları olan redoks, oksidasyon ve redüksiyonuyla ilişkili olan $MnO_2$ kimyasal reaksiyonu (Miller *et al.* 1996), 2,2'-azobis(2-amidino-propan)dihidroklorit (AAPH) (Van den Berg *et al.* 1999) veya $K_2S_2O_8$ (Miller *et al*. 1996), metmiyoglobin veya yaban turpu peroksidaz kullanarak enzimatik bir reaksiyonla (Miller *et al*. 1993; Cano *et al.* 1998), veya elektrokimyasal üretimle (Alonso *et al*. 2002) üretilebilir.

Bununla birlikte $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu genellikle $K_2S_2O_8$'in kimyasal reaksiyonu ile üretilir (Gülçin *et al.* 2006a,b, 2007a,b; Gülçin *et al*. 2010, 2011a,b). Dalga boyunun belirlenmesiyle ilgili olarak diğer absorbe edici bileşiklerin azaltılması ve bulanıklığın önlenmesi amacıyla 734 nm de ölçüm tercih edilir (Arnao 2000).

Miktar olarak absorbans değeri, geriye kalan ABTS konsantrasyonuyla orantılı olarak ölçülür (Magalhaes *et al.* 2008). Genellikle kimyasal reaksiyonlar uzun bir zaman ($K_2S_2O_8$ için en fazla 16 saat) veya yüksek sıcaklıklar gerektirirken, enzim üretimi daha hızlı ve reaksiyon şartları daha hafiftir.

Cano *et al.* 1998'de $ABTS^{\cdot+}$ oluşturmak için yabanturbu peroksidazı kullandı ve reaksiyonun geniş bir pH aralığında çalışılabileceğini gösterdi. Bununla birlikte, reaksiyon mekanizması pH değişimi ile değişebilmektedir. Örneğin; elektron transferi asidik pH 8.0'de daha kolay gerçekleşmektedir. Bu varyasyon, sırasıyla tamponlanmış ortam ve organik çözücülerle gerçekleştirilen, hekzan ve sulu çözeltiler arasındaki antioksidanları ayırarak (Wu *et al.* 2004), seçici hidrofilik ve lipofilik antioksidanları ölçmek için adapte edilmiştir (Cano *et al.* 2002; Alcolea *et al*. 2002).

ABTS radikal katyonu farklı oksidan maddelerle hazırlanabilir. Oksidan olarak $K_2S_2O_8$ kullanılarak elde edilen sonuçlar peroksodisülfat varlığında $ABTS^{\cdot+}$ oranının arttığını göstermiştir. $ABTS^{\cdot+}$, ABTS/ $K_2S_2O_8$ sistemiyle üretildi.




ABTS $\qquad\qquad$ $ABTS^{\cdot+}$

**Şekil 5.16.** $K_2S_2O_8$ ile ABTS'nin oksidasyonu mekanizması

$$S_2O_8^{2-} + ABTS \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\bullet-} + ABTS^{\bullet+}$$

Burada peroksidisülfatın yıkımı elektron transferinden sonra meydana gelebilir. Aşırı ABTS varlığında, sülfat radikali şu reaksiyona göre tepkime verir.

$$SO_4^{-\bullet} + 2ABTS \rightarrow SO_4^{2-} + 2ABTS^{+\bullet}$$

net reaksiyon ise şöyle cereyan eder:

$$S_2O_8^{2-} + 3ABTS \rightarrow 2SO_4^{2-} + 3ABTS^{+\bullet}$$

ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftirler ve bir H atom transferini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferini içerir (Kaviarasan *et al.* 2006). ABTS radikalleri giderme mekanizması, yukarıda DPPH radikalleri giderme mekanizmasına benzer özellikler arz eder. Şekil 4.9, Çizelge 4.5 veya Çizelge 5.2'deki sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan bütün fenolik doğal bileşiklerin oldukça kuvvetli bir şekilde ABTS radikallerini giderdiği gözlenmektedir.

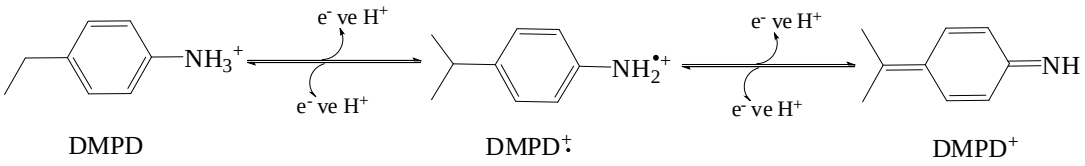
Çalışmada ABTS radikallerini giderme tayininde fenolik doğal bileşiklerin $IC_{50}$ değerleri 14-30 µg/ml arasında değişmektedir. Timolün ABTS radikali giderme aktivitesi 14,06 µg/ml ile kullanılan standartlarla karşılaştırıldığında daha iyi olduğu gözlenmiştir. Fenolik doğal bileşiklerin ABTS radikali giderme aktiviteleri sonuçları DMPD radikali giderme aktiviteleri ile paralellik sergilemektedir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir radikal giderme metodu ise $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitesidir. $DMPD^{\cdot+}$ (N,N-dimetil-p-fenilen diamin), $ABTS^{\cdot+}$ kullanımına çok benzer başka bir çalışmadır (Fogliano *et al.* 1999). N,N-dimetilfenilendiamin'den türetilen kararlı $DMPD^{\cdot+}$ radikal katyonu ile $ABTS^{\cdot+}$'yi yer değiştirerek, ABTS testi için yeni bir versiyon önerdi. Bu yöntemin geleneksel ABTS testi ile karşılaştırıldığında daha basit, daha verimli ve daha ucuz olduğunu bildirilmiştir (Fogliano *et al.* 1999; Schleisier *et al*. 2002)

Bir oksitleyici veya bir asidik pH varlığında, DMPD kararlı ve renkli DMPD radikal katyonuna ($DMPD^{\cdot+}$) dönüştürülür. $DMPD^{\cdot+}$, UV-görünür bölge spektrumu 505 nm'de maksimum absorbansı gösterir. Bununla birlikte, radikal kararlılık ve standart bir antioksidan ile stokiyometrisi hakkında hiçbir veri bulunmamaktadır.

Başka bir sorun ise, DMPD'nin sadece suda çözünür olması ve hidrofobik antioksidanlarla kullanılamamasıdır (Fogliano *et al.* 1999).

$DMPD^{\cdot+}$'ye bir hidrojen atomu aktarabilen antioksidan bileşikler, çözelti rengini söndürür ve çözeltide renksizleşme sağlar. Bu reaksiyonlar hızlıdır ve kararlı sonlanma noktası antioksidan verimliliğin bir ölçüsü olarak alınmaktadır. Bu nedenle , bu çalışma $DMPD^{\cdot+}$'den gelen tek bir elektronu süpürmek için radikal hidrojen verici yeteneğini yansıtmaktadır. Reaksiyon oldukça kararlıdır (Şekil 5.17, Fogliano *et al.* 1999; Ak and Gülçin 2008).




**Şekil 5.17.** Kararlı bir radikal olan $DMPD^{\bullet+}$'nin oluşum ve giderilme mekanizması

Ön deneyler göstermiştir ki oksidan çözelti seçimi ve $DMPD^{\cdot+}$ konsantrasyonu ile oksidatif bileşiğin konsantrasyonu arasındaki oran yöntemin etkinliği için oldukça önemlidir. Aslında radikal katyon oluşumu oldukça yavaştır ve sürekli bir absorbans artışıyla sonuçlanır.

En iyi sonuçlar son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk çözeltisi veren $FeCl_3$ ile elde edilmektedir. Dahası, bu metot düşük maliyet ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlar (Gülçin 2008). DMPD deneyi, hidrofilik antioksidanlar için özellikle uygundur ancak hidrogobik biyoaktif bileşiklerde daha az hassasiyete sahiptir. Diğer durumlarda ise ABTS ve DPPH kullanımı daha uygundur.

ABTS prosedürünün aksine, $DMPD^{\cdot+}$ çok kararlı bir sonlanma noktası garanti eder. Bu durum özellikle, büyük ölçekli bir eleme gerekli olduğu zaman önemlidir. Ayrıca, BHT veya a-tokoferol gibi hidrofobik antioksidanlar kullanıldığı zaman DMPD metodunun hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği önemli ölçüde azalmaktadır. Bu da yöntemin ana dezavantajıdır. Organik asitlerin de girişime neden olabileceği bildirilmiştir (Sanchez-Mareno 2002). Bu nedenle bu iki standart antioksidan bileşikler antiradikal deneyde genelde kullanılmamaktadır.

Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerden timol ve apomorfinin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktiviteleri, standart olarak kullanılan BHA bileşiğinden daha etkin aktiviteye sahiptir. Fenolik bileşiklerin $DMPD^{\bullet+}$ giderme aktivitelerine ait $IC_{50}$ değerleri 10-50 µg/ml arasında değişmektedir. Bununla beraber çalışmada kullanılan fenolik bileşikler arasında en düşük $IC_{50}$ değeri 50,58 µg/ml ile humik asitte gözlenirken, en yüksek $IC_{50}$ değeri 17,32 µg/ml ile timolde gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan BHT ve α-tokoferol gibi pozitif kontrollerin $IC_{50}$ değerleri kontrol değerine yakın olduğundan dolayı kıyaslamada kullanılmamıştır (Çizelde 4.5 veya Çizelge 5.2). Literatürdeki diğer çalışmalar ile mukayese edildiğinde ise daha etkili oldukları gözlenmiştir. $IC_{50}$ değerleri L-Adrenalin için 15,6 µg/ml (Gülçin 2009a) ve kurkumin için ise 34,5 µg/ml (Ak and Gülçin 2008) olarak bulunmuştur.

Radikal giderme kapsamında yapılan çalışmalarda son olarak süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de araştırıldı. Süperoksit anyon radikalleri lipit peroksidasyonunu direk başlatan oksijen merkezli radikallerdir.

Süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) biyolojik olarak oldukça zehirlidir ve istilacı mikroorganizmaları öldürmek için bağışıklık sistemi tarafından dağıtılır. Fagositlerde, istilacı patojenlerin oksijen-bağımlı öldürme mekanizmalarının kullanımı için NADPH oksidaz enzimi tarafından büyük miktarlarda üretilir. Süperoksit anyon radikali seçici reaktivitesiyle bir oksijen merkezli radikaldir. Bu *in vivo* olarak oksijene bir elektronun verilmesi sonucu elde edilir.

Bu radikal ya çeşitli metabolik süreçlerden veya uyarılmayla oluşan oksijen aktivasyonu sonucu doğar (Halliwell 2006). Süperoksit anyon enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalarla $H_2O_2$ içine gönderilir (Fridovich 1989). $H_2O_2$, indirgenmiş demir veya bakır gerektiren (Halliwell and Gutteridge 1990) Fenton reaksiyonu ile daha reaktif olan $HO^{\cdot}$ 'a dönüştürülür (Gardner and Fridovich 1992). Kısmen zayıf bir oksidan olmasına rağmen, süperoksit sınırlı kimyasal reaktivite sergiler, fakat lipitlerin peroksidasyonuna. yol açan $^1O_2$ ve $HO^{\cdot}$ içeren daha tehlikeli türleri üretilmesine neden olabilir (Halliwell and Chirico 1993).

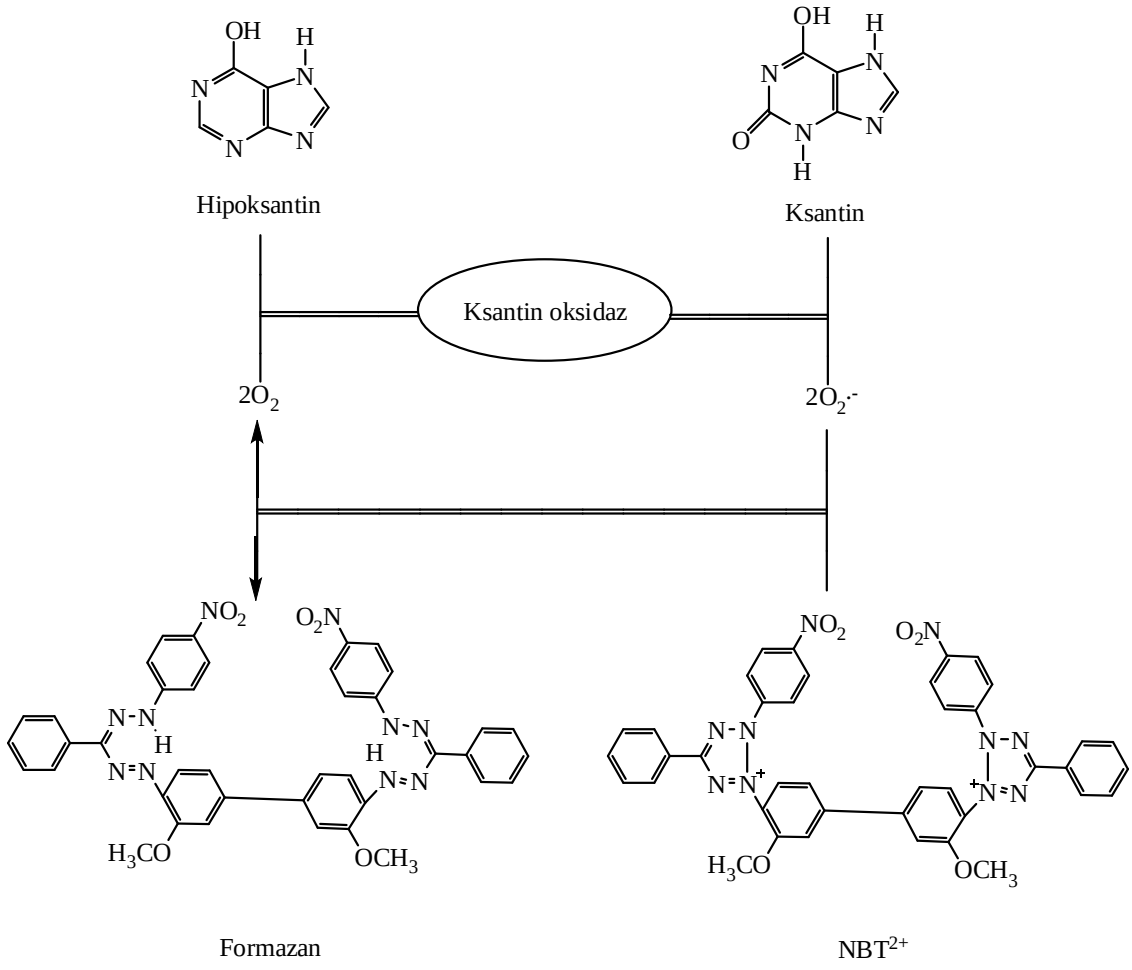
Süperoksit anyonları biyolojik makro moleküllerle reaksiyon için potansiyele sahip ve aktif serbest radikallerin habercisidir ve böylece doku hasarına neden olur (Halliwell and Gutteridge 1984). Süperoksit doğru reaksiyon hızı sabitlerinin ölçülmesine imkan tanıyan oksijen varlığında suyun radyolize edilmesiyle kolaylıkla oluşturulur (Gülçin and Daştan 2007). $HO^{\cdot}$ gibi daha reaktif türlere dönüşmesi nedeniyle birçok patofizyolojik süreçlerde ortaya konmuştur. Aynı zamanda süperoksitin lipit peroksidasyonunu doğrudan başlattığı gözlenmiştir (Wickens 2001).

Bunun yanı sıra Haber-Weiss reaksiyonu ile doğrudan hidrojen peroksitle etkileşip hidroksil iyonu ve hidroksil radikali de oluşturabilir (Gülçin *et al.* 2007b).

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + O_2$$

Ayrıca süperoksit anyon radikalleri katalaz ve peroksidaz enzimlerini de inaktive edebilir, oksihemoglobini methemoglobine yükseltgeyebilir ve eritrosit membranını da parçalayabilir (Fridovich 1983; Mavi 2005). Bütün bunların yanı sıra lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara sebep olan hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda da önemli rol oynarlar (Pietta 2000). Flavonoitlerin antioksidan özelliklerinin esasen süperoksit anyon radikalini süpürmede etkili olduğu bildirilmiştir.

$O_2^{\cdot -}$ süpürme aktivitesi tayini için kullanılan biyoanalitik yöntemler, süperoksit anyon radikalini oluşturmak için pH:7.4'te ksantin-ksantin oksidaz sisteminden yararlanır. Süperoksit anyon radikalleri 560 nm'de spektrofotometrik olarak izlenen, NBT (Nitroblue Tetrazolium) 'yi formazana indirgeyebilir (Aruoma *et al.* 1993) (Şekil 5.18).



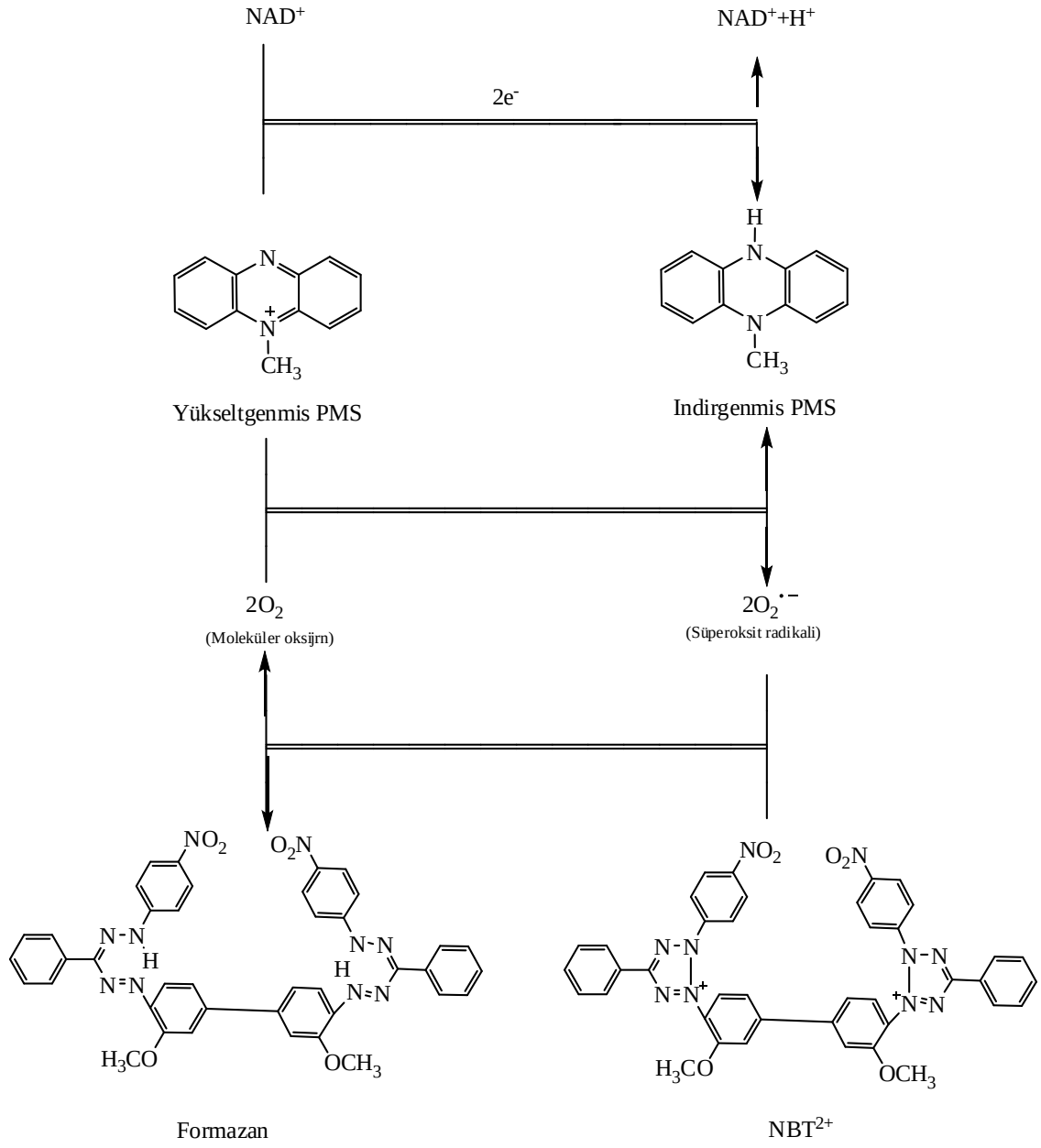

**Şekil 5.18.** Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin $NBT^{2+}$'yi formazana indirger

Normal dokularda ksantin oksidaz nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'e elektron transfer eden bir dehidrogenaz enzimidir. Stress dönemlerinde, bu enzim bir oksidaz enzimine dönüşür ve $O_2^{\cdot -}$ ve $H_2O_2$ üretir. Böylece, ksantin oksidaz artı hipoksantin (veya ksantin), test tüpü içinde pH:7,4 'te $O_2^{\cdot -}$ üretmek için kullanılabilir. Bu reaksiyon $O_2^{\cdot -}$'nin NBT'yi formazan'a indirgeme yeteneği ile ölçülebilirken (Bull *et al.* 1983) ve

formazan oluşumu spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçülebilir (Sanchez-Mareno 2002). Verimliliği artırmak ve analizi kolaylaştırmak içim, son zamanlarda NBT yerine sitokrom c kullanılan mikro-plaka formatı uyarlanmış ve 550 nm'de okunmuştur (Quick *et al*. 2000; MacDonald-Wicks *et al*. 2006; Gülçin 2011).

