

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

Müşerref Hilal İHİTOĞLU

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. İhmi GÜLÇİN
2012

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZİ FENOLİK DOĞAL BİLEŞİMLERİN ANTİOKSİDAN
KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ ve İNSAN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE
İNHİBİTORYON ETKİLERİNİN İZLENİMESİ

Müjdat Hilal İZİTOĞLU

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 ..12../12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYOĞLU

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 İZOEENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

M. Hilal JEHİTOĞLU

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-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS^{•+}) giderme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH[•]) giderme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD^{•+}) giderme aktivitesi, süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}) giderme aktivitesi, potasyum ferriksiyanit indirgeme metodu ile indirgeme kuvveti, Kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi ve ferröz iyonları (Fe²⁺) çelatlama 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 saflığı belirlemek için, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Bundan sonra I50 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 aralığında Ki değerlerine sahip oldukları gözlemlendi. Humik asit hCA-I için yarı çama inhibisyon gösterirken, hCA-II için yarı çamasız inhibisyon gösterdi. Diğer fenolik bileşikler apomorfin ve timol (hCA-I, II için) 4-nitrofenil asetat substratı ile yarı çamasız inhibisyon gösterdiler. Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşikler klinik olarak kullanılan süfanilamid 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

ÖZ

Doktora Tez

BAZI FENOLİK DOĞAL BAZILARIN ANTIÖKSİDAN KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ
BİLEŞİKLER VE İNSAN ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA-I ve hCA-II)

M. Hilal JEHGTOĞLU

Atatürk University
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Bölümü

Danışman: Prof. Dr. İlham verici GÜL

Bu çalışmada apomorf, timol ve hümik asit gibi bazı fenolik doğal bileşiklerin olası antioksidan ve radikal yakalama aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca bu fenolik bileşiklerin insan eritrosit izoenzimleri I ve II (hCA-I ve hCA-II) üzerindeki inhibitör etkileri belirlendi.

Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için ferrik tiyosiyanat yöntemiyle toplam antioksidan aktivite, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS•+) süpürücü aktivite gibi farklı in vitro yöntemler, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH•) süpürme aktivitesi, N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikali (DMPD•+) süpürme aktivitesi, süperoksit anyon radikali (O₂⁻) süpürme aktivitesi, aziridin (AZ) süpürme kapasitesi Cuprac yöntemi ile, FRAP yöntemi ile indirgeme kapasitesi ve demir iyonları (Fe²⁺) şelatlama faaliyetleri ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, referans antioksidan bileşikler olarak BHA, BHT, a-tokoferol ve suda çözünür bir a-Tokoferol analogu olan troloks kullanıldı. Kullanılan tüm yöntemlerde fenolik bileşikler güçlü antioksidan ve radikal süpürücü etki göstermiştir.

Ayrıca bu çalışmanın ikinci bölümünde, bu fenolik bileşiklerin insan kanından alınan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerindeki in vitro inhibisyon etkileri araştırıldı. İlk olarak, hCA-I ve hCA-II, her bir izoenzim için sırasıyla 59.4, %65.9, 194.5 ve 832.4 kat saflaştırma verimiyle Sepharose-4B-L-tirozin afinite kromatografi kolonu ile saflaştırıldı. Enzim saflığının tespiti için SDS-PAGE yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Bu fenolik bileşiklerin I50 değerlerinin tespiti için hidrataz testi kullanılarak incelenmiştir. hCA-I ve hCA-II'nin bir dizi fenolik bileşik ile inhibisyonu, substrat olarak 4-nitrofenil asetat ile esteraz testi kullanılarak incelenmiştir. Bu fenolik bileşikler, hCA I için 20.5-457.0 µM ve hCA-II'ye karşı 61.0-584.0 µM aralığında Ki değerleri göstermiştir. Humik asit, hCA-I için kompetitif inhibitör etki sergilerken, hCA II için kompetitif olmayan inhibitör etki sergilemiştir. Apomorf ve timol, hCA I ve hCA II için substrat olarak 4-nitrofenilasetat ile rekabetçi olmayan inhibitörler olarak bulundu. Bu fenolik bileşikler, klinik olarak kullanılan sülfonamid ve asetazolamid ile aynı aralıkta etkili hCA-I ve hCA II inhibisyonu göstermiştir ve antioksidan özellikleri nedeniyle hCA I ve hCA II izoenzimleri için daha güvenli kullanılabılırler.

2012, 171 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Karbonik anhidraz, fenolik doğal bileşik, hCA-I, hCA-II, enzim inhibisyonu

HATIRLAMAK

Doktora tezi olarak sunduğum bu alı Őmanı n deneysel kı smı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Arağtı rma Laboratuarı "nda gerekleğtirilmiğtir.

Çalı Şmaları mda her zaman bana her türlü yardı m ve desteği sağlayan, manevi olarak bana güç veren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandı ğı m değerli hocam Sayı n Prof. Dr. Ğlhami GÜLĞN"e,

Çalı Şmaları mı n bütün safhaları nda bölümün bütün imkanları nı benden esirgemeyen Anabilim Dalı Bağkanı mı z Sayı n Prof. Dr. Ğrfan KÜFREVĖOĐLU"na, Kimya Bölüm Bağkanı Sayı n Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayı n Prof. Dr. Hasan ÖZDEMĖR"e, Sayı n Prof. Dr. Mehmet ĞFTĞ"ye ve Sayı n Prof. Dr. ğükrü BEYDEMĖR"e,

Çalı Şmaları m esnası nda yardı mları nı esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Biyokimya Arağtı rma Laboratuarı alı Őanı arkadağları m Fevzi TOPAL, Meryem NAR, Uzm. Hülya GÖÇER, Pı nar ANNAKAYA, Hatice HAN ve Biyokimya Arağtı rma Laboratuarı nda alı Çan diğer bütün arkadağları ma ve Kimya Bölümünün tüm elemanları na teğekkürü bir borç bilirim. Doktora sürecimde maddi destek sağlayan TUBĖTAK / BĖDEB"e ve her daim bizlerle ilgilenen değerli alı Őanları na ayrı ca teğekkür ederim.

Ayrı ca zor günlerimde beni yalnız bı rakmayan kardeğlerim ğeyma ve ğeyda'ya ve bugüne kadar benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana hem annelik hem babalık yapan, hayat tecrübelerinden yararlandı ğı m canı m annem Fatma ğEHĖTOĐLU'na gösterdikleri destek, sabı r ve anlayı Őları ndan dolayı teğekkürlerimi sunarı m.

M.Hilal JEHĖOĐLU

Aralık, 2012

GÇGNDEKGLER

ÖZET.....	i
ÖZ.....	ii
KONTROL LİSTESİ.....	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. Hüyük 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. Malzeme.....	49
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	49

3.1.2. Yaralanı lan alet ve cihazlar.....	49
3.1.3. Kullanı lan çözeltiler ve hazı rlanması	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 Çelatlama metodu ile ilgili çözeltiler	51
3.1.3.e. Metal Çelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	52
3.1.3.f. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler.....	52
3.1.3.g. ABTS ^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	52
3.1.3.h. DMPD ^{•+} 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 saflağtı rı lması ve aktivite ölçümlerinde kullanı lan çözeltiler	55
3.1.3.l. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanı lan çözeltiler	56
3.2. Antioksidan çalı Ėmaları	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 Çelatlama aktivitesi.....	59
3.2.5. Ferröz Ėyonları (Fe ²⁺) Çelatlama aktivitesi.....	59
3.2.6. Süperoksit anyon radikali (O ₂ ⁻) giderme aktivitesi.....	59
3.2.7. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri 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'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi.....	61
3.2.10. Total antioksidan aktivitesi	61
3.4. Enzim Saflağtı rma Çalı Ėmaları	62
3.4.1. CA enzim hemolizati nı n hazı rlanması	62
3.4.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflağtı rı lması yla ilgili çalı Ėmalar	62
3.4.2.a. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jelinin hazı rlanması	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 Km ve Vmax değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	69
3.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektforezi ile Enzim Saflığı nı n 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⁺) kuproz 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 Çelatlama aktivitesi bulguları	76
4.1.5. Ferröz iyonları (Fe ²⁺) Çelatlama 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 Saflaştırılması Basamakları Sonuçları	93

4.2.4. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları	94
4.2.5. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile ilgili yapı lan kinetik çalı Ğmaları n sonuçları	95
4.2.5.a. Enzim için Km ve Vmax değerlerinin bulunması ile ilgili çalı Ğmaları n sonuçları	95
4.2.6. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine doğal fenolik bileğiklerin etkilerinin belirlenmesiyle ilgili yapı lan çalı Ğma sonuçları	97
4.2.6.a. hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileğiklerle ilgili sonuçları	97
4.2.6.b. hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileğiklerle ilgili sonuçları	98
4.2.6.c. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileğiklerin [I]50 değeri sonuçları	99
4.2.6.d. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileğiklerle ilgili sonuçları	100
4.2.6.e. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileğiklerle ilgili sonuçları	104
5. TARTIĞMA ve SONUÇ.....	109
KAYNAKLAR	152
ÖZGEÇMİĞİ	172

SÖZGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikali
VARDİ	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
O	Karbonik anhidraz enzimi
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür
DMPD ^{•+}	N,N-Dimetil-fenilendiamin dihidroklorür radikali
DPPH	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikalleri
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
VARDIR	Hidrojen atom transfer
<small>ben50</small>	Maksimum hızı yarı yavaşlayan inhibitör konsantrasyonu
İle	Enzim inhibitör kompleksinin ayrılma sabiti
km	Maksimum hızın yarı hızına neden olan substrat derişimi
TUVALET [•]	Lipit peroksit radikali
LOOH	hidroperoksit deriş
NBT	Nitroblue tetrazolyum
ROS	Reaktif oksijen türleri
S	substrat
GBF	Sodyum dodesil sülfat
<small>AYARLAMAK</small>	Tek elektron transfer
<small>İÇİNDE</small>	Enzimatik reaksiyon hızı
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TCA	Triklorasetik asit
Tris	trihidroksimetil amino metan
Trolloc	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit

ÇİLLER DGZGNĞ

ğekil 1.1. Afinite kromatografisinin prensibi	4
ğekil 1.2. CO ₂ 'in farklı açı lara sahip piramidal yapı da H ₂ CO ₃ - ' e kendiliğinden dönüşümü	10
ğekil 1.3. Karbonik anhidrazı n katalizlediği CO ₂ -hidrataz mekanizması	10
ğekil 1.4. Radikal olmayan reaktif oksijen molekülü.....	13
ğekil 1.5. Reaktif oksijen türleri oluşumu	13
ğekil 1.6. Glutasyon peroksidaz-glutasyon redüktaz enzim sistemi.....	19
ğekil 1.7. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	20
ğekil 1.8. Tokoferol ve tokotrienollerin sı nı flandı rı lması	27
ğekil 1.9. Katekolün peroksil radikalleriyle reaksiyon mekanizması (HAT ve SET esası na göre).....	31
ğekil 1.10. Flavonoitlerin genel yapı sı	34
ğekil 1.11. Fenoliklerin biyosentezi.....	35
ğekil 1.12. Fenol radikalinin rezonans yapı ları	36
ğekil 1.13. Hümik asidin açı k yapı sı	38
ğekil 1.14. 5-Metil-2-izopropilfenol (timol)'ün açı k yapı sı	39
ğekil 1.15. Apomorfinin açı k yapı sı	40
ğekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazı rlanması ndaki reaksiyonları n basamakları	64
ğekil 3.2. p-Nitrofenilasetatı n p-nitrofenole dönüşüm mekanizması	67
ğekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) doğal fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonları nı (Fe ³⁺) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	72
ğekil 4.2. Fenoliklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) kuprik iyonları nı (Cu ²⁺) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	74
ğekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonları nı (Fe ³⁺) indirgeme kuvvetlerinin (FRAP) birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	75

Şekil 4.4. Fenolik doğal bileşiklerin (30 µ g/ml) bipiridil reaktifi ile metal Çelatlama aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	77
Şekil 4.5. Fenolik doğal bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µ g/ml) metal iyonları nı Çelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	78
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşik çözeltilerinin (10-30 g/ml) süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	79
Şekil 4.7. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazı rlanan standart DPPH grafiği	81
Şekil 4.8. Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) DPPH radikali giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	82
Şekil 4.9. ABTS" nin açı k kimyasal yapı sı	83
4.10. ABTS•+ giderme aktivitesi tayininde kullanı lan ABTS•+ için hazı rlanan standart grafik.....	84
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin (10-30 g/ml) ABTS•+ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, - α tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	85
Şekil 4.12. DMPD•+ giderme aktivitesi tayini için hazı rlanan standart grafik.....	87
4.13. Fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 g/ml) DMPD•+ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	87
Şekil 4.14. Apomorfinin (10-30 µ g/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	89
Şekil 4.15. Timolün (10- 30 µ g/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan -tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	90

Şekil 4.16. Hüyük asitin (10-30 µg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması	90
Şekil 4.17. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sırasıyla 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 ₂ HPO ₄ pH:6,3 ve 0,1 M NaCH ₃ COO/0,5 M NaClO ₄ pH:5,6 tamponlarıyla elüsyonu sonucu yapılan aktivite-absorbans grafiği (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-poliakrilamid 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 çalıştırılan 5 farklı hüyük asit konsantrasyonunda I50 değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Hüyük asit] grafiği	98
Şekil 4.23. hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalıştırılan 5 farklı hüyük asit konsantrasyonunda I50 değerinin bulunması için çizilen Aktivite(%)-[Hüyük 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 çalıştırılan 5 farklı hüyük asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hüyük asit] grafiği	101
Şekil 4.26. hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hüyük asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	101
Şekil 4.27. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalıştırılan 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

ğekil 4.29. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalı Ğı lan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği.....	103
ğekil 4.30. hCA-I izoenzimi kullanı larak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	103
ğekil 4.31. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalı Ğı lan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği..	105
ğekil 4.32. hCA-II izoenzimi kullanı larak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	105
ğekil 4.33. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalı Ğı lan 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorfin] grafiği..	106
ğekil 4.34. hCA-II izoenzimi kullanı larak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	106
ğekil 4.35. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalı Ğı lan 5 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Timol] grafiği.....	107
ğekil 4.36. hCA-II izoenzimi kullanı larak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı timol konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği	107
ğekil 5.1. FRAP metoduna göre $[Fe^{3+} - (TPTZ)_2]^{3+} - [Fe^{2+} - (TPTZ)_2]^{2+}$ indirgenme sistem	112
ğekil 5.2. Bir antioksidan molekülü ile KUPRAK reaksiyonu.....	115
ğekil 5.3. L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) arasındaki öne sürülen metal Çelatlama mekanizması	118
ğekil 5.4. L-Adrenalinin bir ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak L-Adrenalin- Fe^{2+} kompleksin oluşumu	119
ğekil 5.5. Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak kurkumin - Fe^{2+} kompleksinin oluşumu.....	120
ğekil 5.6. Ğki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Resveratrol- Fe^{2+} kompleksi oluşumu.....	120
ğekil 5.7. Apomorfin ve timolün ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak oluşturduğu karmaşı k.....	121
ğekil 5.8. Bir antioksidan tarafı ndan DPPH radikalinin giderilmesi.....	125
ğekil 5.9. L-Karnitin ile DPPH radikali arasındak öne sürülen radikal giderme mekanizması	125