Ayrıca, ksantin-ksantin oksidaz elde etme sistemini kullanan, $O_2^{\cdot -}$ 'ye karşı süpürme kapasitesi, gaz kromatografisi ile ölçülen, etilen üreten a-ketometiolbütirik asit reaksiyonyla hesaplanmıştır (Vonkruedener *et al.* 1995; Lavelli *et al.* 1999). Radikal süpürme kapasitesi de ESR spektrometrisi ile ölçülebilir (Rimbach and Pallauf 1998; Calliste *et al*. 2001).

Ksantin- ksantin oksidaz sistemine benzer olarak, $O_2^{\cdot -}$ aynı zamanda nikotinamit adenin dinükleotid varlığında fenilazin metosülfatın (PMS) enzimatik olmayan reaksiyonuyla da üretilebilir.




**Şekil 5.19.** NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin $NBT^{2+}$'yi formazana indirger

Her iki sistemde de $O_2^{\cdot -}$ NBT' yi formazana indirger ve bu reaksiyon spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçülür (Aruoma *et al.* 1993). Başka bir $O_2^{\cdot -}$ oluşturma sistemi de riboflavin-metiyonin- ışıklandırma sistemidir. Çözünmüş oksijenden türeyen süperoksit anyonları riboflavin-metiyonin- ışıklandırma sistemi ile NBT'yi indirgeyecektir. Bu yöntemde süperoksit anyonları sarı rengi ($NBT_2^+$) indirgeyerek 560 nm'de ölçülebilen mavi formazanı üretir. Antioksidanlar mavi renkli NBT oluşumunu engeller (Parejo *et*

*al.* 2002). Antioksidanlarla 560 nm'de görülen absorbans azalışı, reaksiyon karışımında ki süperoksit anyonlarının azaldığını gösterir (Bursal and Gülçin 2011; Gülçin 2011).

Bu yöntemlerde yer alan iki temel reaksiyon (Liochev and Fridovich 1995):

$$2\,NBTH^{\bullet} \longrightarrow NBT + NBTH_2 \qquad \text{Formazan (a)}$$

$$NBTH + O_2 \longleftrightarrow NBT + O_2^{\bullet -} \qquad \text{Yari denge (b)}$$

Riboflavin fotokimyasal olarak aktif hale geldiğinde, a reaksiyonuna göre formazan oluşumuna yol açan $NBTH^{\cdot}$ elde etmek için NBT ile birleşir (Beauchamp and Fridovich 1971). Oksijen varlığında radikaller yarı-denge tarafından kontrol edilmektedir (b). Böylece reaksiyonlar oksijenli koşullar altında gerçekleştirildiği zaman süperoksit anyon radikalleri dolaylı olarak görünür. NBT' ye bir elektron verebilen bir antioksidan molekül varlığında, formazan bozunmasından ortaya çıkan tipik mor renk 560 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilebilir. Antioksidanlar NBT oluşumunu inhibe etmekte ve süperoksit anyon radikallerini süpürmektedir. Ayrıca $O_2^{\cdot -}$ için NBT ile yarışarak, reaksiyon hızını düşürmektedir.

$O_2^{\cdot -}$ için yaygın olarak kullanılan diğer bir prob sitokrom c'dir. Ferrisitokrom c 'nin ferrositokrom c 'ye indirgenmesi kinetik analizleri 550 nm'de gözlenmiştir (Aruoma *et al.* 1993; Quick *et al.* 2000). NBT indirgenmesinin azaltılmasının, sitokrom c ye göre genellikle çok daha fazla olduğu gözlenmiştir (Aruoma *et al.* 1993). Bunun nedeni, $O_2^{\cdot -}$ 'nin NBT ile olan reaksiyonundansa, sitokrom c ile daha hızlı reaksiyona girmesidir ve böylece eklenen $O_2^{\cdot -}$ süpürücüsünün verilen konsantrasyonu sitokrom c sisteminde daha az etkili bir rekabet gösterir ve daha az bir inhibisyon uygular.

Mevcut çalışmada ise süperoksit anyon radikalleri benzer şekilde metiyonin/riboflavin/ışık sisteminde üretilmekte ve üretilen süperoksit anyon radikalleri yukarıda verilen mekanizmalar ile aynı şekilde $NBT^{2+}$'yi formazana yükseltger. Oluşan formazan ise 560 nm'de maksimum absorbans verir.

Fenolik bileşiklerin süperoksit giderme aktivitelerine ait $IC_{50}$ değerleri 25-40 µg/ml arasında değişmektedir. Bununla beraber en düşük $IC_{50}$ değeri 26,70 µg/ml ile timolde gözlenirken, en yüksek $IC_{50}$ değeri 37,55 µg/ml ile hümik asitte gözlenmiştir. Ayrıca, hümik asit $IC_{50}$ değeri BHA 'dan düşük olmasına rağmen, diğer standart antioksidanlarla kıyaslandığında kuvvetli bir süperoksit giderme aktivitesine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3 ve Çizelge 5.2).

Mevcut çalışmada kullanılan diğer bir yöntem tiyosiyanat metoduna göre fenolik bileşiklerin total antioksidan kapasitesitelerinin belirlenmesidir. Total antioksidan kapasitesi gıda ve tıbbi biyoaktif bileşenler için yaygın bir parametre olarak kullanılır. Lipit peroksidasyonu gibi oksidatif yıkımı engellemek amacıyla kullanılan bileşiğin özelliği olarak tanımlanmaktadır (Roginsky and Lissi 2005).

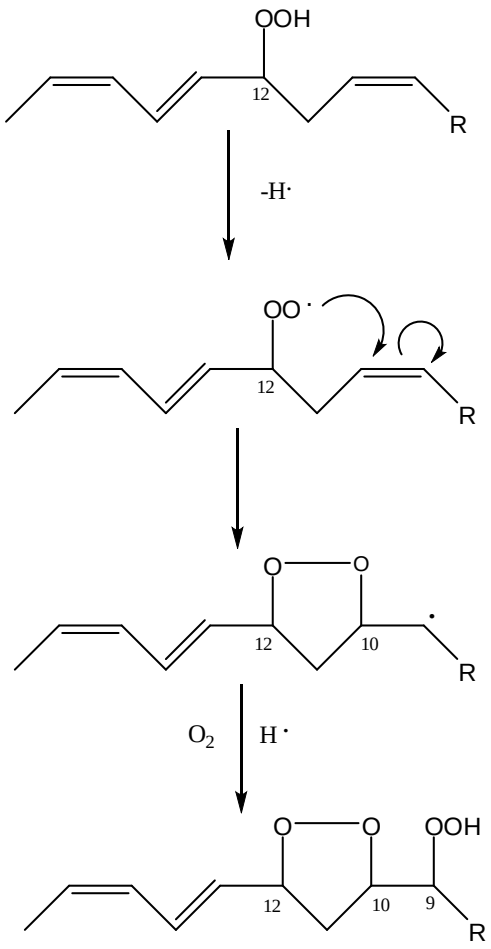
Lipit peroksidayonu ise herhangi bir sayıda karbon-karbon çift bağı içeren lipitlerin oksidatif bozulması olarak tanımlanmıştır. Genel olarak, biyoaktif bir bileşiğin olası etkisinin belirlenmesi için, linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu kısıtlamak amacıyla afinitesi test edilmiştir. Linoleik asit oksidasyonu, ikincil oksidasyon ürünlerini parçalayan linoleik asit hidroperoksitlerini üretir. Tiyosiyanat metodu lipit oksidasyonu başlangıç aşamasında peroksit seviyesini ölçmek için kullanılırdı. Peroksitler, $Fe^{3+}$ oluşturmak için $Fe^{2+}$ ile reaksiyona giren linoleik asit oksidasyonu sırasında oluşur. Sonra, iyonlar tiyosiyanat ($SCN^-$) ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks 500 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Antioksidan varlığında, linoleik asit oksidasyonu oldukça yavaştır. Bu nedenle tiyosiyanatın oluşumu esnasındaki renk gelişimi de yavaş olacaktır (Gülçin 2002).

Biyolojik sistemlerdeki lipit peroksidasyonu çeşitli patolojik sonuçlara yol açabilecek bir toksikolojik olgu olarak düşünülmüştür (Hochstein and Atallah 1988). Elde edilen lipit hidroperoksitleri, membran akışkanlığını ve membran proteinlerinin işlevini etkileyebilir. Ayrıca, lipit peroksitleri, serbest radikal aracılı lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu harekete geçiren epoksiallilik proksil radikallerini oluşturmak için oksijenasyona ve demir aracılı tek elektron indirgenmesine uğrayabilir. Lipit

peroksidasyonunun son ürünleri, pek çoğu hücreler için son derece toksik olan, 4-hidroksil nonenal ve malonaldehit gibi reaktif aldehitlerdir (Yu and Yang 1996).