ğekil 5.10. Konjuge gruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH radikalleri arası nda meydana gelen reaksiyon.....	126
ğekil 5.11. Bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluşumu	128
ğekil 5.12. DPPH radikali ile kurkumin arası nda önerilen reaksiyon mekanizması	128
ğekil 5.13. Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürmesi ve L- adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu	129
ğekil 5.14. Eugenol'ün DPPH radikal giderme mekanizması ve eĞleme tepkimesiyle dehidrodieugenol oluşumu	130
ğekil 5.15. Mono fenoller için muhtemel DPPH• radikali giderme mekanizması	131
ğekil 5.16. K2S2O8 ile ABTS'nin oksidasyonu mekanizması	133
ğekil 5.17. Kararlı bir radikal olan DMPD•+'nin oluşum ve giderilme mekanizması ..	135
ğekil 5.18. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT2+'yi formazana indirger	138
ğekil 5.19. NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT2+'yi formazana indirger.....	140
ğekil 5.20. 9-Hidroperoksi endoperoksit oluşturan α-linoleik asitten 12-hidroperoksit reaksiyonu	144
ğekil 5.21. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn ²⁺ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli	149

ÇİZELGELER DJZGNE

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	9
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik doğal bileşiklerin ferröz iyonları nı n (Fe ²⁺) Çelatlama aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidanlar olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rmaları	78
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler ve standart antioksidanları n süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinde IC50 değerleri	80
Çizelge 4.4. Fenolik bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rması	82
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin ABTS•+ giderme aktivitesinde IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rmaları	85
Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklerin DMPD•+ giderme aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşı laştı rmaları	88
Çizelge 4.7. Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanları n 30 µ g/ml ve 60. saate karşı lı k gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri	91
Çizelge 4.8. Afinite kolonundan insan kanı ndan elde edilen enzim hemolizati nda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştı rı lan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştı rma 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 (I50 değerleri).....	99
Çizelge 4.10. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin Ki değerleri ve inhibisyon türleri.....	104

Çizelge 4.11. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin Ki değerleri ve inhibisyon türleri.....	108
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin 20 µ g/ml konsantrasyonunda ferrik iyonları nı (Fe ³⁺) ve kuprik iyonları nı (Cu ²⁺) indirgeme kapasiteleri	116
Çizelge 5.2. Standartlar ve fenolik doğal bileşiklere ait DPPH•, ABTS+•, DMPD+• ve O ₂ ^{-•} ve metal Çelatlama aktiviteleri ile ilgili IC ₅₀ (µ g/ml) değerleri..	122
Çizelge 5.3. Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanları n 30 µ g/ml ve 60. saate karşılı k gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri	145

1. GGRGG

Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2005). Enzimler canlı hücreler tarafı ndan sentezlenen ve canlı metabolizması ndaki kimyasal reaksiyonları hızlandı ran, 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 dı şı nda bütün enzimler protein yapı sı ndadı r (Lehninger 1993; Gözükara 1997; Keha ve Küfrevioğlu 2004). Proteinlerin en büyük ve en özel kı smı nı teşkil ederler. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayı sı yla ifade edilir. Turnover sayı sı , birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratı n moleköl sayı sı dı r. Katalaz $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile turnover sayı sı en yüksek olan enzim iken CA 106 s^{-1} ile ikinci en yüksek turnover sayı sı na 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 substratları na, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklı dı r. İzoenzimlerin bağlı ca özellikleri arası nda amino asit sayı ve sı rası nı n farklı olması , izoelektrik noktaları nı n farklı olması , her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayı labilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonları nda da yerleşebilirler. İzoenzimlere örnek olarak bu tez kapsamı nda çalı şılacak karbonik anhidraz izoenzimleri verilebilir (Devlin 2002).

Enzimler isimlendirilirken genelde ya substrat adı nı n sonuna "-az" eki getirilir veya ilk bulucuları nı n ortaya attı kları isimle anılı rlar. Örneğin, fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Ancak yaygın olarak kullanılan Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafı ndan sistematik bir sı nı flandı rma ile verilen isimlerdir. Ayrıca her bir enzim için dört rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörölmüştür (Yüreğir 1981).

Substrat denilen küçük moleküllere spesifik olarak bağlanan enzimler onları ürüne dönüştürürler. Kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırmaları ve reaksiyonlara kontrol edilebilen bir hız kazandırmalarıdır. Bu hız genelde 10³ -10⁸ s⁻¹ arasıdadır (Champe and Harvey 1994; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimler katalitik aktiviteleri için kofaktör veya koenzim denilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler enzime geçişli bağlıdır. Ancak bazıları kovalent bağlanırlar ki bu gruplara prostetik grup adı verilir. Örneğin, karbonik anhidraz enziminin yapısındaki Zn²⁺ prostetik gruptur (Smith et al. 1985; Onat vd 1996; Beydemir and Gülçin 2004).

Enzimler protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Makromoleküller olmaları nedeniyle 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°C'dir. Fakat bu sıcaklıkların üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona uğrarlar (Şampiyon ve Harvey 1997).

Enzimli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörler:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. Sıcaklık
5. Gyonik yenilendi
6. Kofaktör konsantrasyonu 7.
8. 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 oluŖan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracı lı k 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).

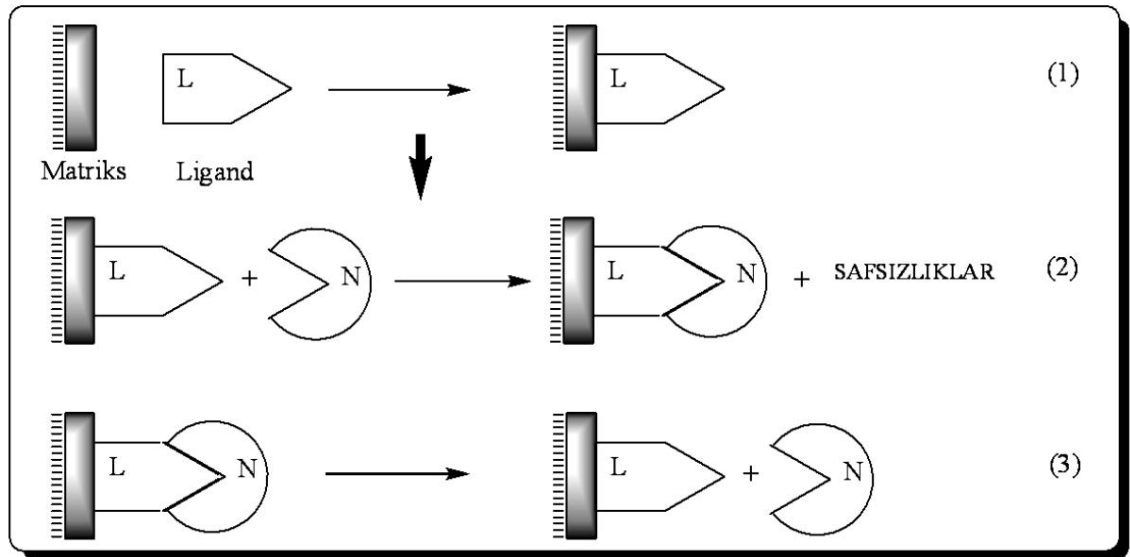
Kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim katalizörlüğünde gerçekteşen reaksiyonların hızları da sıcaklıkla değişmektedir. Tepkime hızının artması, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Ancak belli bir sıcaklığın üzerinde enzimin üç boyutlu yapısı bozulur, enzim inhibe olur ve reaksiyon hızında düşme gözlenir. Bir enzim için 10oC'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q10 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 mekanizmalarını, hem de metabolik yollarını 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 kışmen

saflaştırılması için 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışları üzerinden faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Enzimlerin saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç veren; spesifik ligandlar esasına dayanarak 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 tabii şekillerini ayırmak ve kirletici büyük miktarlardan küçük miktardaki biyolojik materyalleri ayırmak amacıyla kullanılmaktadır.



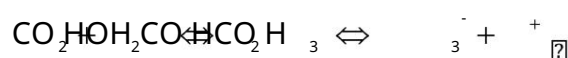
Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin prensibi

Şekil 1.1'de görüldüğü gibi ligand matrikse bağlanırlar (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 hidrolizaz, CA, E.C.4.2.1.1), bütün organizmalarda bulunan Zn²⁺ iyonu içeren bir metaloenzimdir. Ğlk olarak, sı ğı r eritrositlerinde keğfedilen karbonik anhidraz, canlı larda CO₂'in hidrasyonunu ve HCO₃⁻'i n dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2001; Nar 2011).



Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO₂ transportunu sağlamayı n yanı sı ra, birçok dokularda H⁺ ve HCO₃⁻ birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayı labilir. Bunlardan bağka daha sonraki yı llarda enzim, insan eritrositleri, balı k eritrositleri, sı çan eritrositleri, sı çan tükürüğü, sı ğı r kemiği, sı ğı r lökositleri, histokimyasal metotlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılı fı , pankreas, prostat, çeğitli bakteriler ve bitkisel kaynaktan saflağtır ılı mı Ğ ve birçok kaynaktan da karakterize edilmiğtir. Enzimin memelilerdeki moleköl kütlesi 30 kDa civarı nda olduğu tespit edilmiğtir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai et al. 2001; Beydemir et al. 2002; Beydemir and Gülçin 2004; Çoban et al. 2009).

Balı kları n solungaç ve salgı organları nda bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanları n kabuk yapı mında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastları nda bu enzimin değiğik rolleri olduğu ayrı ca ispatlanmı Ėtir.

1.1.1. Karbonik Anhidraz ın dağı lı mı 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 edilmiğtir. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO₂/HCO₃⁻'i n respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO₂ homeostazı nda, 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 membranları nda ve stroma tilakoitlerinde bağlı CA olarak, stroma sıvısında çözünür halde bulunmaktadır. Bitki karbonik anhidraz enzimlerinin fonksiyonlarını 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 ve diğerleri 1971; Vaklinova ve diğerleri 1982; 1984).

Tilakoit membranları nda bağlı CA, elektron taşıması na 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 direkt katılması nın bir ispatı fotosentez inhibitörleri Siklohegzimid'in hem fotosentezi hem de CA'yı inhibe etmesidir. Karboksilasyonu sağlayan enzimler Ribuloz bifosfat karboksilaz ve Fosfoenol piruvat karboksilaz enzimleri ile CA'nın yakından 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 ve ark. 1993; Majeau ve Coleman 1994).

Şimdiye kadar karbonik anhidraz'ın 16 tane farklı izoenzimi bulunmuştur. Bunların beş sitoplazmik enzimler (CA I, II, III, VII ve XIII), mitokondriyal enzimler (CA VA, VB), 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 (Nishimori 2004; Hilvo et al. 2005; Öztürk Sarıkaya et al. 2011).

İnsanda CA izoenzimlerinin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarını dokular 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 saflaştırıldıığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır (Öztürk Sarı kaya et al. 2011). Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları, dokuların damarlarından metabolizma ürünü olan CO₂'i, HCO₃⁻'a, akciğer pulmoner kapillerde ise HCO₃⁻'in CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. hCA-I izoenziminin turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir (Nar 2011).

hCA-I izoenziminin fizyolojik özelliği hCA-II kadar açık değildir. hCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren ve Lindskog 1992; Sly ve Hu 1995; Supuran ve 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°C'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, hCA-II'nin yanı sıra hCA-IV izoenzimleri de bol miktarda bulunmaktadırlar (Supuran 2004). Bu dokuda bulunan hCA-II izoenziminin önemi, glukoma hastalığının tedavisi için yapılan araştırmaların sonucu ortaya çıkarılmıştır (Renzi et al. 2000). hCA-II izoenzimi böbrek korteksinde membrana yapışık haldedir ve Na⁺ ile H₂O'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 ve diğerleri 1997).

İskelet kasısında 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 CO₂'nin difüzyonunu kolaylaştıran bir görev yapmaktadır (Cabiscol ve Levine 1996).

Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 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, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA-IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO₃⁻ iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO₂'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 sırasıyla 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 sağladığı inanılmaktadır. hCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Lakkis et al. 1996).

1.1.2. Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

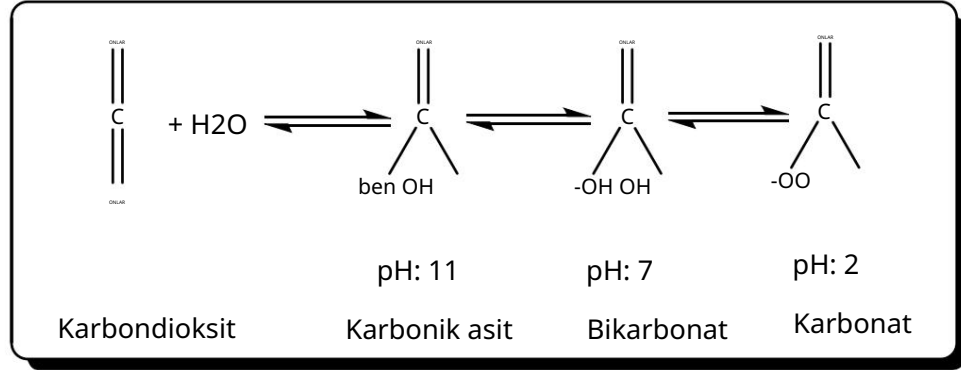
Karbonik anhidraz CO₂ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri ve ayrıca siyanatın karbamata veya ürenin siyanamite, aldehitin geminal diol hidratasyonu reaksiyonları da bu enzim tarafından katalizlenir.

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

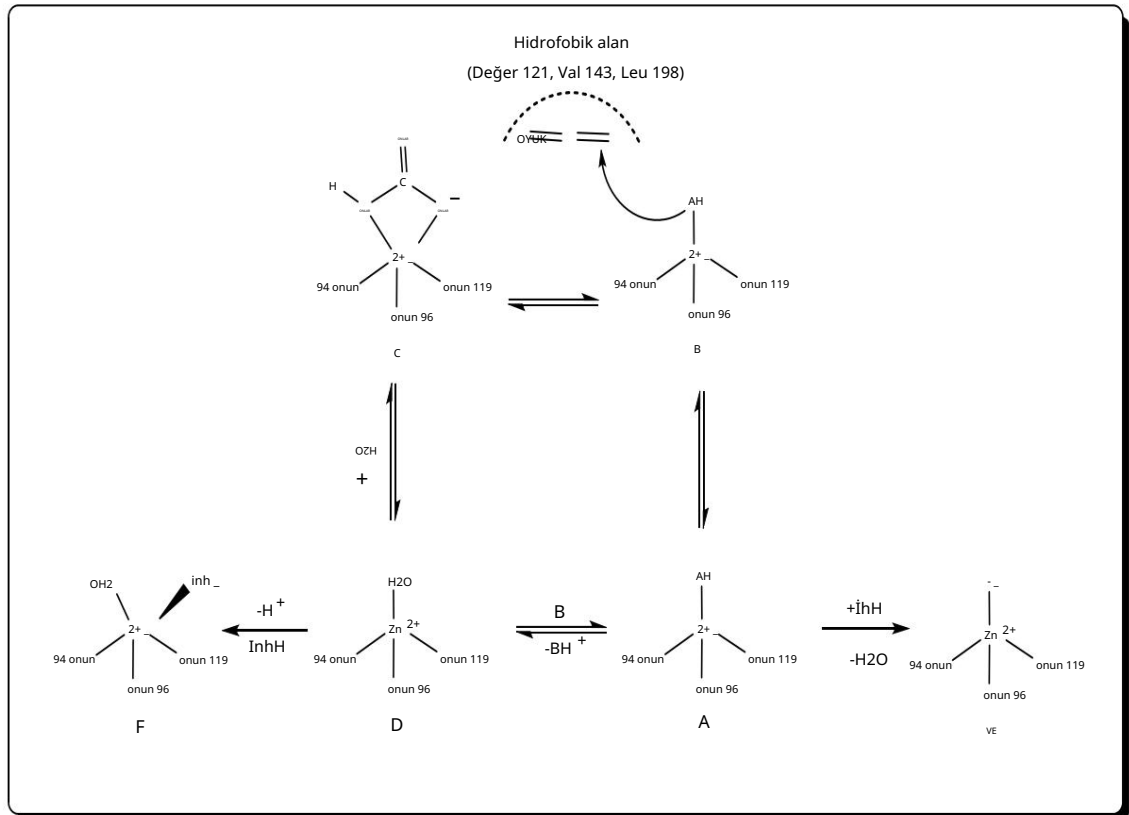
(1) O=C=O + H ₂ O	HCO ₃ ⁻	+ H ⁺
(2) O=C=NH + H ₂ O	H ₂ NCOOH	
(3) HN=C=NH + H ₂ O	H ₂ NCONH ₂	
(4) RCHO + H ₂ O	RCH(OH) ₂	
(5) RCOOAr + H ₂ O	RCOOH + ArOH	
(6) RSO ₃ Ar + H ₂ O	RSO ₃ H + ArOH	
(7) ArOPO ₃ ²⁻ + H ₂ O	HPO ₃ ²⁻ + ArOH	
(8) ArF + H ₂ O	HF + ArOH (Ar: 2,4dinitrofenil)	
(9) PHCH ₂ OCOCI + H ₂ O	PHCH ₂ OH + CO ₂ + HCl	
(10) RSO ₂ Cl + H ₂ O	RSO ₃ H + HCl (R: Me; Ph)	

Karbonik anhidraz CO₂ ve H₂CO₃ veya ortamın pH'ına göre HCO₃⁻ ve CO₃²⁻ iyonları arasında dönüşümlerini katalizlemektedir. Düzlemsel bir molekül olan CO₂'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H₂CO₃'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaşır.



Şekil 1.2. CO₂'in farklı açılara sahip piramidal yapısı da H₂CO₃ - ' 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.

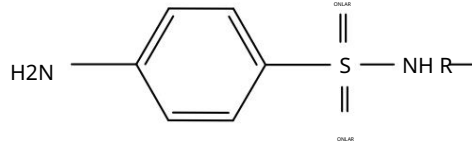


Şekil 1.3. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO₂-hidratasyon mekanizması

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 (sülfonamidler) enzime sıkıca bağlanarak dönüşümlü inhibisyona neden olmaktadır. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılırlar. Bunlardan en çok kullanılanı asetazolamittir. Farmakokinetik özelliklerinden dolayı glokom, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Innocenti et al. 2010).

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



sülfonamid

Alkoller, organik solventler ve amit bileşikleri gibi diğer nötral inhibitörler ise enzime gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon meydana getirirler. Karbonik anhidraz inhibitörleri, sülfonamidlerin 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 oluşturlar (Orağlı 2001).

1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

1.2.1. Serbest radikaller ve etkileri

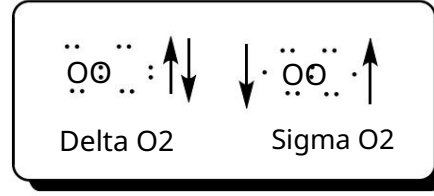
Oksijen hayati fonksiyonları n sürekliliği için oldukça önemlidir. Oksijen tüketimimizin %90'ı ndan daha fazlası elektron transport zinciri, geriye kalanı ndan ise diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur.

Elektron transport zinciri yani elektron taşıma zincirinde moleküler oksijen NADH ve FADH₂'den elektron alarak suya indirgenerek oksitleyici gücü oluşturan ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağı na 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 yapmaktadır (Altınışık 2000).

Serbest radikaller ortaklanmamış elektronlara sahip atom, atom grubu veya moleküller olarak tanımlanmaktadır. Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Mo⁵⁺ gibi geçiş metalleri ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal değildirler 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 elektronları ndan 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 Çekli vardır (Altınışık 2000).

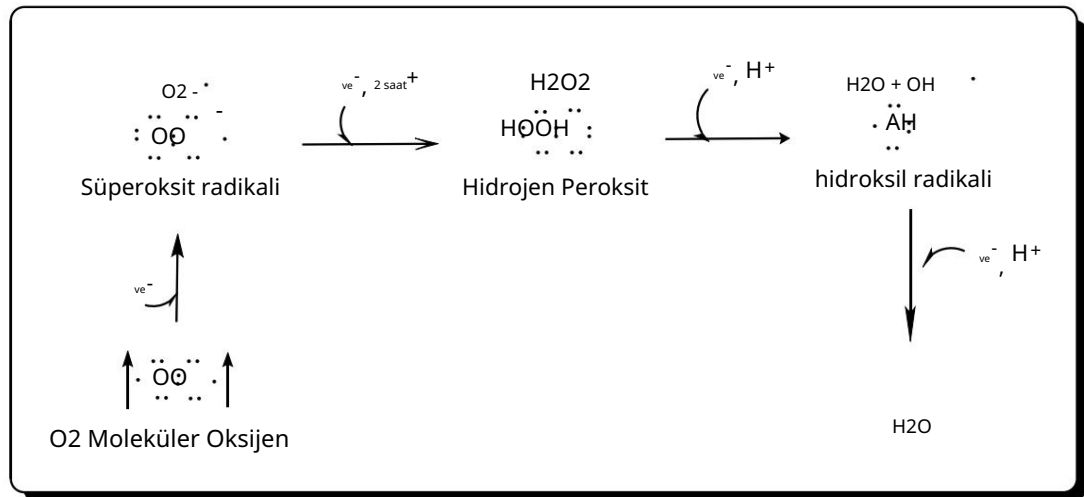


Şekil 1.4. Radikal olmayan reaktif oksijen molekülü

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 anaeroplara yanı sıra aeroplarda da zarar görmektedirler. %40'lık oksijen konsantrasyonunda protein agregatları birikimi, proteaz aktivitesi artışı ve yağlanmada hızlanma görülmüştür (Davies 2000).

1.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH[•])'dir. Ayrıca peroksi (ROO[•]), alkoksi (RO[•]), hidroperoksi (HOO[•]), hipokloröz asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr), ozon (O₃), singlet oksijen (1Δg 1O₂) de radikal ve nonradikal olan reaktif oksijen türlerindedir.

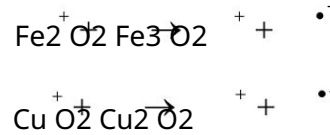


Şekil 1.5. Reaktif oksijen türleri oluşumu

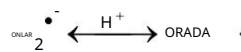
Reaktif oksijen serbest radikal zincir reaksiyonları nı başlatabilmekte ve karbon merkezli organik radikaller (R•), peroksit radikalleri (ROO•), alkoksi radikalleri (RO•), tiyil radikalleri (RS•), sülfenil radikalleri (RSO•), tiyil peroksit radikalleri (RSO2•) gibi çeşitli serbest radikalleri oluşturmaktadı rlar (Halliwell 1996; Gülçin 2012).

Singlet oksijen hücre membranı ndaki poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksitleri oluşturur (Halliwell 1991). Bu radikallerin kaynakları iç kaynaklar ve dı ř kaynaklar olmak üzere iki grupta toplanı r (Alhan 2002). Endojen yani iç kaynaklar, elektron transport zinciri, otooksidasyon reaksiyonları , enzimatik reaksiyonlar ve fagositik (makrofajlar, nötrofil) ve endotelial hücrelerde meydana gelen oksidatif reaksiyonlardı r. Dı ř kaynaklar çevresel faktörlerle meydana gelebilir. Bunlar, ilaçlar, sigara dumanı , radyasyon ve UV ı şı ğı gibi faktörlerdir.

Süperoksit radikali (O₂⁻) neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O₂) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu da meydana gelmektedir ve reaksiyonlar demir ve bakı r metaller tarafı ndan önemli derecede hızlandı rılı r (Temür 2005).



Süperoksit radikali, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonları nı n indirgeyicisi olması sebebiyle hasar kaynağı özelliğini taşı maktadı r. Düşük pH'larda daha reaktiftir ve protonlanarak perhidroksi radikali (HO₂•) oluşturmaktadı r.



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

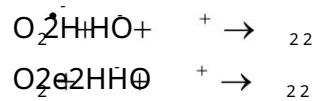


Süperoksit radikali hem yükseltgeyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur (Altı nı ı k 2000).



Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan gibi görev yapar ve bir elektron alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) indirgenir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO•) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşur. Peroksinitrit, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşturmak üzere metabolize edilir. Damar endotelinde nitrik oksiti nötralize etmek için sürekli olarak süperoksit oluşumu gerçekleşmektedir (Massie 1993; Payzı n 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 (H₂O₂) meydana gelmektedir.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit süperoksitin (O₂⁻) dismutasyonu ile gerçekleşmektedir. ki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.

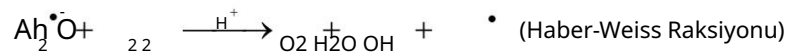


Bu reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak tanımlanır. Bu reaksiyonlar ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir (Alhan 2002).

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 alıcı ve verici şeklinde gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev aldıkları için serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran etkiye sahiptirler. Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini H₂O₂ ve O₂ - den OH• sentezini katalizlerler.

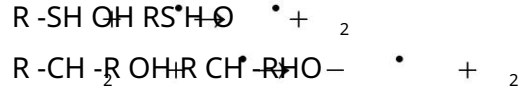
Fenton reaksiyonu Fe²⁺ veya Cu⁺ gibi geçiş metallere varlığında gerçekleşir. Süperoksit radikalının varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu meydana gelmektedir. Bu iki reaksiyon sonucunda ise en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalleri (OH•) oluşur (Malo Wilson 2000).



Hidrojen peroksit kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe²⁺ içeren membranlarda hasar oluşturabilir. Bu hasarları önlemek için hücrelerde önemli görevlere sahip olan antioksidan enzimlerden katalaz ve peroksidaz enzimleri rol oynarlar (Kılıç 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 oluşması na ve sonuçta büyük hasara neden olur (Gülçin 2012).



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 hasarı na neden olmaktadır (Serafani and Del Rio 2004). Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sırasıyla gelir (Stadtman 2002; Nohl ve diğerleri 2003).

Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş 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 yıkılış yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden (O₂) 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 H₂O₂ ve O₂ oluşur, bunların etkisiyle de

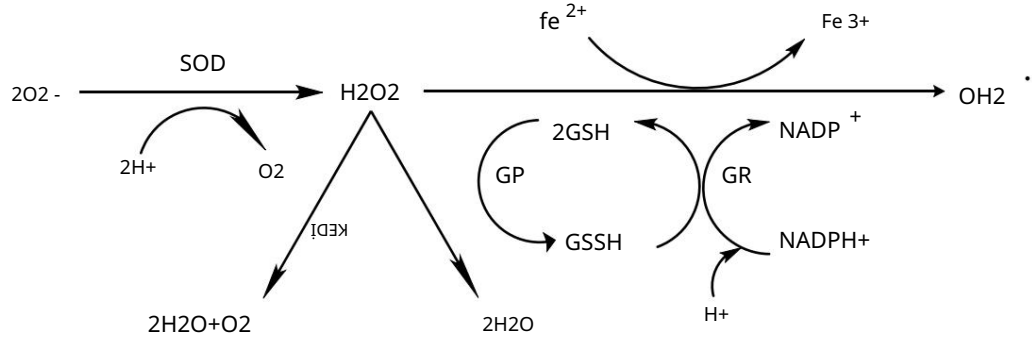
iskemi/reperfüzyon hasarı denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazının özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi/reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir (Chen et al. 2000).

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 dioksijenaz gibi enzimler de serbest radikal oluşmasına neden olurlar.

Peroksizomlar çok önemli hücre içi H₂O₂ kaynağıdır. Peroksizomlardaki oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit (H₂O₂) üretirler. H₂O₂'nin suya ayrıştırılması için katalizleyen katalaz (CAT) enziminin aktivitesi çok yüksektir. Bundan dolayı peroksizomlardan sitozole ne kadar H₂O₂ 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 (O₂) süperoksit radikaline (O₂⁻) indirgenmesi sonucu NADP⁺ üretimi artar. NADP⁺'nin diğer kaynağı H₂O₂ detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz enzim sistemidir.