Ayrıca lipit peroksidasyonuyla üretilen reaktif aldehitler, proteinler ve DNA gibi diğer hücresel hedeflere saldırabilirler; böylece, hücre membranlarında diğer makro moleküllere ilk hasarı yararlar, çünkü membranlarda oluşan lipit peroksitleri *in vivo* ROS üretiminin önemli bileşenleridir. Onların detoksifikasyonu, oksidatif stress altındaki organizmanın hayatta kalabilmesi için kritik görünmektedir (Dargel 1992). Bu nedenle, antioksidanlar lipit peroksidasyon inhibisyonunda veya serbest radikallerin hücresel hasarına karşı korumada hayati bir rol oynamaktadır. Gıda ve biyolojik örnekler için çok çeşitli antioksidan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir.

Linoleik asit gibi doymamış yağ asitleri ile oluşturulan hidroperoksitler, dihidroperoksitleri ve hidroperoksi epidioksitlerle bisikloendoperoksitleri içeren oksijen bağlı halkaya sahip molleküller oluşturan oksidasyon reaksiyonlarına maruz kalabilirler. Linoleik asitlerden hidroperoksi epidioksitlerin oluşumu için mekanizma Şekil 5.20'de gösterilmiştir (Neff *et al.* 1981).




**Şekil 5.20.** 9-Hidroperoksi endoperoksit oluşturan α-linoleik asitten 12-hidroperoksit reaksiyonu

Lipit oksidasyonu bir seri serbest radikal bağımlı zincir reaksiyonu işlemleri içerir ve bu, çeşitli tiplerde bir çok biyolojik hasarla ilişkilidir. Tiyosiyanat metodu lipit oksidasyonunun ilk ürünü olan, oksidasyonun başlangıç aşamasında üretilen peroksit miktarını ölçer. Bu çalışmada, ölçme işlemi deney süreci boyunca oto-oksidasyonla linoleik asit emülsiyonundan üretilen hidroperoksit miktarı için gerçekleştirildi. Sonra demir klorür ve tiyosiyanat hidroperoksitler yoluyla demir tiyosiyanat üretmek için birbiri ile reaksiyona girdi (Inatani *et al.* 1983).

**Çizelge 5.3.** Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların 30 µg/ml ve 60. saate karşılık gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri

| **Antioksidanlar** | **% giderme (30 µg/ml - 60 h)** |
|---|---|
| α-Tokoferol | 52,51 |
| Troloks | 93,07 |
| Apomorfin | 86,51 |
| Timol | 84,90 |
| Hümik asit | 74,78 |

Çalışmamızda kullandığımız fenolik doğal bileşiklerin total antioksidan kapasiteleri standart antioksidanlarla birlikte her 12 saatte bir ölçüm alınarak, toplam 72 saatlik çalışma sonunda kaydedildi. Maksimum absorbans değerlerine 60. saatte ulaşıldı. Apomorfin, timol ve hümik asitin total antioksidan değerleri standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında Çizelge 5.3'te görüldüğü gibi, kullandığımız fenolik bileşiklerden apomorfinin en yüksek $IC_{50}$ değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda apomorfin, timol ve hümik asitin α-tokoferol'den çok daha yüksek $IC_{50}$ değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Timol ve hümik asitte antioksidan kapasiteleri konsantrasyon artarken (Şekil 4.14, 4.15, 4.16), apomorfinde bir korelasyon gözlenmemiştir.

Sonuç olarak bütün metotlar genel olarak değerlendirildiğinde apomorfin, timol ve hümik asit fenolik doğal bileşikleri benzer diğer bileşiklerle ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek aktiviteye sahip oldukları gözlendi. Bu bilgiler literatürde verilen bilgiler ile de örtüşmektedir (Chimi *et al.* 1991; Arouma and Cuppett 1997).

Karbonik anhidraz (CA, Karbonat hidroliyaz E.C 4.2.1.1) enzimi ise eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici bir enzimdir. Karbon dioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizler. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur (Gülçin *et al*. 2004c). CA bu reaksiyonun hızını ileri derecede arttırarak saniyede $10^4$-$10^6$ $s^{-1}$ reaksiyon hızına ulaştırır (Çoban *et al.* 2007).

Mevcut çalışmada insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırılarak doğal antioksidan kaynaklarda da bol miktarda bulunan bazı fenolik yapılı bileşiklerin her iki izoenzim üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi.

Karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, eritrositlerden saflaştırıldı. Çalışmada Sepharose-4B üzerinde hazırlanan afinite jeli kullanıldı. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi.

CNBr ile aktifleştirilen jele L-tirozin uzantı kolu takılır. Sonra, sülfanilamit diazolanarak tirozine kenetlendirildi. Sülfanilamit enzimin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligant olarak kullanıldı.

Tirozin ise enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamak için uzantı kolu olarak seçildi. Zira karbonik anhidrazın aktif bölgesi enzimin globüler yapısının 12-15 $A^o$ derinliğinde olduğu X ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Cuatracases 1970). Bu durumda hazırlanan afinite jeline belirtilen derinliğe erişebilmek için istenilen uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. İşte tirozin bu amaçla kullanılır.

Jele adsorbe olan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM $Na_2HPO_4$/1 M NaCl (pH:6,3) ve 0,1 M $CH_3COONa$/0,5 M $NaClO_4$ (pH:5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı. hCA-I ve hCA-II için tek bant gözlendi (Şekil 4.17). hCA-I'in spesifik aktivitesi 1188,9 EU/mg olup %59,4 verimle saflaştırıldı. hCA-II izoenzimi ise spesifik aktivitesi 5085,7 EU/mg olup, %65,9 verimle saflaştırıldı (Çizelge 4.8).

Enzim ile ilgili yapılan kinetik çalışma olan $K_m$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması için yapılan çalışmada Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan $K_M$ ve $V_{max}$ değerleri ise hCA-I izoenzimi için sırasıyla 6,82 mM, 7,22

EU/ml.dak ve hCA-II için ise sırasıyla 5,79 mM, 7,21 EU/ml.dak olarak hesaplandı (Şekil 4.19 ve 4.20).

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

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

Birincisi; Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen $CO_2$ hidrataz aktivitesidir (1960). Bu yöntemle $CO_2$'nin $H_2O$ ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen $H_2CO_3^{-}$'ün $H^+$ ve $HCO_3^-$ iyonlarına ayrışarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu aktivite, CA izoenzimlerinin fizyolojik fonksiyonu olduğundan, fenolik asitlerin CA izoenzimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla da kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Amstrong ve arkadaşları tarafından modifiye edilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (1966). Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de absorbsiyon vermektedir. Bunun tercih edilme nedeni Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassas olmasıdır. Ancak hidrataz aktivitesinin ölçümü fizyolojik olarak daha fazla değer taşır. p-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce az miktarda asetonda çözüldü, daha

sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltileri hazırlandı. Çözücü olarak asetonu seçilmesinin sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olarak kullanılmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967).

Aktivite ölçüm pH'sı hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için 7,4 olarak alındı. Bunun sebebi ise hCA-I ile hCA-II izoenzimlerinin bulunduğu ortam olan eritrositlerin pH'sının 7,4 olmasından dolayıdır.

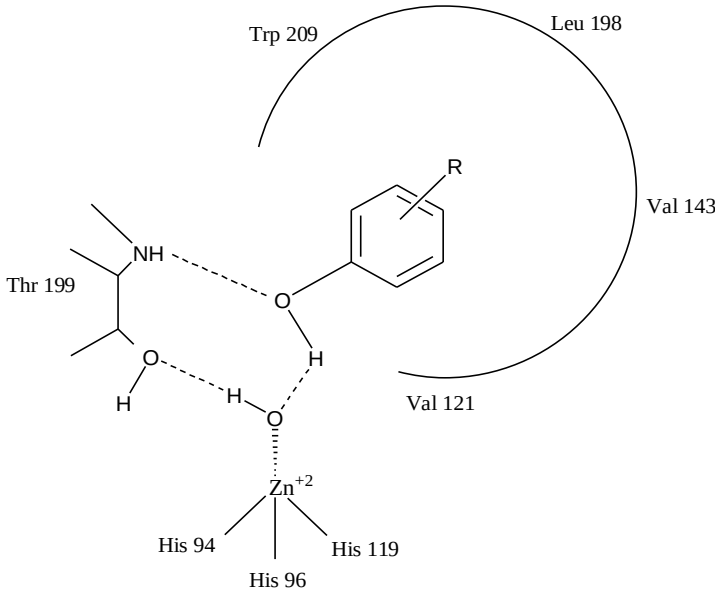
Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemesinde $I_{50}$ değerleri kullanılmaktadır. Sığır CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerini belirlemek için fenolik doğal bileşiklerin konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlandı ve enzim üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için insan kanından saflaştırılan CA izoenzimleri için üç farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan hümik asitin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi ve $I_{50}$ değerleri bunlara bağlı olarak hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan $I_{50}$ değerleri Çizelge 4.9'da gösterildi.

Sonuçlara bakıldığı zaman CA için hidrataz metodunun esteraza göre daha düşük $I_{50}$ değerleri verdiğini (Çizelge 4.9, 4.10 ve 4.11) ve bu yüzden hidrataz metodunu yani kendi substratı olan $CO_2$'yi tercih ettiği görülmektedir (Şentürk *et al.* 2009). Son olarak ise edilen CA izoenzimleri için üç farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek $K_i$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.10 ve 4.11).

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

Fenollerin ve fenolik doğal bileşiklerin, CA inhibitörleri olarak araştırmanın temel nedeni, basit fenollerin (PhOH) CA'nın asıl izoformu yani hCA-II si başta olmak üzere substrat olarak $CO_2$ ye karşı tek yarışmalı inhibitör olduğunun ispatlanmasından dolayıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hCA-II ile fenollerin etkileşimini gösteren X-ray kristal yapısı aydınlatıldı (Christie *et al.* 1997).

Bu çalışmada enzimin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ ile fenollerin fonksiyonel –OH grubunun bağlandığını göstermişlerdir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağının yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vasıtasıyla –OH'ını enzim aktif bölgesinin çinko bağlı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin CA ya bağlandığını ispatladılar (Şentürk *et al.* 2009).