Şekil 1.6. Glutasyon peroksidaz-glutasyon redüktaz enzim sistemi

*(SOD:Superoksit dismutaz, GR: Glutasyon redüktaz, CAT: Katalaz, GP: Glutasyon peroksidaz)

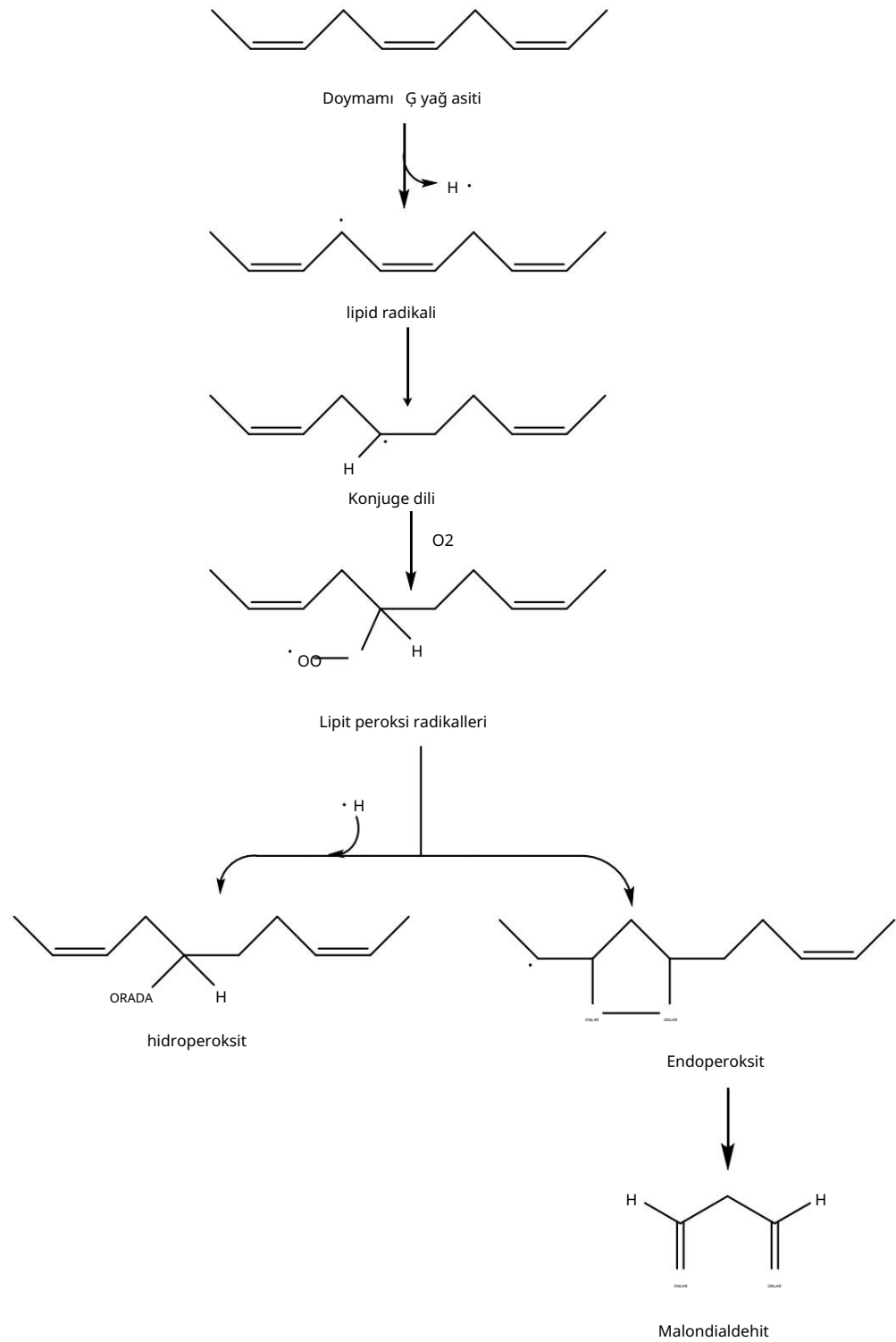
1.2.3. Serbest oksijen radikallerinin etkileri

Serbest radikallerin hücrelerde lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşiklere önemli etkileri bulunmaktadır. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) 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.

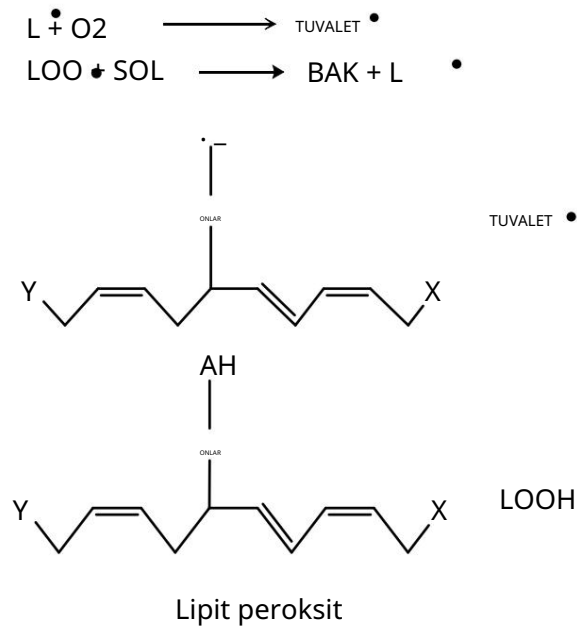
1.2.3.a. Serbest radikallerin Lipitlere etkileri

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 (Şekil 1.7).

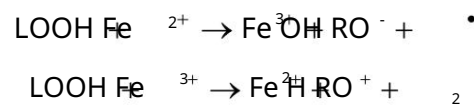


ġekil 1.7. Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu

Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranları nda lipid peroksidasyonuna uğrayan bağı ca yağ asitleri çoklu doymamı Ğ yağ asitleridir. Çoklu doymamı Ğ yağ asitlerindeki çift bağlardan bir hidrojen atomunun ç ı karı lması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanması yla lipid peroksidasyonu bağlar. Lipid radikallerinin (L•) moleküler oksijenle (O₂) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO•) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO•), membran yapı sı ndaki diğer çoklu doymamı Ğ yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de aç ı ğa ç ı kan hidrojen atomları nı alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüştürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek zincirleme devam eder.

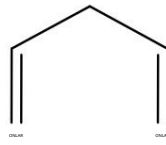


Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılışını ortamda bulunan demir ve bakır tuzları gibi geçiş metalleri iyonları gerçekleştirir. Oluşan peroksi ve alkoksi radikalleri peroksidasyonu uyarırlar (Kneepkens 1994; Loeckie 1999).



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 verdiği için 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 değildir 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 O₂ - veya H₂O₂ reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (Altınışık 2000).

Serbest radikaller proteinlerin peptit bağları nı koparı p hücrelerdeki proteinlerin yı kımı na neden olurlar. Protein yapı sı ndaki enzimlerin fonksiyonları nı 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 yapı sal değışikliklere yol açar. Ayrıca Pürin ve pirimidin bazları na da etki ederek modifikasyonlara neden olur böylece protein sentezinde inhibisyona yol açarlar (Dizdaroğlu 1991). Fagositik nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ ise membrandan kolayca geçerek DNA hasarı na sebep olur.

1.2.3.d. Serbest radikallerin Karbohidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeğitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeğitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Diyabet, koroner kalp hastalıkları , hipertansiyon, romatizma, Behçet hastalığı , deri ve göz hastalıkları , kanser gibi birçok hastalıkta ve yağlı lıkta serbest radikal üretiminin arttığı , antioksidan savunma mekanizmaları nı n yetersiz olduğu gösterilmiştir (Altın nı Ğı k 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 bulunduğu anda o substratı n 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, flavonoidler 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 onarılmasını onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler:

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon s-transferaz (GST), Katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidazlar sayılabilir.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar: melatonin, serotonin, seruloplazmin, adrenalin, epinefrin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metiyonin, urat, 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 Vitamini provitamini).
3. Askorbik asit (C Vitamini).
4. Folik asit (B10 veya B11 Vitamini).

b. Ğlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar Ğunlarıdır:

1. Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
2. NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar, difenilin iyodonyum).
3. Rekombinant süperoksit dismutaz.
4. Trolox (E Vitamini analogu).
5. Endojen antioksidan aktiviteyi artırıcılar (GSH-Px aktivitesini artırıcı 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 Ğelatörleri.

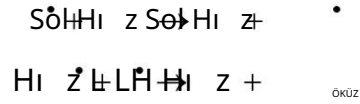
c. Ğıdalardaki eksojen antioksidanlar Ğunlarıdır:

1. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
2. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
3. Sodyum Benzoat
4. Etoksikin
5. Propilgalat

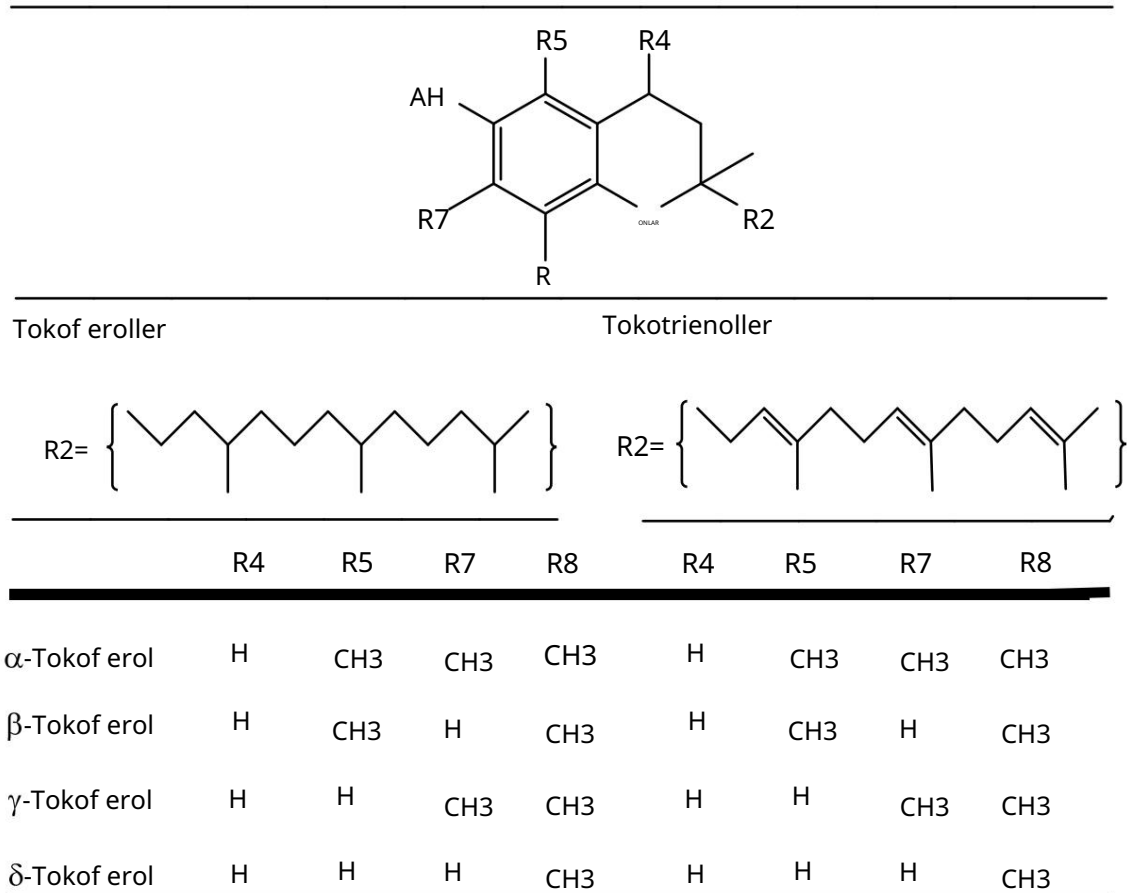
Tokoferoller, fenolik bir hidrojeni, peroksitlenmiş doymamış bir yağ asidinin peroksi serbest radikale aktararak antioksidan etki yaparlar. E Vitamini terimi bir grup tokoferol ve tokotrienoller için kullanılmaktadır. Bu grup içine giren tokoferoller (α , β , γ ve δ) ve dört tokotrienol (α , β , γ ve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



E Vitamini okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafı ndan 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).



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

Karotenoidler havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur (Frel 1994). A Vitamini'nin 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 ($OH\bullet$) 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).

Glutasyon (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. Glutasyon (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 lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır (Mavi 2005).

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

Sentetik antioksidanların kanserojen ve toksik olduğu hakkındaki bazı şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi arttırmıştır ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjistik 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 sigara ve diyetle alınan

antioksidanlar için aktivite çalışmaları na ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Garcia-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 bileğin 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) çalışması 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 koşullarında 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 matrislerinden ayrılmalarını ve bireysel kantitatif tayinlerini güçleştirir. Ayrıca antioksidanların eğgüdümünde davranışları 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 antioksidanı, metal, karbonil ve radikal gibi herhangi bir bileği veya grubu indirgemek için onlara bir elektron transferini esas alır (Huang et al. 2005). SET-temelli yöntemler, indirgenmiş renkliliği veya ışıkta özelliği değişen yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidan kapasitesini ölçer. Bu

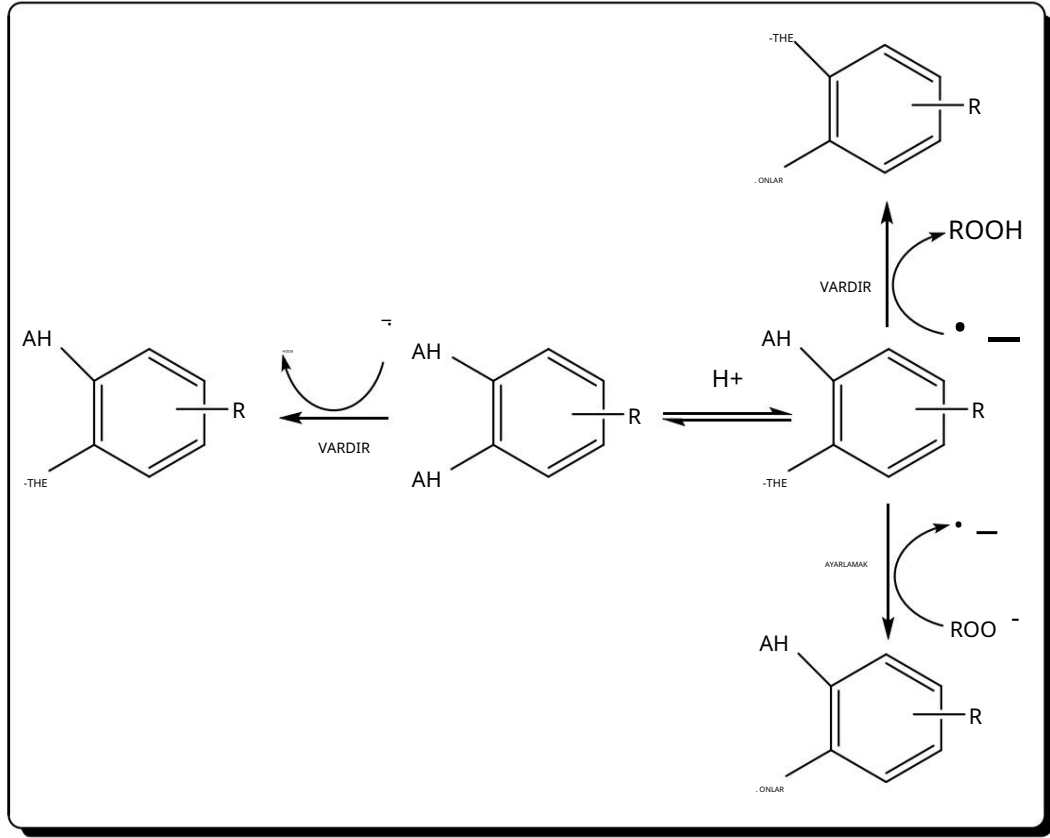
olay bir absorbans/floresans artışı veya azalış şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, bağımlı örneklerdeki antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir (Wright et al. 2001).