**Şekil 5.21.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan $Zn^{2+}$ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli (Bayram *et al.* 2008)

Son zamanlarda grubumuz tarafından fenol ve fenolün yerini alan türevlerden bazılarının tüm memeli izozimlerle etkileşimlerini araştırdılar. Aslında, çeşitli izoenzimlerin bu ajan sınıfıyla olan inhibisyon profili, birçok basit fenol için milimolardan submikromolar arasında değişen inhibisyon sabitlerine sahip, oldukça

değişken bir profildir. Bu nedenle, bu araştırmada gıda katkı maddeleri olarak klinik ve antioksidan uygulamaları olan ve antioksidan etkiye sahip oldukları mekanizmaları ile tez kapsamında değerlendirilen fenolik abileşiklerin CA ile ilgili araştırmaya dâhil edilmesi çalışmayı orijinal hale getirdi.

Sonuç olarak;

1. Fenolik doğal bileşiklerin çalışılan konsantrasyonlarda (10-30 µg/ml), artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak total antioksidan aktivitede, indirgeme kapasitelerinde, metal şelatlamalarında, DPPH ve ABTS gidermelerinde artış gözlenmiştir.

2. Ferröz iyonlarını şelatlama aktivitesi, DMPD ve süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı pozitif bir korelasyon gözlenmedi.

3. Antioksidan çalışmalarında standart olarak, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı. Mukayeseler sonucunda kullanılan apomorfin, timol ve hümik asitin kullanılan standartların aynı konsantrasyonlarındaki aktivitelerine eş değer veya daha yüksek olduğu belirlendi.

4. Karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B L-tirozin afinite jeli kullanılarak eritrositlerden saflaştrıldı.

5. hCA-I'in spesifik aktivitesi 1188,9 EU/mg olup %59,4 verimle saflaştırılırken, hCA-II 5085,7 EU/mg spesifik aktiviteye sahip olup %65,9 verimle saflaştırıldı.

6. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-Page elektroforezi uygulandı ve her iki izoenzim için (hCA-I ve hCA-II) tek bant gözlendi.

7. Lineweaver-Burk grafiği sonucunda elde edilen kinetik verilere göre $K_M$ ve $V_{max}$ değerleri hCA-I için sırasıyla 6,82 mM, 7,22 EU/ml.dak ve hCA-II için sırasıyla 5,79 mM, 7,21 EU/ml.dak olarak hesaplandı.

8. Enzim aktivitesi tayini için iki metot kullanıldı. Hidrataz aktivitesi sonuçlarına göre Aktivite (%)-[I] grafikleri için ve $I_{50}$ değerleri bunalara bağlı olarak hesaplandı. Bunlara göre hümik asit inhibisyon gösterirken, apomorfin ve timolde inhibisyon etkisi gözlenmedi.

9. Son olarak elde edilen CA izoenzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek Ki değerleri hesaplandı.

## KAYNAKLAR


Abuja, P.M., Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density-lipoprotein oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4091-4096.

Abushita, A.A., Hebshi, E.A., Daood, H.G., Biacs, P.A., 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. Food Chemistry, 60, 207-212.

Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemico-Biological Interaction, 174, 27-37.

Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry (Accepted).

Alcolea, J.F., Cano, A., Acosta, M., Arnao, M.B., 2002. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activities of grapes. Nahrung, 46, 353-356.

Alhan, C., Şan, M., 2002. Kroner Kalp hastalığı tedavisinde anti-oksidanlar yararlı mı? Türk Klinik Kardiyoloji, 15, 203-213.

Alonso, A.M., Dominguez, C., Guillen, D.A., Barroso, C.G., 2002. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3112-3115.

Altınışık, M., 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Aydın.

Andersen, A., 2006. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-mcresol,p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, mcresol,o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. International Journal of Toxicology, 1, 29-127.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Altun, M., 2005. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)- neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. Free Radical Research, 39, 949-961.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Erça, E., 2006. The Cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International Journal of Food Science and Nutrition, 57, 292-304.

Arabshahi-Delouee S., Urooj A., 2006. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102, 1233-1240.

Aras, Ö., 2006. Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.

Aras Hisar, Ş., Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Yanık, T., 2004. Effect of vitamin E on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes in vitro and in vivo. Acta Veterinaria Hungarica, 52, 413-422.

Arkan, S., 2008. Karvakrol ve timolün izole sıçan kalp kası üzerine etkileri. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.

Armstrong, J., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. Journal of Biology and Chemistry, 214, 5137.

Arnao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science and Technology, 11, 419-421.

Arouma, O.I., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., 1993. Evaluation of the antioxidant and proantioxidant actions of gallic acid and its derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1880-1885.

Arouma, O.I., Cuppett, S.L., 1997. Antioxidant methodology- in vivo and in vitro concepts. AOCS Press. pp 141-172, USA.

Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L. and Cisneros-Zevallos, L., 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor)* and Sorghum product. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6657-6662.

Bakkalbaşı, E., 2009. Farklı ambalaj materyalleri ve depo koşullarının ceviz içi bileşimine etkisi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.

Balladin, D.A. and Headley, O., 1999. Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris Linne*) herbs. Renewable Energy, 17, 523-531.

Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D. and Vuotto, M.L., 2006. Antibacterial and antioxidant activities in sideritis italica (*Miller*) greuter et burdet essential oils. Journal of Ethnopharmacology, 107, 240-248.

Bayram, E., Senturk, M., Kufrevioglu, O. I, Supuran, C.S., 2008. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 16, 9101-9105.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry, 44, 276-287.

Benzes, E.C., Musgrove, C.C. and Kesterson, L., 1989. Naloxone and mortality in the gerbil stroke model. Southern Medical Journal, 82, 555-557.

Benzie, I.F.F., 1996. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). Clinical Biochemistry, 111-116.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70-76.

Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 633-636.

Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erytrocytes *in vitro* and from rat erytrocytes *in vivo*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25, 966-969.

Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 193-197.

Bianchi, G. and Landi, M., 1985. Determination of apomorphine in rat plasma and brain by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography, 338, 230-235.

Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, 334-354. İstanbul.

Bindolli, A., Rigobello, M.P. and Deeble, D.J., 1992. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. Free Radical Biology and Medicine, 13, 391-405.

Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 26, 1199-1200.

Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel Wissenchaft und Technology, 30, 609-615.

Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.H., Bostoğlou, E., Govaris, A., Papgeorgiou, G., 2003. The efffects of dietary oregano essential oil and α-tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. Meat Science, 65, 1193-1200.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wissen Technology, 28, 25-30.

Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Food Research International, 44, 1482-1489.

Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22, 285-291.

Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 18, 371-375.

Cabiscol, E., Levine, R.L., 1996. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 4170-4174.

Calliste, C.A., Trouillas, P., Allais, D.P., Simon, A., Duroux, J.L., 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 3321-3327.

Canfield, L.M., Valenzuela, J.G., 1993. Cooxidations, significance to carotenoid action *in vivo*. Annual New York Academic Science, 691, 192-199.

Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., Arnao, M.B., 2002. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the $ABTS^{\cdot+}$ assay. Redox Report, 7, 103-109.

Cano, A., Hernandez-Ruz, J., Garca-Canovas, F., Acosta, M., Arnao, M.B., 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. Phytochemical Analysis, 9, 196-202.

Carter, N., Hewertt-Emmentt, D., Jeffery, S., Tashian, R.E, 1981. Testesterone induced sulfonamid resistant carbonic anhydrase ısozyme of rat liver is indistinguisable from skeletal muscle carbonic anhydrase III. FEBS Letters, 128, 114-118.

Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve sebze işleme teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları 35, 77-88, Ankara.

Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Özkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi, 1-174. In Edition, B. Cemeroğlu, Meyve Sebze Teknolojisi. 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.

Champe, P.C. and Harvey, R.A., 1997. Biochemistry.

Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., 2000. The Carbonic anhydrase-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D.) 8th Edition, 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.

Chen, C.J., Cheng, F.C., Liao, S.L., Chen, W.Y., Lin, N.N., Kuo, J.S., 2000. Effects of naloxone on lactate, pyruvate metabolism and antioxidant enzyme activity in rat cerebral ıschemia/ reperfusion. Neuroscience Letters, 287, 113-116.

Chen, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L., Akesson, B., 2003. Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. International Dairy Journal, 13, 927-935.

Chen, Y., Aviad, T., 1990. Effects of humic substances on plant readings. proceedings of symposum conponsored by the international humic substance society, Chicago Illinois, December 2, 1985 (Edited by P. MacCorthy *et al*. 1990), American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc. 161-186.

Chevion, M., Liang, Y., Harel, R., Berenhstein, E., Uretzky, G., Kitrossky, N., 1993. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible productive criteria for tissue injury. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90, 1102-1106.

Chiara, G. And Gessa, G.L., 1978. Pharmacology and neurochemistry of apomorphine. Advances of Pharmacology and Chemoteraphy, 15, 87-160.

Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M., 1991. Peroxy and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. Journal of American Oil Chemical Society, 68, 307-330.

Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45, 35-40.

Ciani, E., Groneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Contestabile, A. And Paulsen, R. E., 1996. Brain Research, 728, 1-6.

Cuatracases, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. Journal of Biological Chemistry, 245-3059.

Çakır, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yıldırım, A., 2006. Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium oriantale L*. var. oriantale. Turkish Journal of Chemistry, 30, 1-12.

Çelik, İ., 1995. Bazı pestisit ve bitki büyüme regülatörlerinin sığır ve insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine etkilerinin araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van.

Çiftçi, M., Küfrevioğlu, M., 2008. Kromatografiye giriş. 61-69, Erzurum.

Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase *in vitro* and *in vivo*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30, 2257-2261.

Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: *in vivo* and *in vitro* studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 266-270.

Çoban, A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., 2009. Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 15;17, 5791-5.

Dargel, R., 1992. Lipid peroxidation-a common pathogenetic mechanism? Experimental and Toxicologic Pathology, 44, 169-181.

Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 50, 279-289.

Denyer, S.P. and Stewart, G.S.A.B., 1998. Mechanisms of action of disinfectants. International Biodeterioration Biodegredation, 248.