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.

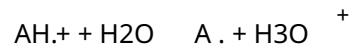


Bu yöntemlerin nispi reaktivitesi, bağ ayrışma enerjisi (~ 10 kcal/mol) ve iyonizasyon potansiyeli (< -36 kcal/mol) aralığı ile bileşikler için karakteristik olan antioksidanların H-verici gruplarının bağ ayrışma enerjisi ile belirlenir. HAT esaslı metodlar aşağıdaki verilmiştir (Huang et al. 2005; Gülçin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



SET esaslı yöntemlerdeki göreceli aktiviteler öncelikle bir molekülden hidrojen iyonları nı n ayrı Çtı rı lması nı (Lemanska et al. 2001) ve reaktif fonksiyonel grubun iyonizasyon potansiyelini esas almaktadır (Wright et al. 2001). Genel olarak pH arttı kça iyonizasyon potansiyeli azalı r. Bu nedenle SET reaksiyonları pH' dan bağı msı zdı r.

Redoks potansiyeli ve SET reaksiyonları arasında bir ilişki önerilmiş fakat tutarlı bir şekilde gösterilememiştir (Ou et al. 2005). SET reaksiyonları genellikle yavaş ve tamamlanması için uzun bir zaman gerekir. Böylece antioksidan kapasite hesaplamaları kinetikten, 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 kirlenimler 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 yapılabilmektedir (Ou et al. 2005). Elektron transferine dayanan reaksiyonlar genellikle yavaş ve kinetik açıdan değil de ürün yüzdesindeki azalmaya göre esas alınmaktadır (Prior et al. 2005). SET esaslı metodlar şöyle sıralanabilir:

1. Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemi ile total fenolik tayini
2. Trolox ekivaleni antioksidan kapasitesi (TEAC)
3. Ferrik iyonları indirgeyici antioksidan aktivite tayini (FRAP)
4. Total antioksidan kapasite tayini (oksidan olarak Cu²⁺ kullanarak)
5. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH) giderme tayini
6. 2,2-Azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit radikali (ABTS) giderme tayini
7. N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikali (DMPD) giderme tayini
8. Bakır iyonlarını (Cu²⁺) 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 ve ark. 2006; miguel 2010):

1. Süperoksit anyon radikali (O_2^-) 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

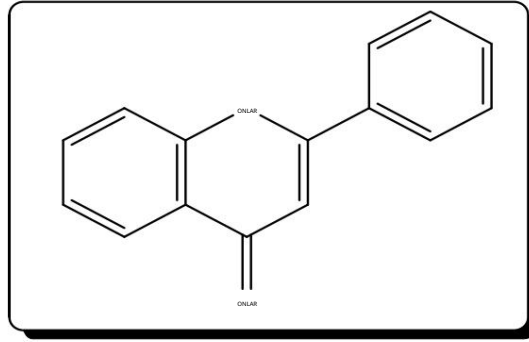
Fenolik bileşikler bütün bitki metabolizmaları nda fenilpropanoit biyosentetik yolu izlenerek doğal olarak oluşan, bitki, meyve ve çiçeklere renk veren, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilerde koruma sağlayan sekonder metabolitlerdir (Kahkönen et al. 1999; Hua et al. 1999; Ergün vd 2002; Cemeroğlu 2004; Saldamlı 2007; Fidan vd 2007; Nizamli oğlu ve Nas 2010). Bir veya daha fazla aromatik benzen halkası na hidroksil grubu veya gruplarını nın 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 yapıları nın çalışmalarıyla belirlenmiştir (Saija 1995; Saije et al. 1998; Gülçin and Dastan 2007).

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

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

Flavonoitlerin yapı sı ndaki OH grupları , oldukça reaktif olduğundan kolaylı kla glikozitlenir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999). 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahip olan flavonoitler, 5' pozisyonda OH grubunun bulunması yla daha yüksek bir antioksidan özelliği taÇı maktadır (Rice et al. 1996).

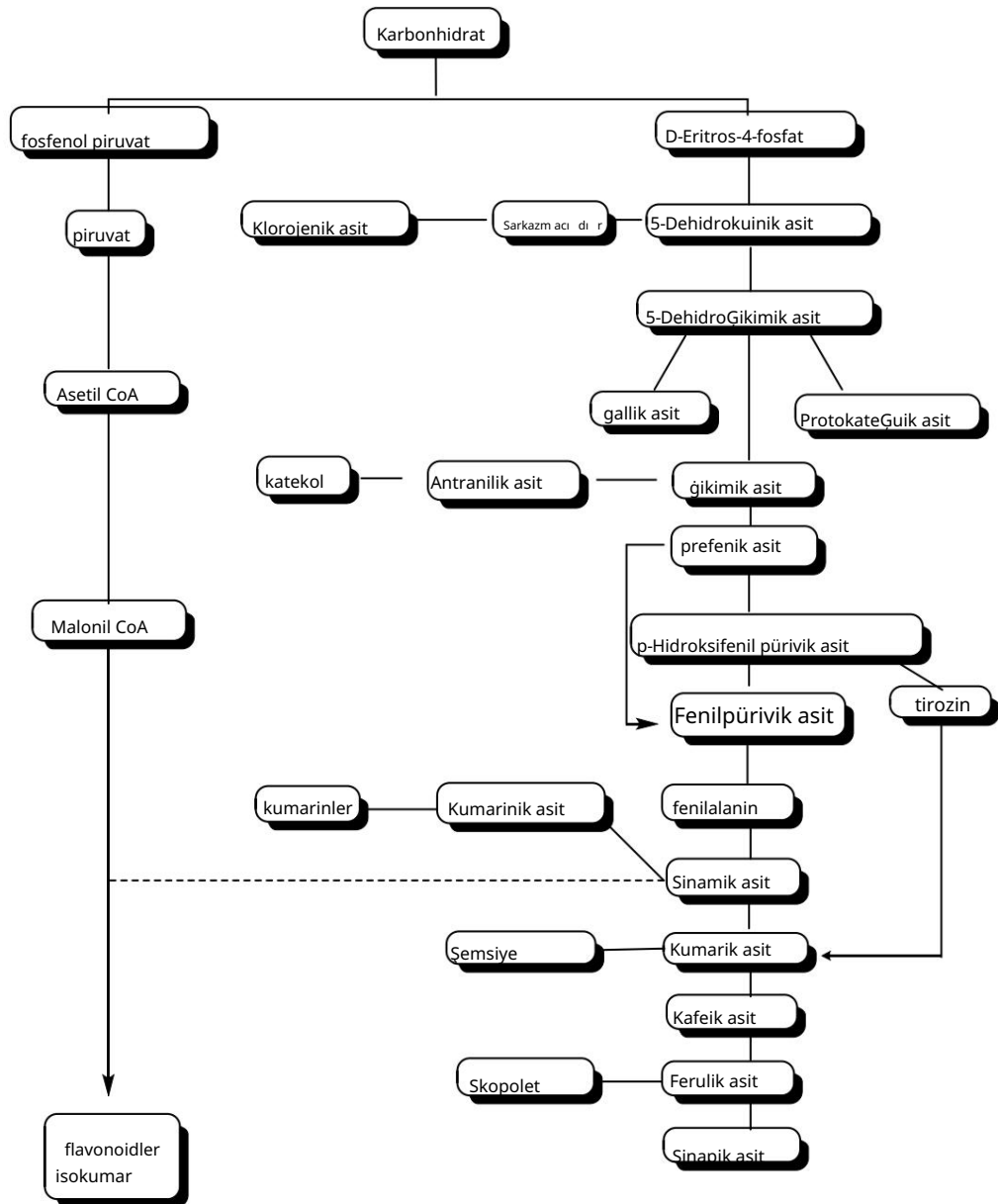


Şekil 1.10. Flavonoitlerin genel yapı sı

Son zamanlardaki çalı Şmalarda, 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 hastalıkları nda temel risk faktörlerini oldukça azaltmaktadır (Poyrazoğlu et al. 2002).

Fenolik bileşiklerin biyosentezi oldukça karmaşık tır. Fosfenol piruvik asit, klorogenik asit vası tası ile D-eritroz fosfat ile birleşerek pentoz fosfat yoluyla 5-dehidrokuinik asidi oluşturmaktadır. 5-dehidrokuinik asit, 5-dehidroşikimik asite dönüşürken protokateşik asit ve gallik asit meydana gelmektedir. 5-Dehidroşikimik asit, şikimik asite dönüşürken antranilik asit ve katekol sentezlenmektedir. şikimik asit, p-fenolik asit şekline dönüşürken p-hidroksifenil piruvik asit veya fenilpiruvik asit oluşturmaktadır. 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 flavonoidler ve izokumarinler meydana gelmektedir (Harborne 1964).

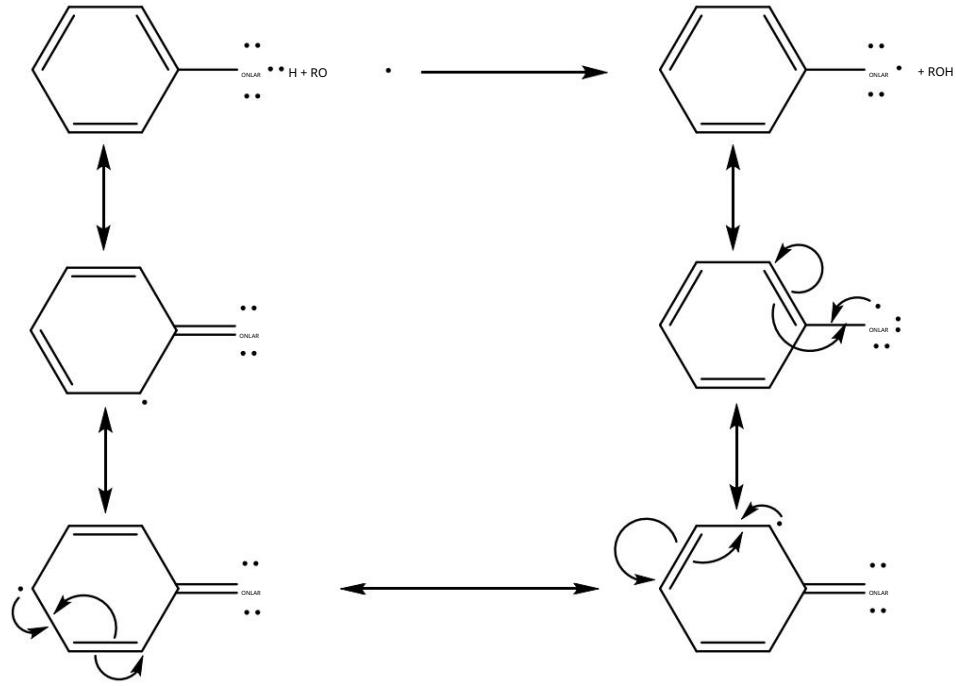


Şekil 1.11. Fenoliklerin biyosentezi (Sarı kaya 2009).

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 Çelatlama) 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 flavonoidlerce zengindirler (Ren and Lien 1997; Weber et al. 1997). Bu açıdan diyetle koruyucu etki sağlamaktadırlar ve gıdalarda bulunabilirliği ve alınması gereken düzeylerinin bilinmesi oldukça önem arz etmektedir (Shahidi et al. 1992).

Yapılan birçok araştırmada fenoliklerin antialerjik, antiinflamatuvar, 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;).

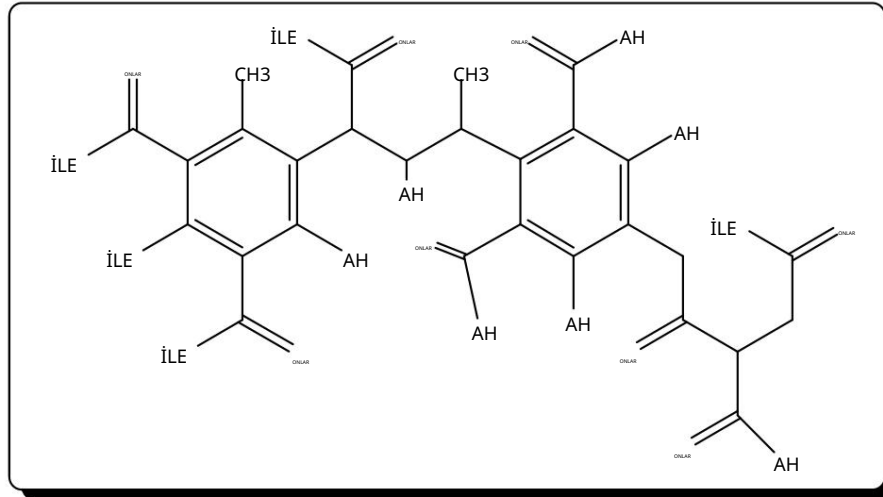
Fenolik bileşikler düşük konsantrasyonlarda enerji üretiminde yer alan enzim aktivitelerini de etkilemektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ise proteinlerle kompleks oluşturarak, proteinleri çöktürmektedirler (Juven and Itenis 1972; Denyer and Stewart 1998). Bu nedenle meyve suyu endüstrisinde meyve sularının 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 kullanılmaları 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, ayrı bir organik maddede, peat, kömür yatakları ve toprakta bulunan, özellikle demir gibi metal katyonlarla jelat 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 yapısal yapısı

Kömür oksitlendiği zaman bazik ortamda daha fazla ekstrakte edilebilir duruma gelmektedir. Genellikle bazik ortamda çözünen kesime hümik asit, çözünmeyen kesime 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 kalıntılarından ayrışmasıyla meydana gelen; proteinler, polisakkaritler ve polinükloitler gibi bileşiklere dönüşmeyen polikondanse moleküllerdir (Gezici 2004).

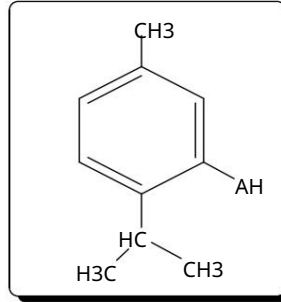
Kök gelişimi ve bitkilerin absorbe ettiği besin elementleri metabolizmasını etkilemesi ile bitkilere doğrudan etki etmektedir. Yapılan araştırmalarda hümik asitin bitki gelişimini artırdığı, bitkilerdeki alüminyum zehirlenmesini engellediği belirlenmiştir (Tan ve Bringer 1986).

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

aktivite gösterebildiği de ortaya konulmuştur (Chen and Aviad 1990). Hüyük maddeler yapı ları nda, aromatik yapı ya bağlı karboksil, fenolik hidroksil ve alkil grupları ihtiva eden, birbirlerine alifatik, alisiklik ve eterik bağlarla bağlanmış çok sayı da hidrofilik grup içermektedirler (Dizman 2008).

ęelat halkaları içeren kompleksleri, ęelat halkası içermeyen komplekslere göre daha dayanı klı dır (Gündüz 1998). Hüyük maddeler, ęelatlama ile indirgenmiğ katyonları kararlı hale getirebilir. ęelatlaęma kapasiteleri oldukça yüksek olduğundan, metal kirliliklerin önlenmesinde kullanı labilmektedirler (Tan 1994). Hüyük asitler sadece tarı m alanı nda değil çevre teknolojileri ve kimya teknolojilerinde de kullanı lmaktadır. Ayrıca insan sağlı ğı üzerine yapı lan çalı şmalarda AIDS bağta olmak üzere astı m, bronęit, grip, mide rahatsızlıkları, böbrek taçı oluşumunu engelleme, hemoroit, deri kanseri, kan koagulantı, kansızlık, ağı rı uyku, iğtahsızlık gibi problemlerin çözümünde önemli bir yer tutmaktadır (Dizman 2008).

1.2.5.b. Timol



ęekil 1.14. 5-Metil-2-izopropilfenol (timol)'ün açık yapı sı

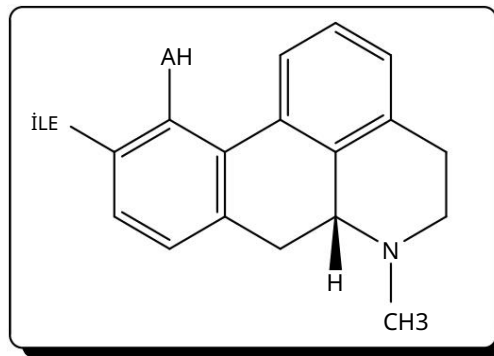
Timol (5-Methyl-2-isopropylphenol) monoterpenler grubu bileşikler arasında sı nı flandı rılan bitkisel bir fenolik bileşiktir (Balladin and Headley 1999). Kekik adı yla bilinen Origanum ve Timus türleri çeğitli amaçlarla kullanı lmaktadır. Timus ve Origanum türlerinin içerdii bağlı ca esansiyel yağlar; timol, karvakrol, borneol, cymol, cimen, tanen ve flavonlardır. Baharat olarak kullanı lı r ve sindirimi kolaylağtırır (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 Nacz 1995).

Timol'un antifungal, antimikrobiyal, antioksidan ve antiseptik özellikleri olduğu belirlenmiştir. Timolün fenolik grubunun lokalizasyonu antioksidan aktivitesini artırır (Yenisliva et al. 1999). Timol anti inflamatuvar etkisini, interlökinler, lökotrienler ve prostanoitler 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, nonopioid 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 D1 ve 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 ve Gessa 1978; Pzedborski ve ark. 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. Otoksidasyonu 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 çı ktı ğı belirtilmektedir (Bindolli et al. 1992).

Apomorfin pro-oksidan olarak hareket ettiğinde, DNA hasarı na yol açmakta ve süperoksit radikal üretimi ile deoksiriboz bozulmaları na 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 artı ř meydana getirir. Apomorfinin biyotransformasyonu sonucu H₂O₂ oluşabilir. Bu şekilde H₂O₂ miktarı nda meydana gelen artı ř CAT aktivitesinde oldukça önemlidir (Halliwell and Gutteridge 1999).

Apomorfin demir ve bakı r şelatlama özelliklerine (Khaliulin et al. 2003) ve biyolojik membranlardan hücre içine kolayca nüfuz etme yeteneğine (Gancher et al. 1989) sahiptir. Hidroksil radikallerine bağlı hücre ölü mü riskini azaltı r ve H₂O₂ oluşumunu önler (Youdim et al. 2000).

1.3. Çalı şmanın amacı

Antioksidanlar diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleyen moleküllerdir. Gı da açı sı ndan bir antioksidan, okside olabilen substratı na nazaran daha düşük konsantrasyonlarda olsa bile onun okside olması nı önemli ölçüde engelleyen ve erteleyen bir maddedir (Halliwell and Gutteridge 1989; Sies 1993; Halliwell 1995; Gülçin 2012). Antioksidanlar ayrı ca insan vücudunu serbest radillerden ve ROS

etkilerinden korur. Bunlar lipit peroksidasyonunun yanı sıra birçok kronik hastalığın ilerlemesini de engeller. Genellikle oksidasyon olayında radikal zincir reaksiyonunu önlemek amacıyla yağlarda 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 yapıları sentetik antioksidanlar genellikle yağda ve farmakoloji uygulamalarında kullanılmaktadır. Katı ve sıvı yağların çözünürlüğünü artırmak için alkollerle yer değiştirirler (Hudson 1990). Ancak BHA ve BHT kullanımı, toksik ve kanserojen olmaları nedeniyle yasalarla sınırlandırılmıştır (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu nedenle yağda uygulamaları için daha güvenli ve doğal antioksidanlara ilgi artmakta ve tüketici tercihlerinde doğal antioksidanlara olan eğilim, antioksidan kaynaklarını keşfetmek için girişimlerin hızlanması nedeniyle olmuştur (Gülçin 2006b, 2007, 2012).

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

Apomorfin; Parkinson ve erektil disfonksiyon gibi hastalıklarının tedavisinde kullanılan dopamin reseptör agonistidir (Yang et al. 2006; Oksay 2006). Apomorfinin demir ve bakır çökeltilme özellikleri (Khaliulin et al. 2003) ve doğal fenolik yapıları nedeniyle güçlü bir antioksidan olabileceği öngörülmüştür.

Timol; Kekik ve Mercan köğkü yapısı nda bulunan antiseptik ve antimikrobiyal özelliği olan fenolik bir doğal bileşiktir. yapısı lan çalı şmalarda timolün antimutajenik (Andersen 2006) ve antitümör özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Mezzouga 2007).

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

Ayrıca açk formülleri verilen fenolik yapı ya sahip bileşiklerin çalı şmamız kapsamı nda antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve mekanizmaları nı n aydınlatılması nı n yanı sıra insan kanı ndan kromatografik yöntemlerle saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerinde inhibisyon etkileri de araştırılmıştır. Bu çalı şmada inhibitör olarak kullanılan fenolik doğal bileşikler sadece inhibisyon özellikleri değil antioksidan özellikleride araştırılmıştır. İldiğinden elde edilen sonuçları n tedavi amaçlı kullanı lacak ilaçları n dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı nı düşünmekteyiz.

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıkları nı n 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 bası ncı nı azalttı kları ndan dolayı bağta glokom tedavisinde ilaç olarak, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda (Supuran and Scozzafava 2001; Beydemir and Gülçin 2004), pozitron, emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde

diagnostikte his materyali, antiülser, diüretik ilaçları n geliŞmesinde yol gösterici antibiyotik olarak halen kliniklerde yoğun bir Şekilde kullanı lmaktadır .

Fenoliklerin CA inhibitörleri olarak araŞtı rılması nı n sebebi, basit fenollerin CA izoenzimlerinin tek yarı Şmalı inhibitörü olduğu belirtildiğindendir. Nair ve arkadaşları hCA-II ile fenollerin etkileŞimini gösteren X-ray kristal yapı sı nı aydı nlatmak amacı yla enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ ile fenollerin fonksiyonel -OH grubunun, katalitik bölge için oldukça önemli bir amino asit olan Thr199' un NH amidinin bir hidrojen bağı nı n yanı sı ra ikinci bir hidrojen bağı vası tası yla -OH'ı nı enzimin aktif bölgesinin çinko bağı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenolik bileŞiklerin CA'ya bağlandı ğı nı göstermiŞlerdir (1994). Fenollerin fenil kı smı CA'nı n fizyolojik substratı olan CO₂'nin bağlandı ğı prekatalitik kompleks bölgesine bağlanarak hCA-II'nin aktif bölgesinde hidrofobik part oluŞturmakta dı r ve böylece fenollerin CA'nı n eŞsiz yarı Şmalı inhibitörleri olduğu saptanmı Ştı r. Son zamanlarda bütün memeli CA-I / XV izoenzimlerinin, fenoller ve onları n benzeri türevleriyle etkileŞimleri milimolardan submikromolara kadar incelenmiŞtir (Innocenti et al. 2008). Gülçin ve çalı Şma arkadaşları tarafı ndan da antioksidant ve radikal giderme aktiviteleri belirlenen bazı biyolojik moleküllerin son zamanlarda CA izoenzimleri üzerindeki etkileri yoğun Şekilde çalı Şı lmı Ştı r. Bu anlamda dantrolen sodyum (Gülçin et al. 2004c), tokoferol (Arashisar et al. 2004), alabalık (Oncorhyncytes mykiss) kanı plazması ndan elde edilen düşük molekül ağı rlı klı 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 (ğentürk et al. 2009) farklı CA üzerine in vivo ve in vitro etkileri incelenmiŞtir. Gerçekten de, yaptı ğı mı z çalı Şmada hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile kullandı ğı mı z doğal fenolik bileŞikler arası ndaki inhibisyon profilinin çeŞitli olduğu, milimolar- submikromolar aralı ğı nda değiŞen inhibisyon sabitleri ile belirlenmiŞtir. Böylece spesifik CA inhibitörleri olan sulfonamid ve türevlerinin yerine alternatif olarak antioksidan özellikleriyle de dikkat çeken fenolik bileŞiklerin kullanı labileceği 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 yaklaşıklık 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 çözünebilir 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 (1.106 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+} izoenzimlerinin karbonik anhidraz grubudur ve Zn^{2+} uzaklaştırılmasıyla 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 yakını olduğu düşünülmüştür (Kisker ve ark. 1996).

Karbonik anhidraz enzimi aromatik ve heteroaromatik sülfanilamidler 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 Hesap 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 gerçekleştirilmektedir. Radikal giderme, peroksidazların ayrıştırılması, 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 flavonoidler 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 bulunan rezveratrol (Gülçin 2010), zerdeçalda bulunan kurkumin (Ak and Gülçin 2008) ve karanfilde bulunan eugenol (Gülçin 2012) de önemli antioksidanlardandır. Likopen kanser ve kalp rahatsızlıklarında bağışıklık sistemini devreye sokan önemli bir maddedir.

Brokoli, havuç, ıspanak (Gil et al. 1999) gibi yeşil sebzeler kayısı ve Geftali gibi meyvelerde bulunan β -karoten, A vitamininin 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 hastalıklarının 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 önerilmiştir. Ayrıca karnabahar (Köksal and Gülçin, 2008), sumercimeği (Gülçin et al. 2009), karabiber (Gülçin 2005), ısrırgan (Gülçin 2002) gibi günlük tüketilebilen çeşitli bitkilerin ve meyve sularının da (Wen et al. 1999) yüksek antioksidan etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

Zeytinyağının bağılıca fenolik bileşenlerinden olan hidroksitirozol, hücre zarlarına etki ederek, araçidonik asit lipoksigenazının 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, lipid peroksidasyonunu önleme ve serbest radikal giderme özellikleri ile antioksidan etki göstermektedirler (Mukai et al. 2000). Tümör gelişimini ve yayılmasını hücre zarı çöklü doymamış yağ asitlerinin peroksidasyona duyarlılığı 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 kullanılmalarıyla 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. Malzeme

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), N,N-dimetil-p fenilendiamin (DMPD), neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), riboflavin, metiyonin, nitroblu tetrazolyum (NBT), 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikalleri, 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 parlak mavi R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.1.2. Yaralanan alet ve cihazlar

UV-VIS Spektrofotometreleri	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86oC)	: Sanyo, Japonya
pH metre	: Hanna Aletleri
Hassas terazi	: Scaltec SBA41
İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300oC)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex ve Oxford Pipetleyiciler
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
girdap	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Firstream Calypso MK 1 Cam Fotoğraf

Magnetik karıştırıcı : Stuart Bilimsel
UV-Spektrofotometre küveti : 1 cm³ lük Kuvars Küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

3.1.3.a. Fe³⁺ -Fe²⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,2 M pH:6,6 fosfat tamponunun hazırlanması : 6,24 g Na₂HPO₄ 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 K₃Fe(CN)₆ çözeltilisinin hazırlanması : 1,5 g K₃Fe(CN)₆ destile suda çözüldü ve toplam hacim 150 ml'ye destile su ile tamamlandı .

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

4. %0,1'lik FeCl₃ çözeltilisinin hazırlanması : 165 mg FeCl₃.6H₂O 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'lik CuCl₂ çözeltilisinin hazırlanması : 47 mg CuCl₂ alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

2. 7,5x10⁻³ M'lik etanolik neokuprin çözeltilisinin hazırlanması : 78 mg Neokuprin alındı ve 50 ml etanolde çözüldü.

3. 1 M'lık $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması (pH:6,5): 7,7 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden oluşur.

3.1.3.d. Bipiridil reaktifi ile metal Çelatlama 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'lik 0,2 M'lık HCl çözeltisinde çözüldü.

4. 2 mM'lık FeSO₄ Çözeltisinin Hazırlanması : 0,028 g FeSO₄.7H₂O alındı ve 50 ml destile suda çözüldü.

3.1.3.e. Metal Çelatlama aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 2 mM'lık FeCl₂ çözeltisinin hazırlanması : 0,014 g FeCl₂.3/4H₂O 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•+ giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanması (pH:7,4): 2,84 g Na₂HPO₄ 180 ml destile suda çözüldü. 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 K₂O₈S₂ 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^{••} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. 0,1 M'lık asetat tamponunun hazırlanması (pH:5,25): 2,05 g CH₃COONa 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^{••} 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 FeCl₃ ilave edilerek hazırlandı .