Devlin, T.M., 2002. Biochemistry with clinical correlations. Kanada.

Dinis, T.C.P., Maderia, V.M.C., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivates (Acetaminophen, Salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315, 161-169.

Diplock, A.T., 1997. Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? Free Radical Research, 27, 511-532.

Disilvestro, R.A., 2001. Flavonoids as antioxidants. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, p:127-138 Edit: Wildman, R.E.C., CRC Press, ISBN: 0 8493 8734 5, USA.

Dizdaroğlu, M., 1991. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. Free Radical Biology and Medicine, 10**,** 225-242.

Dizman, M., 2008. Hümik asitler ve insan sağlığı, www.humikasit.blogspot.com.

El-Bachá, R.S., Daval, J., Koziel, V., Netter, P. and Minn, A., 2001. Toxic effects of apomorphine on rat cultured neurons and glial C6 Cells, and protection with antioxidants. Biochemical Pharmacology, 66, 73-85.

Endo, Y., Usuki, R., Kareda, T., 1985. Antioxidant effects on chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark II. Journal of the American Oil Chemists Society, 62, 1387-1390.

Ergün, A., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ., Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan M.K., Küçükersan, S., Önol, A.G., Muğlalı, Ö.H., Şehu, A., 2002. Yemler, yem hijyeni ve teknolojisi. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Pozitif Matbaacılık, 465, Ankara.

Faden, A.I., 1988. Role of thyrotropin- releasing hormone and opiate receptor antagonists in limiting central nerveous system injury. Advanced in Nevrology, 47, 531-546.

Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L., Porath, J. 1972. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. FEBS Letters, 24, 229.

Fallis, R.J., Fisher, M. and Lobo, R.A., 1983. A double blind trial of naloxone ın the treatment of acute stroke. Stroke, 15, 627-629.

Feldstein, J.B., Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. Journal of Biological Chemistry, 259, 5447-5453.

Fernley, R.T., Wright, R.D., Coghlan, J.P., 1988. Complete amino-acid sequence of ovine salivary carbonic-anhydrase. Biochemistry, 27, 2815-2820.

Fidan, F.A., Dündar, Y., 2007. *Yucca schidigera* ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipkolesterolemik ve antioksidan etkileri, Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, 47, 31-39.

Flohe, R.B., Traber M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. The FASEB Journal, 13, 1145-55.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1035-1040.

Foo, L.Y., Porter, L.J., 1981. The structure of tannins of some edible fruits. Journal Science Food Agricaltural, 32, 711-716.

Frel, B., 1994. Natural antioxidants in human health and disease, Academic Press, 387-409. Sandiego.

Fresht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, 166 New York.

Fridovich, I., 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 23, 239-257.

Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. The Journal of Biological Chemistry, 264, 7761-7764.

Gancher, S.T., Woodward, W.R., Boucher, B., Nutt, J.G., 1989. Peripheral pharmacokinetics of apomorphine in humans. Annals of Neurology, 26, 232-238.

Gaoni, Y., And Mechoulam, R., 1971. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. Journal of The American Chemical Society, 93, 217-224.

Gardner, P.R., Fridovich, I., 1992. Inactivation-reactivation of aconitase in Escherichia coli. A sensitive measure of superoxide radical. The Journal of Biological Chemistry, 267, 8757-8763.

García-Parrilla, M.C., 2008. Antioxidantes en la dieta mediterránea. Nutrición Clínica en Medicina, 3, 129-140.

Gassen, M., Glinka, Y., Pinchasi, B., Youdim, M.B., 1996. Apomorphine is a highly potent free radical scavenger in rat brain mitochondrial fraction. European Journal of Pharmacology, 308, 219-225.

Gezici, O., 2004. Hümik asitlerin katı faz ekstraksiyon sisteminde kullanımı, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., 1999. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2213-2217.

Gil, M.I., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 4581-4589.

Gözükara, E., 1997. Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara.

Graham, D.G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Molecular Pharmacology, 14, 633-643.

Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 114, Erzurum.

Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56, 491-499.

Gülçin, İ., 2006a. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217, 213-220.

Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. Life Sciences, 78, 803–811.

Gülçin İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. Amino Acids, 32, 431-438.

Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Synthesis of dimeric phenol derivatives and determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22, 685-695.

Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry, 23, 871-876.

Gülçin, İ. 2009a. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. Chemico-Biological Interaction, 179, 71-80.

Gülçin, İ,. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 210-218.

Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activiy of food constituents: an overview. Review, Archives of Toxicology, 86, 345-391.

Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.İ., 2002. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. Journal of Pineal Research, 33, 167-171.

Gülçin İ., Büyükokuroğlu M.E., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. Journal of Pineal Research, 34, 278-281.

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. *In vitro* antioxidant properties of morphine. Pharmacological Research, 49, 59-66.

Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004b. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.), Italian Journal of Food Science, 16, 17-30.

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu M.E., 2004c. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 613-616.

Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. 2004d. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563.

Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53, 281-285.

Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. Journal of Ethnopharmacology, 101, 287-293.

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., 2006a. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). European Food Research and Technology, 223, 759-767.

Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006b. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of Hedera colchica: 3-O-(b-D-glucopyranosyl)-hederagenin. Phytotheraphy Research, 20, 130-134.

Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., Köksal, E., 2007a. A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. African Journal of Biotechnology, 6, 410-418.

Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007b. Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C.KOCH var. joannis. Research Journal of Biological Sciences, 2, 372-382.

Gülçin, İ, Kirecci, E, Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37, 175-188.

Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. Food and Chemical Toxicology, 48, 2227-2238.

Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel, M., Erdoğan, U., 2011a. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). Journal of Food Science, 76, 585-593.

Gülçin, İ., Topal, F., Öztürk Sarikaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel, M., 2011b. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). Records of Natural Products, 5, 158-175.

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., 2012. Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrse isoenzymes inhibitors. Mini Reviews in Medicinal Chemistry.

Gündüz, T., 1998. Koordinasyon kimyası, Gazi Kitabevi İkinci Baskı, Ankara.

Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Reichel, T.L., 1998. High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1887-1892.

Halliwell, B., 1991. Drug antioxidant effects. Drug, 42, 569-605.

Halliwell, B., 1994, Free radicals and antioxidants: A Personal View. Nutritional Review, 52, 253-265.

Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization; methodology mechanism. Biochemical Pharmacology, 49, 1341-1348.

Halliwell, B., 1996. Oxidative stres, nutrition and health: experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radical Research, 25, 57-74.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal, 219, 1-4.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edition. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology, 186, 1-85.

Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. American Journal of Clinical Nutrition, 57, 715-725.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd Edition. Oxford University Press, New York.

Hampson, A.U., Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D., 1998. Cannabidiol and (-)$\Delta^9$-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proceeding of The National Academy of Science, 95, 8268-8273, USA.

Handal, K.A., Schauben, J.L. and Salamone, F.R., 1983. Naloxone. Annals of Emergency Medicine, 12, 438-445.

Harborne J.B., 1964. Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press , 618, New York.

Haugaard, N., 1968. Cellular mecanism of oxygen toxicity. Physology Review, 48, 311-373.

Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. FASEB Journal, 10, 481-490.

Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. Biochemical Journal, 392, 83-92.

Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2005a. Effect of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout (*Oncorhyncytes mykiss*) on human erythrocytes carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20, 35-39.

Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Aras Hisar, Ş., Yanık, T., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005b. The effect of melatonin hormone on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29, 841-845.

Hochstein, P., Atallah, A.S., 1988. The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. Mutation Research, 202, 363-375.

Howlett, A.C., 1987. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marihuana. Neuropharmacology, 26, 507-512.

Hua, S.S.T., Grosjean O.K., Baker J.L., 1999. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. Letters in Applied Microbiology, 29, 289-291.

Huang, D., Ou, B., Prior R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal Agricaltural Food Chemistry, 53, 1841-1856.

Hudson, B.J.F., 1990, Food antioxidants. Elsevier Applied Science, London and New York, 1-316.

Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione s-transferase, reductase and peroksidase in human blood. The Science of the Total Environment, 248, 45-50.

Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) and their derivatives. Agricultural Biology and Chemistry, 47, 521-528.

Innocenti, A., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: thioxolone versus sulfonamides for obtaining isozyme-selective inhibitors? Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 18, 3938-3941.

Innocenti, A., Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenols effectively inhibit mammalian isoforms I-XV. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 20, 5050-3.

Iwahara, S., 1983. Metabolism of veratryl type compounds by intact cells of fusarium species. Mokuzai Gakkaishi 29, 329-335.

Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., 1989. Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat. Archives of Biochemistry and Biophysics, 238, 170-177.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of iranian *Ocimum accesions*. Food Chemistry, 83, 547-550**.**

Jongen, W., 2002. Fruit and vegetable processing improving quality. 25-39-40.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Boone, C.W., Simic, M.G., 1999. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. Journal of the American Chemical Society, 121, 9677-9681.

Juven, B., Henis, Y., 1970. Studies on antimicrobial activity of olive phenolic compounds. Journal of Applied Bacteriology, 33, 721-32.

Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricaltural and Food Chemistry, 47, 3954-3962.

Karadeniz, F., 2006. Domates ve havuçta karotenoid madde dağılımı ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 20030711077.

Kaviarasan, S., Naik, G.H., Gangabhagirathi, R., Anuradha, C.V., Priyadarsini, K.I., 2007. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. Food Chemistry, 103, 31-37.

Kawabata, J., Okamoto, Y., Kodama, A., Makimoto, T., Kasai, T., 2002. Oxidative dimers produced from protocatechuic and gallic esters in the DPPH radical scavenging reaction. Journal of the Science of Food and Agriculture, 50, 5468-5471.

Kazazica, S.P., Butkovica, V., Srazica, D., 2006. Gas-phase ligation of $Fe^{+}$ and $Cu^{+}$ ions with some flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 8391-8396.

Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, 97-125, Erzurum.

Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B., and Kirk, T.K., 1985. The ligninase of phanerochaete chrysosporium generates cation radicals from methoxybenzenes. Journal of Biological Chemistry, 260, 2609-2612.

Khaliulin, I., Borman, J.B., Chevion, M. and Schwalb, H., 2003. Cardioprotective and antioxidant effects of apomorphine. Free Radical Research, 37, 721-730.

Kılınç, K., Kılınç, A., 2002. Oksijen toksisitesisin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 33, 110-118.

Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G., Rees, D.C., 1996. A left-handed beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon methanosarcina thermophila. EMBO Journal, 15, 2323-2330.

Kneepkens, C.M., Lepage, G., Roy, C.C., 1994. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. Free Radical Biology and Medicine, 17, 127-160.

Köksal E., 2007. Karnabahar (*Brassica oleracea* L.) peroksidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32, 65-78.

Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., 2009. On the *in vitro* antioxidant activity of silymarin. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24, 395-405.

Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparium. International Journal of Parasitology, 31, 661-668.

Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680.

Lakkis, M.M., Bergenhem, N.C.H., Tashian, R.E., 1996. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in e-coli and demonstration of its $CO_2$ hydrase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 226, 268-272.

Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27, 969-978.

Lavelli, V., Hippeli, S., Peri, C., Elstner, E.F., 1999. Evaluation of radical scavenging activity of fresh and air-dried tomatoes by three model reactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3826-3831.

Lehninger, A. L., 1993. Principles of biochemistry, New York, Worth Publishers Inc., 2th Edition., 198-239.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry, 3.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.

Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, A.E.M.F., Rietjens, I.M.C.M., 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biology and Medicine, 31:869-881.

Liang, Y.J., Lipscom, W.N., 1991. Substrate and inhibitor binding to human carbonic anhydrase II: a theoretical study. Inhibitors in the carbonic anhydrase. Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. VCH Publishers, Weinheim, 50-64.

Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacology and Therapeutics, 74, 1-20.

Lindskog, S., Henderson, L. E., 1971. Carbonic anhydrase. The Enzymes, 5.3nd. New York, Academic Press, 587.

Lindskog, S., Engberg, P., Forsman, C., İbrahim, S.A., Jonsson, B.H., Simonsson, I.,Tibell, I., 1984. Kinetics and mechanism of carbonic-anhydrase isoenzymes. Annals of The New York Academy of Sciences, 429, 61-75.

Liochev, S.I., Fridovich, I., 1995. Superoxide from glucose oxidase or from nitroblue tetrazolium. Archive of Biochemistry and Biophysics, 318, 408-410.

Loeckie, L., De Zwart, John, H., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in expremental animals and in human. Free Radical Biology and Medicine 26, 202-226.

Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., Horn, T.F., 2003. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers; effect on nitro sative and oxidative stres derived from migroglial cells. Nitric Oxide, 9, 46-76.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture. 86, 2046-2056.

MacDougall, D.B., 2002. Colour in food improving quality. Woodhead Publishing Limited, 179-221. Cambridge, England.

Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 613, 1-19.

Magalhães, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2009. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. Talanta, 77, 1559-1566.

Magid, E., 1968. The dehydration kinetics of human erythrocyte carbonic anhydrase B and C. Biochimica et Biophysica Acta, 151-239.

Majeau, N., Coleman, J.R., 1994. Correlation of carbonic anhydrase and ribulose 1.5 bishphosphate carboxilase/oxygenase expression in pea. Plant Physiology, 104, 1393-1399.

Malo, C., Wilson, J.X., 2000. Glucose modulates vitamin c transport in adult human small intestinal rush border membrane vesicles. Journal of Nutrition, 130, 63-69.

Mansbach, R.S., Rovetti, C.C., Winston, E.N. and Lowe, J.A., 1996. III, Psychopharmacology, 124, 315-22.

Maren, T.H. 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and 1+5 inhibitors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 160, 26.

Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. phsiological. Reviews, 47, 595-781.

Maren, T.H., Conto, E.D., 1979. The nature of anion inhibition of human red cell carbonic anhydrase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 196-501.

Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 280, 98-104.

Massie, B. M., Szlachcic, Y., Tabau, J. F., 1993. Scintigraphic and electrocardiographic evedence of slient coronary artery disease in asymptomatic hypertension: a case control study. Journal of The American College of Cardiology, 22, 1598-1606.

Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poljak-Blazi, M., Borovic, S., Ivancic- Bace, I., Smrecki, V., Zarkovic, N., Brcic-Kostic, K., Vikiç-Topic, D., Müller, N., 2008. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. Journal of Agricultural Food Chemistry, 56, 3989-3996.

Mavi, A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 52-53.

MEGEP, 2006. Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, Ankara.

Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. Journal of Agricaltural and Food Chemistry, 43, 1813-1819.

Melis, M.R., Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., 2009. Oxytocin injected into the ventral subiculum or posteromedial cortical nucleus of the amygdala induces penile erection and increses extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens of male rats. European Journal of Neuroscience. 30, 1349-57.

Miguel, M.G., 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour and Fragrance Journal, 25, 291–312.

Miller, D.D., 1996. Mineral food chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, 618-649.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science, 84, 407-412.

Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Letters, 384, 240-242.

Min, D.B., 1998. Lipit oxidation of edible oil. In Food lipits chemistry, nutrition, and biotechnology, Akoh, C.C., Min, D.B., (Eds), Marcel Dekker, New York, 283-296.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual source. Food Chemistry, 72, 145-171.

Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chemistry, 75, 237-240.

Nair, S.K., Ludwig, P.A., Christianson, D.W., 1994. Phenol as a carbonic anhydrase inhibitor. Journal of American Chemical Society, 116, 3659-3660.

Namiki, M., 1990, Antioxidants/antimutagens in food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 29, 273-3.

Nar, M., 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I VE hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

Neff, W.E., Frankel, E.N., Weisleder, D., 1981. High-pressure liquid chromatography of autoxidised lipids: II. Hydroperoxy-cyclic peroxides and other secondary products from methyl linolenate. Lipids 16, 439-448.

Nishimoiri, I., 2004. Acatalytic CAs, carbonic anhydrase relatedproteins, in carbonic anhydrase, its inhibitors and activators (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL.

Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., 2005. Non-reductive scavenging of 1,1,-diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analaysis of peroxyradical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 53, 714-716.

Nisihina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., 1991. Antioxidizing component, muisin, in rumex japonicus, houtt. Journal of American Oil Chemists Society, 68, 735-739.

Nizamlıoğlu, N.M., Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5, 20-35.

Nohl, H., Gille, L., Kozlov, A., Staniek, K., 2003. Are mitochondria a spontaneous and permanent source of reactive oxygen species? Redox Report, 8, 135-141.

Oksay, T., 2006. Rat hiperhomosisteinemi modelinde kavernozal disfonksiyonun antioksidan sistem ve nitrik oksit sentaz izoenzimleri ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı.

Onat, T., Emerk, K., 1996. Temel biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık San. Ve Tic. Ltd. Şti, 269-283, İzmir.

Orağlı, K.M., 2001. Klinik oftalmolji. 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., 2002a. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2772-2777.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002b. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3122-3128.

Ou, B., Prior, R.L., Huang, D., 2005. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.

Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrinition, 44, 307-315.

Özçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. Journal of Food Sciences, 68, 487-490.

Özdemir, H., 1992. Bazı aktif katyonların değişik orjinli karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Öztürk Sarıkaya, S.B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, I., Supuran, C.T., 2011. In vitro inhibiton of α-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 5, 4259-62.

Pacific, R.E., Davis, K.J.A., 1991. Protein, lipit and DNA repair system in oxydative stress: the free radical theoryof aging revisited. Gerontology, 37, 166-180.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6882-6890.

Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T.C., 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art. Therapeutic Applications and Future Prospects, 3, 199-229.

Patterson, B.D., Atkins, C.A., Graham, D., Wills, R.B.H., 1971. Carbonic anhydrase. Analytical Biocemistry, 44, 388-391.

Payzın, S., 2000. Hipertansiyon ve damarlar. Türk Klinik Kardiyoloji, 13, 349-51.

Pehluvan, M., Güleryüz, M., 2004. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. Bahçe, 33, 51-57.

Pekkarinan, S.S., Heinonen, I.M., Hopia, A.I., 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. Journal of the Science and Food Agriculture, 79, 499-506.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del R., O.D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. Journal of Nutrition, 133, 2812-2819.

Pe´rez-Jime´nez, J., Saura-Calixto, F., 2005. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:5036-5040.

Peterson, R.E., Tu, C., Linser, P.J., 1997. Isolation and characterization of a carbonic anhydrase homologue from the zebrafish *(Danio rerio*). Journal of Molecular Evolution, 44, 432-439.

Picada, J.N., Roesler, R., Henriques, J.A.P., 2005. Genotoxic, neurotoxic and neuroprotective activities of apomorphine and its oxidized derivative 8-oxo-apomorphine. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38, 477-486.

Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 1035-1042.

Popova, L.P., Lazova. G.N., 1993. Effect of abscicis acid and jasmonik acid on carbonic anhydrase activity of ethiolated pea seedlings with cycloheximinde and ahloramphenical. Comtes Rendus de I'Academie Bulgare Des Sciences, 46, 101-104.

Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N., 2002. Organic acids and phenolic compunds in pomegranates (*Punica Granatum* L.*)* grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 15, 567-575.

Prior, R.L., Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biology and Medicine, 27, 1173-1181.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4290-4302.

Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S. Van de Put, F., Dacombe, C. and Rice-Evans, C. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radicals Research, 36, 217-233.

Pzedborski, S., Levivier, M., Raftopoulos, C., Naini, A.B. and Hildebrand, J., 1995. Peripheral and central pharmacokinetics of apomorphine and its effect on dopamine metabolism in humans. Movement Disorders, 10, 28-36.

Quick, K.L., Hardt, J.I., Dugan, L.L., 2000. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. Journal of Neuroscience Methods, 97, 138-144.

Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxideinduced apoptosis. The FASEB Journal, 13, 513-522.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237.

Ren, S., Lien, E.J., 1997. Natural products and their derivatives as cancer chemopreventive agents. Progress in Drug Research, 48, 147-71.

Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of $CO_2$ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. Biochimica et Biophysica Acta, 1120, 81-86.

Rene, D.T., Yolanda, V., and Zeno, A., 2001. Comparision of the antioxidants content of fruits, vegetables, and tea measured as vitamin C equivalents. Toxicology, 166, 63-69.

Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors, topical sulfonamide antiglaucoma agents ıncorporating secondary amine moieties. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 10, 673-676.

Rice-Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. Free Radical Research, 22, 375-383.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20, 933-56.

Richard, A.L., 1992. Naturally occuring antioxidants, Boca Raton, Lewis Publishes.

Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gıbbons, B.H., Edsall, J.T., 1964. Carbonic anhydrase, from human erythrocytes. The Journal of Biological Chemistry, 239, 1065-1078.

Rimbach, G., Pallauf, J., 1998. Phytic acid inhibits free radical formation in vitro but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats. Journal of Nutrition, 128, 1950-1955.

Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92, 235-254.

Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946. The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. Biochemical Journal, 40, 319.

Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klauning, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. Carcinogenesis, 10, 1003-1008.

Saija, A., 1995. Flavonoids as antioxidant agents. Free Radical Biology and Medicine, 19, 481-486.

Saija, A., Tomaino A., Trombetta, D., 1998. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. International Journal of Pharmaceutics, 175, 85-94.

Saldamlı, İ., 2007. Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, Ankara.

Sanchez-Mareno, C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Science and Technology International, 8, 121-137.

Sarıkaya Öztürk S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.

Sartor, V., Henderson, P.T., Schuster, G.B., 1999. Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. Journal of the American Chemical Society, 121:11027-11033.

Schleisier, K., Harwat, M., Bohm,V., Bitsch, R., 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Radical Research, 36, 177-187.

Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., Mcphail, D., Skibsted, L.H., Tijburg, L., 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. European Food Research and Technology, 212, 319-328.

Segel, I.H., 1968. Biochemical calculations. John Wiley and Sons Inc,. 403, New York.

Senn, T.L., Kingman, A.R., 1973. A review of humus and humic acids, South Carolina Agricultural Experiment Station, Clemson, S.C., Research Series Report No. 145.

Serafoni, M., Del Rio, D., 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? Redox Report, 9, 145-152.

Shahidi F., Janitha P.K., Wanasundara P.D., 1992. Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32, 67-103.

Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food phenolics sources chemistry effects applications. Technomic Publication, 235-277, USA.

Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food phenolics. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, 199-225, USA.

Sherwin, E.R., 1990. In: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S., (eds) Food additives, Marvel Dekker Incorporated, 139-193, New York.

Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., 2001. Intoducing Natural Antioxidants. Antioxidants in food. Edit: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., CRC Press, ISBN 1 85573 463, USA.

Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defence. European Journal of Biochemistry, 215, 213-219.

Simic, M.G., Jovanovic, S.V., 1994. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: Ho, C.T., Osawa, T., Huang, M.T., Rosen, R.T. (eds) Food phytochemicals for cancer prevention. Journal of American Chemical Society, 547, 20-32, Washington, DC.

Skaper, S.D., Bruani, A., Dal Toso, R., Petrell, I.L., Romanello, L., Facci, L. and Leon, A., 1996. Proceedings of National Academy of Science, USA., 93, 3984-3989.

Skold, K., Twetman, S., Hallgren, A., Yucel Lindberg, T., Modeer, T., 1998, Effect of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostoglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. European Journal of Oral Sciences, 106, 571-575.

Sly, S.W., Hu, Y.P., 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies, Annual Reviews, 64, 375-401.

Smith, E.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A., 1985. Princibles of biochemistry general aspects. seventh edition. McGraw-Hill Book Company, Hamburg, 179-240.

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., 2007. Antioxidant measurements. Physiological Measurements. 28, 41-55.

Söyler, M., 2006. Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (E.C.4.2.1.1.) saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Van.

Söyüt H., 2006. Gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Spencer, K.G., Kimpel, D.L., Fisher, M.L., Togasaki, K., Miyachi, S., 1983. Carbonic anhydrase in chlamydomonas reinharatii II. Plant and Cell Physiology, 24, 301-304.

Stadtman, E.R., 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. Free Radical Biology and Medicine, 33, 597-604.

Stom, D.I., and Beym, A.M., 1976. The action of phenols on various algal species. Hydrobiology Journal,12, 43-46.

Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. In carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators (Supuran, C.T. *et al.*, eds), CRC Press. 1-23.

Supuran, C.T., Manole, G., Andruh, M., 1993. Carbonic anhydrase inhibitors part II. coordination compounds of heterocyclic sulfonamides with lanthanides are potent inhibitors of isozymes I and II. Journal of Inorganic Biochemistry, 49, 97-103.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M. and Banciu, M.D., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-thiophene- and pyrrole-carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering porperties as aqueous suspensions. Biororganic and Medicinal Chemistry, 8, 2145-2155.

Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.

Sültemeyer, D., Schmidt, C., Fock., H.P., 1993. Carbonic anhydrases in higher plants and aquatic microorganisms. Physiologia Plantarum., 88, 79-180.

Şentürk, M., Gülçin, İ, Daştan A., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 3207-3211.

Tan, K.H., 1994. Environmental Soil Science, 159-177, Dekker, New York.

Tan, K.H., Bringer, A., 1986. Effect of Humic Acid on aliminum toxicity in corn plants. Soil Science, 1,141.

Temür, N., 2005. Çam, kavak, söğüt, armut ağaçlarında toplanan ökse otu (*Viscum album*), iğde (*Elaeagnus angustifolia*) bitkisi çiçeğinin ve kedi nanesi (*Nepeta cataria*) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Tokat.

Topkafa, M., 2006. İmmobilize hümik asitlerin katı faz ekstraksiyon sistemlerinde kullanımı. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Konya.

Tripoli, E., Giammamco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammamco, S., La Guardia, M., 2005. The phenolic compunds of olive oil: Structure, biological activity and benefical effect on human health. Nutrition Research Reviews, 18, 98-112.

Tümer Ö.L., 2006. Bazı nar çeşitlerinin olgunlaşma aşamalarında fenolik bileşik miktarlarındaki değişimler, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.

Ubeda, A., Montesinos, C., Payá, M. And Alcaraz, M.J., 1993. Iron reducing and free radical scavenging properties of apomorphine and some related benzylisoquinolines. Free Radical Biology and Medicine, 15, 159-167.

Vaklinova, S.G., Goushtina, L.M., Lazova, G.N., 1982. Carbonic anhydrase activity in chloroplasts an chloroplast fragments. Comtes Rendus de I'Acedemic Bulgare des Sciences, 37, 677-680.

Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Bast, A., 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chemistry, 66, 511-517.

Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Van den Vijgh, W., Bast, A., 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. Food Chemistry, 70, 391-395.

Velioğlu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4113-4117.

Verpoorte, J.A., Mehta S., Edsall J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.

Vonkruedener, S., Schempp, H., Elstner, E.F., 1995. Gas chromatographic differentiation between myeloperoxidase activity and fenton-type oxidants. Free Radical Biology and Medicine, 19, 141-146.

Wang, G., Xu, J.J, Ye, L.H., Zhu, J.J., Chen, H.Y., 2002. Highyl sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan. Bioelectrochemistry, 57, 33-38.

Weber, G., Shen, F., Prajda, N., Yang, H., Li, W., Yeh, A., 1997. Regulation of the signal transduction program by drugs. Advances in Enzyme Regulation, 37, 35-55.

Wen, L., Wrolstad, R.E., Hsu, V.L., 1999. Characterization of sinapyl derivatives in pineapple (*Ananas comosus*) and sage (*Salvia offcinalis*) by enzyme-assisted ensiling (ENLAC). Journal of Agricaltural and Food Chemistry, 47, 2959-2962.

Wichi, H.P., 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. Food and Chemical Toxicology, 26, 717-723.

Wickens, A.P., 2001. Aging and the free radical theory. Respiratory Physiology, 128, 379-391.

Wilbur, K.M., Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. The Journal of Biological Chemistry, 176, 147-54.

Wood, R.J., Ronnenberg, A.G., 2006. In: Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J., (eds) Modern nutrition in health and disease, 10th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 248.

Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A., 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society, 123:1173-1183.

Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S.E., Beecher, G., Prior, R.L., 2004. Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$): a preliminary study of 28 foods. Journal of Food Composition and Analysis, 17, 407-422.

Yalçın, H., Yıldız, H., Nergiz, C., 1997. Baharatların Kimyasal bileşimi ve gıda sanayiinde kullanımı. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi Seri B Gıda Mühendisliği 15, 219-228.

Yang, J.B., Zhu, C.H., Deng and Duan, G.L., 2006. Development of a sensitive and rapid liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of apomorphine in canine plasma. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20, 1883-1888.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H., Raneva, V.G., 1999, Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chemistry, 64, 59-66.

Yenson, M., 1982. Kanda Hemoglobin ve eritrositler. Klinik biyokimya laboratuar çalışmaları. Sanal Matbaacılık, 5, 342.

Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumara, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita Y., Okuda, T., 1989. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 37, 1919-1921.

Youdim, M.B., Gassen, M., Gross, A., Mandel, S. and Grunblatt, E., 2000. Iron chelating, antioxidant and cytoprotective properties of dopamine receptor agonist; apomorphine. Journal Neural Transmission Supplies, 83-96.

Yu, B.P., Yang, R., 1996. Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. Annals of New York Academy of Sciences, 786, 1-11.

Yu, L., Halley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M., 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1619-1624.

Yucel-Lindberg, T., Twetman, S., Skold-Larrson, K., Mooder, T., 1999, Effect of an antibacterial dental varnish on the levels of prostanoids, leukotriene B4 and interleukin- 1 Beta in gingival crevicular fluid. Acta Odontologica Scandinavica, 57, 23-27.

Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve enzim kinetikleri. Temel Biyokimya, Kemal Matbaası, 1, 148-167.

Zambramski, J.M., Spetzler, R.F., Selman, R.S., Roessmann, U.R., Hershey, L.A., Chumrine, R.C. and Macko, R., 1984. Naloxone theraphy during focal cerebral ischemia. Evoluation in a primate model. Stroke, 15, 621-629.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents on mulberry and their scavenging effects on superoxide radical. Food Chemistry, 64, 555-559.

# ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi Bölümü'nden 2007 yılında yüksek lisans derecesi ile mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında doktora çalışmalarına başladı. 2012 yılı aralık ayında doktora çalışmalarını tamamladı.