4. 0,05 M'lık FeCl₃ çözeltisinin hazırlanması : 0,81 g FeCl₃ 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 Na₂HPO₄ 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. $1,33 \times 10^{-5}$ M'lık riboflavin çözeltisinin hazırlanması : 12 mg riboflavin 100 ml, 0,05 M ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponunda çözününceye kadar karıştırıldı .

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

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

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 l linoleik asit 50 ml pH:7,4 fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karıştırılarak homojenize edildi.

3. %3,5'lik 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 $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$, %3,5'lik HCl ile çözümlenerek hacim aynı çözeltiyle 100 ml'ye tamamlandı .

5. %30'lik 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 NaHCO₃, pH:8,8 (Sepharose-4B matrisi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 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 Na₂CO₃/0,1 M NaHCO₃ pH:10 (CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4g (0,1 mol) NaHCO₃'ün 1 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı .

3. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na₂SO₄, pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 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 Na₂SO₄ pH:8,7 (hemolizatin tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,03 g (25 mmol) Tris ve 3,12 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye tamamlandı .

5. 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH:6,3 (kolona tutunmuş HCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınır, pH:6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı .

6. 0,05 M Tris-SO₄, pH:7,4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı .

7. 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄, pH:5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO₄ tutunmuş ve 2,04 g 0,015 mol CH₃COONa, 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 Brilliant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanı lan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant 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 çözümlü pH:8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı .

10. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanı lan çözelti): 0 ^{bu} C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazı rlandı .

11. İndikatör çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanı lan çözelti): 0,0125 g fenol kı rması ve 0,219 g NaHCO₃ ün 1 litre saf suda çözünmesiyle hazı rlandı .

12. % 0,04'lük Brom Timol Mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 ml'ye tamamlanması yla hazı rlandı .

13. Stok fenolik doğal bileşik çözeltilerinin hazı rlanması : 10 mg fenolik doğal bileşik çözeltileri (apomorfın, 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.I. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanı lan çözeltiler

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

karı ıtı rı larak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazı rlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β merkaptotanol ilave edildi.

2. SDS-PAGE'de kullanı lan 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 kullanı lan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazı rlandı .

4. Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisinin hazı rlanması : 30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid karı ı mı 100 ml suda çözüldü.

5. %10'luk SDS çözeltisinin hazı rlanması : 10 g SDS 90 g saf suda çözüldü.

6. 3 M'lı k Tris-HCl çözeltisinin hazı rlanması (pH:8,8): 36,3 g Tris alı ndı ve 48 ml 1 M'lı k HCl ile karı ıtı rı ldı ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı .

7. Jel fiksasyon çözeltisinin hazı rlanması : %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karı ı m hazı rlandı .

8. Jel yı kama çözeltisinin hazı rlanması : %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karı ı m hazı rlandı .

3.2. Antioksidan çalışmaları

3.2.1. Fe³⁺ -Fe²⁺ indirgeme kapasitesi

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (1986). Bunun için öncelikle 1mg/ml konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı . Bu stok çözeltilerden 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 K₃[Fe(CN)₆] ilave edilerek karıştırıldı m 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 FeCl₃ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karıştırıldı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı . Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı .

3.2.2. Cu²⁺ -Cu⁺ indirgeme kapasitesi -Kuprak metodu

Fenolik yapıdaki bileşiklerin Cu²⁺ indirgeme aktiviteleri bakır iyonları indirgeme metodunun (Apak et al. 2006) hafif bir modifikasyonu yapıldı (Ak and Gülçin 2008). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşik tüplerine 0,25 ml CuCl₂ çözeltisi (0,01 M), 0,25 ml etanolik neokuprin çözeltisi (7,5x10⁻³ M) ve 0,25 ml CH₃COONH₄ tampon çözeltisi (1 M) sırasıyla eklendi. Yarı m saat sonra 450 nm'de köre karıştırıldı 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 FeCl₃ 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 Çelatlama aktivitesi

Fe²⁺ Çelatlama aktivitesi Re ve arkadaşları nı n belirlediği metoda göre yapıldı (1999). Bu amaçla deney tüplerine 0,25 ml FeSO₄ 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'lik 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) Çelatlama aktivitesi

Fenolik yapıya sahip bileşiklerin metal Çelatlama aktiviteleri Dinis ve arkadaşları nı n belirledikleri metoda göre yapıldı (1994). Bu işlem için 2 mM'lik ve 0,05 ml FeCl₂.4H₂O ve 0,35 ml saf su içeren çözelti, değişik konsantrasyonları nı 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 bağlatıldı . Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Önkübasyondan 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 (O₂⁻) giderme aktivitesi

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

Bunun için numune ve standartları n farklı konsantrasyonları oluşacak şekilde 0,05 M'lı k ve pH'sı 7,8 olan fosfat tamponu ile hazı rlandı . Numune içeren tampon çözeltiliye riboflavin, metiyonin ve NBT'den $1,33 \times 10^{-5}$, $4,46 \times 10^{-5}$ ve $8,15 \times 10^{-8}$ M konsantrasyonları na denk gelen miktarları sı rası yla ilave edildi. Oluşan reaksiyon karı Ğı mı oda sı caklı Ğı nda 40 dakika boyunca 20 W'lı k floresan ı Ğı Ğı ile uyarı ldı . Absorbans, sudan oluşan köre karĞı 560 nm'de kaydedildi.

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

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metodununa göre yapı ldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH• 'ı n 1 mM'lı k çözeltilisi kullanı ldı . Numune olarak daha önce hazı rlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltilisi kullanı ldı . Deney tüplerine sı rası ya 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonları nda çözeltili oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarı ldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı . Daha sonra her bir nümune tüpüne stok DPPH• çözeltilisinden 1 ml ilave edildi. Yarı m saat oda sı caklı Ğı ve karanlı kta inkübe edildikten sonra etanolden oluşan köre karĞı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH. çözeltilisi kullanı ldı . Azalan absorbans geriye kalan DPPH. çözeltilisi miktarı nı 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 arkadaşları nı n yaptı Ğı çalı maya göre belirlendi (1999). Öncelikle 7 mM'lı k ABTS çözeltilisi hazı rlandı . Bu çözeltiliye 2,45 nM'lı k persülfat çözeltilisi eklenerek ABTS radikalleri üretilildi. ABTS radikal çözeltilisi kullanı lmadan önce kontrol çözeltilisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı .

ABTS radikal giderme aktivitesine bakı lacak olan fenolik asitlerin farklı konsantrasyonları na (10-30 g/ml) birer ml ABTS radikal çözeltilisi ilave edildi ve yarı m

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

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

N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşları'nın metoduna göre belirlendi (1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon (DMPD^{•+}) elde edildi. Bunun için 100 ml'lik DMPD çözeltisinin (pH:5,3; 100 mM) 0,05 M olacak şekilde 0,2 ml FeCl₃ ilavesiyle elde edildi. Bu çözeltinin 1 ml'si için 505 nm'de ölçüm yapıldı.

DMPD^{•+} radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 505 nm'de optik dansitesi 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^{•+} çözeltisinin absorbanı 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^{•+} çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorban değerleri 505 nm'de ölçüldü. Kör olarak tampon çözeltisi 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. Göstelenen miktarlara karşılık gelen hacimde stok çözeltiler vezin kaplarına otomatik pipetlerle aktarıldı ve toplam hacim tampon çözeltisi (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 çözeltisi ve 2,5 ml linoleik asit emülsiyonu kullanıldı. İnkübasyon 37°C'de ve karanlıkta gerçekleştirildi. Her 12 saatte bir vezin kaplarından 100 µl alınarak 4,7 ml etanol bulunan deney tüplerine konuldu ve sırasıyla 100 µl Fe²⁺ çözeltisi ve 100 µl SCN çözeltisi ilave edildi.

Kör numune ise 4,8 ml etanole 100 µl Fe+2 çözeltisi ve 100 µl NH₄SCN çözeltisi ilave edilerek hazırlandı. Numunelerin 500 nm'deki absorbanları köre karşı okundu. Ğnkübasyon iğlemine kontrol maksimum absorbansa ulağtı ğı noktadan sonra son verildi.

3.3. Deneyde Kullanılan Kanın Temini

Ğnsan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden taze olarak temin edildi. Deneylerde kullanılanı ncaya kadar +4oC'de muhafaza edildi.

3.4. Enzim Saflağtı rma Çalı Ğmaları

3.4.1. CA enzim hemolizati nı n hazı rlanması

Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500xg'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 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemolize.

Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklağtı rmak için +4oC'de 20.000xg'de 30 dakika santrifüj yapı ldı. Üst kısmındaki hemolizat damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalı Ğmalarda kullanılmak üzere +4oC'de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban et al. 2008).

3.4.2. CA enziminin afinite kromatografisi ile saflağtı rılmasıyla ilgili çalı Ğmalar

3.4.2.a. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jelinin hazı rlanması

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

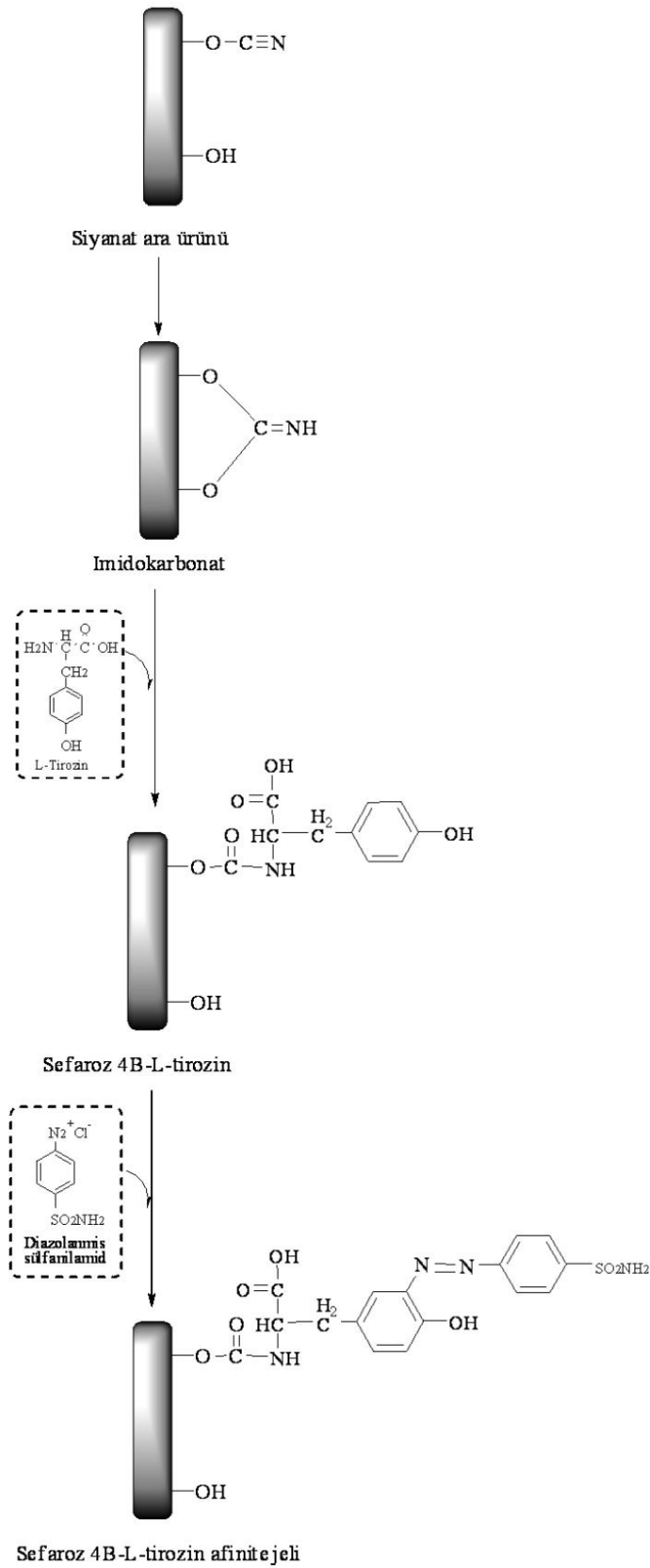
kolon materyaline L-Tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır.

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

CNBr ile aktive edilmiş sepharose-4B'ye Tirozin takılması : CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ 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 karıştırılması, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı. Gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'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 NaHCO₃ tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 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-SO₄ (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 alarak jel süspanse edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alınındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanları ve pH'ları nı n eği tlenmesinden 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 Na₂SO₄ (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı . Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek HCA-I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip HCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplama yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanları na 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). CO₂'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 CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu.

Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,05 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

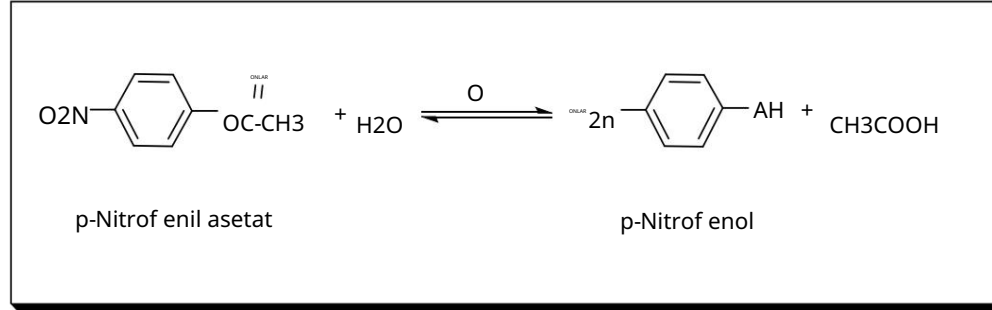
Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

$$AB = \frac{t_{bu} - t_c}{t_c}$$

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

3.5.2. Esteraz aktivitesi

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



Şekil 3.2. p-Nitrofenilasetat'ın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbanı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrı bir p ayrışmasını ölçümü etkilememektedir (Armstrong et al. 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetat'ın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

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

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µ l)	Numune Tüpü
Tris-SO4 (0,05 M, pH:7,4) p-	1400	1400
Nitrofenol asetat	1000	1000
Güvenli 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 katılması sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı :

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (μ l)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (0,05 M, pH:7,4) p-	467	467
Nitrofenol asetat	333	333
Güvenli 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°C'de 348 nm'de absorbans 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, 1 ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte et al. 1967). Kinetik çalışmaları esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esterase aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.6. Protein Tayini

3.6.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapılarında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcı yardımıyla eğit 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 Brilliant Blue G 250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorptans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlıdır. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'inde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır 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 absorptans değerleri okundu.

Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorptans değerlerine karşı karşı gelen g 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 Km ve Vmax değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

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

3.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığı nı n 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-merkaptolanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkanıldı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. Her cam plaka birbiri üstüne konulup ve klipslerle tutturulup jel hazırlama cihazına konuldu.

Cam plakaları nın altı agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra enjektörle plakalar arası na ilave edildi. Düzgün jel yüzeyi oluşturmak amacıyla %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu ve katılaşması için 15 dk bekletildi. Daha sonra ayırma 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 yarı m saat 80 voltta daha sonra 2 saat 120 voltta yürütme yapıldı. Jel cam plakalar arası ndan 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 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 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, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

Yı ğma jeli Ğöyle hazı rlandı : 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 karı Ğtı rı ldı . Bu karı Ğı mı n üzerine en son olarak 0,07 ml %5"lik PER eklendi.

3.9. hCA-I ve hCA-II Ğzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Fenolik Doğal BileĞiklerin Etkilerinin Belirlenmesi

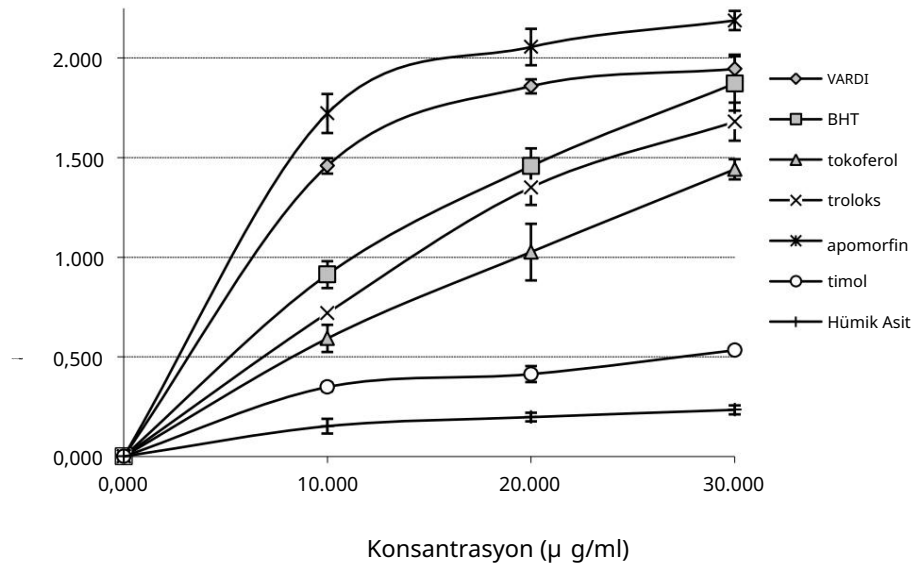
Yukarı da verilen fenolik doğal bileĞiklerin, saflaĞtı rı lacak olan CA izoenzimleri üzerindeki etkisi araĞtı rı ldı . Ölçümler hem hidrataz hem de esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapı ldı . Daha sonra I50 ve Ki deĞerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

4. ARAŒTIRMA BULGULARI

4.1. Antioksidan AraŒtırma Bulguları

4.1.1. Fe³⁺ - Fe²⁺ indirgeme kuvveti bulguları

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge 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 μ g/ml) özeltilerinin 700 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi (ęekil 4.1).



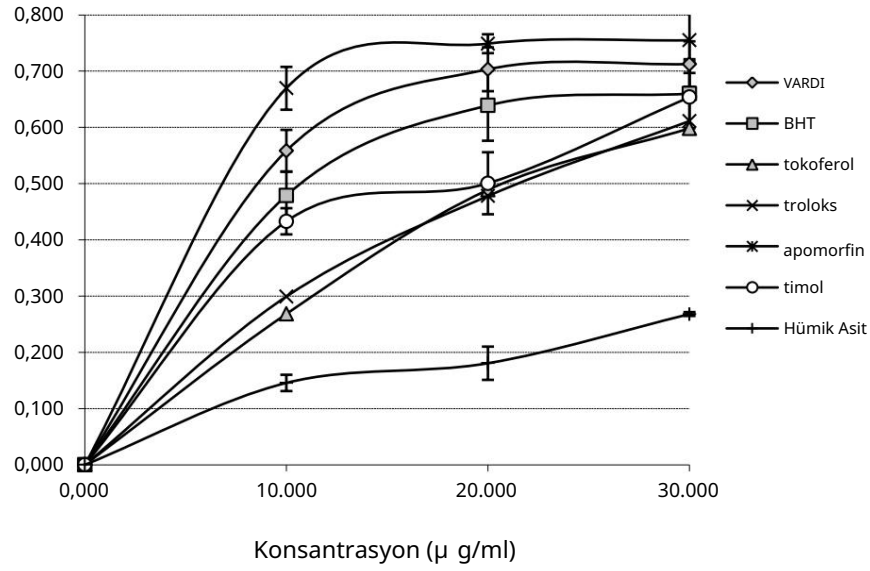
ęekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 μ g/ml) doğal fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvvetinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Fenolik bileşiklerin ferrik iyonları nı (Fe^{3+}) ferröz iyonları na (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (şekil 4.1) her bir standart antioksidan ve fenolik bileşik için 20 μ g/ml'ye karşılıklı gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

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

4.1.2. Kuprik iyonları nı (Cu^{2+}) kupröz iyonları na (Cu^{+}) indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulguları

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

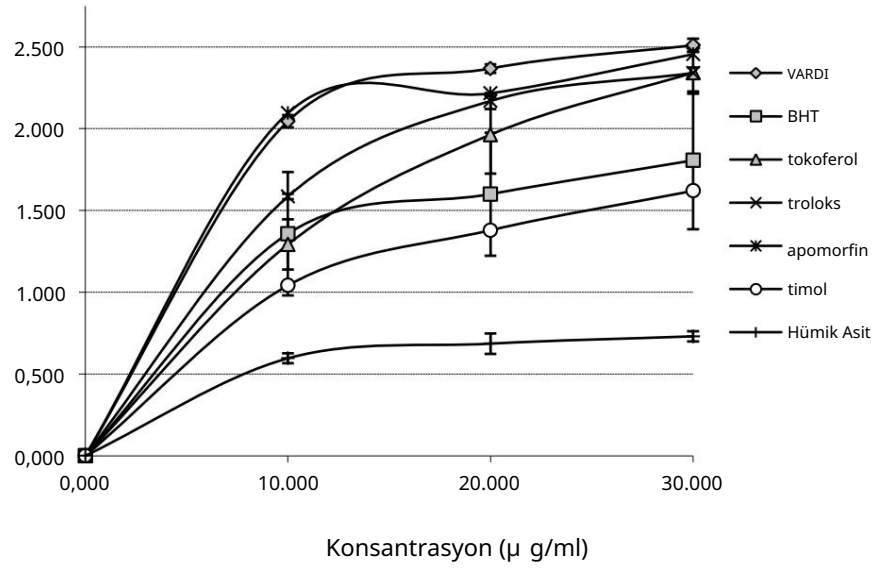


Şekil 4.2. Fenoliklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) kuprik iyonları nı (Cu²⁺) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

20 µ g/ml konsantrasyonunda fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanları nın kuprik iyonları nı (Cu²⁺) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılması : Apomorfin > BHA > BHT > Timol > -Tokoferol > Troloks > Hümik asit.

4.1.3. Ferrik iyonları nı (Fe³⁺) ferröz iyonları na (Fe²⁺) indirgeme kuvveti (FRAP metodu) bulguları

FRAP metodu elektron vererek antioksidan aktivite gösteren bir metottür. Bu metotta ferrik iyonları (Fe³⁺) ferröz iyonları na (Fe²⁺) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe²⁺) iyonları ise Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluşur. Bu mavi renkli bir kompleks ise 593 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Fenolik bileşiklerin FRAP metoduna göre ferrik iyonları (Fe³⁺) ferröz iyonları na (Fe²⁺) indirgeme kapasitesi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µ g/ml) fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvvetlerinin (FRAP) birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Doğal fenolik bileşik çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe³⁺) ferröz iyonlarına (Fe²⁺) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.3) her bir standart ve fenolik bileşik için 20 µ g/ml'ye karşı gelen absorbans değerleri Çizelge 4.1'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

20 µ g/ml konsantrasyonunda fenoliklerin ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılması : BHA > Apomorfin > Troloks > -Tokoferol > BHT > Timol > Hümkik asit. Ayrıca Çizelge 4.1'de yüksek absorbans değerleri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

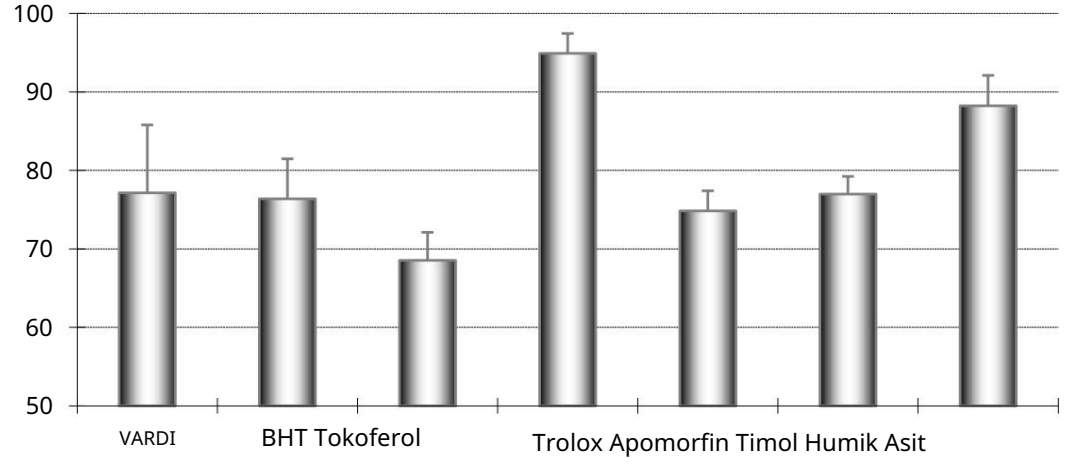
Çizelge 4.1. 20 µ g/ml konsantrasyonunda fenolik doğal bileşiklerin ferrik iyonları nı (Fe³⁺) ve kuprik (Cu²⁺) iyonları nı indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşı laştı rmaları

Antioksidanlar	Absorbanlar (700 nm)	Absorbanlar (593 nm)	Absorbanlar (450 nm)
VARDI	1.858	2.368	0,703
BHT	1.457	1.600	0,639
α-Tokoferol	1.026	1.963	0,489
Trolloc	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 Çelatlama aktivitesi bulguları

Fe²⁺ Çelatlama aktivitesi Re ve arkadaşları nı n belirlediği metoda göre yapı ldı . 0,25 ml FeSO₄ 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 antioksidanları n metal Çelatlama aktiviteleri bipiridil kullanı larak belirlendi. Bu tayinde konsantrasyona bağı lı bir artış gözlenmedi 30 µ g/ml konsantrasyonları na karşı lı k gelen metal Çelatlama yüzdeleri çekil 4.4"da verildi.



Şekil 4.4. Fenolik doğal bileşiklerin (30 µ g/ml) bipiridil reaktifi ile metal Çelmeleme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

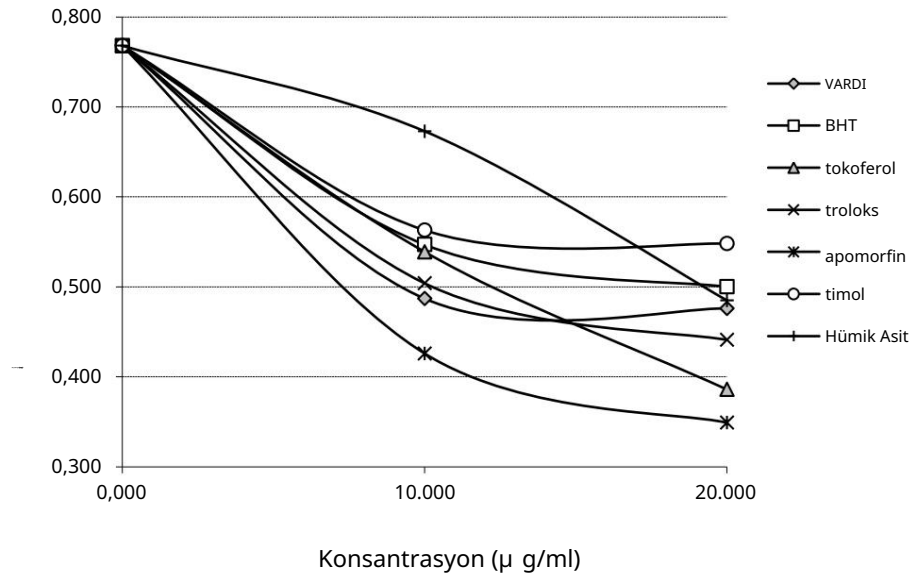
Aynı konsantrasyonda (30 µ g/ml) apomorfin, timol ve humik asitin ve kullanılan standart antioksidan moleküller bipiridil metal iyonlarını Çelmeleme aktivitelerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları α-Tokoferol > Apomorfin > BHT > Timol > BHA > Humik asit > Troloks şeklinde olduğu gözlemlendi.

4.1.5. Ferröz iyonları (Fe²⁺) Çelmeleme aktivitesi bulguları

Metal Çelmeleme aktivitesinde azalan absorbans ferrozin bağlanmadan önce metal iyonlarının Çelmeleme oranını gösterir. Çelmeleme metal iyonu miktarı aşağıda verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı.

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

Formülde verilen λ_{562-K} değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozin ve Fe²⁺ iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbans değeridir. λ_{562-N} ise su veya etanol ekstraktlarının ya da çalıda kullanılan standart antioksidanların absorbans değeridir (Gülçin et al. 2004b).



Şekil 4.5. Fenolik doğal bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki (10-20 µ g/ml) metal iyonlarını çelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Fenolik bileşiklerin metal iyonlarını çelatlama aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.5) her bir standart ve doğal fenolik bileşik için ayrı ayrı IC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik doğal bileşiklerin ferröz iyonlarını (Fe²⁺) çelatlama aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

Standartlar ve fenolik bileşikler	[IC50] (µ g/ml)
VARDI	24,57
BHT	28,87
α-Tokoferol	20,02
Trolloc	22,64
apomorfin	16,00
timol	35,17
Hümik Asit	29,09

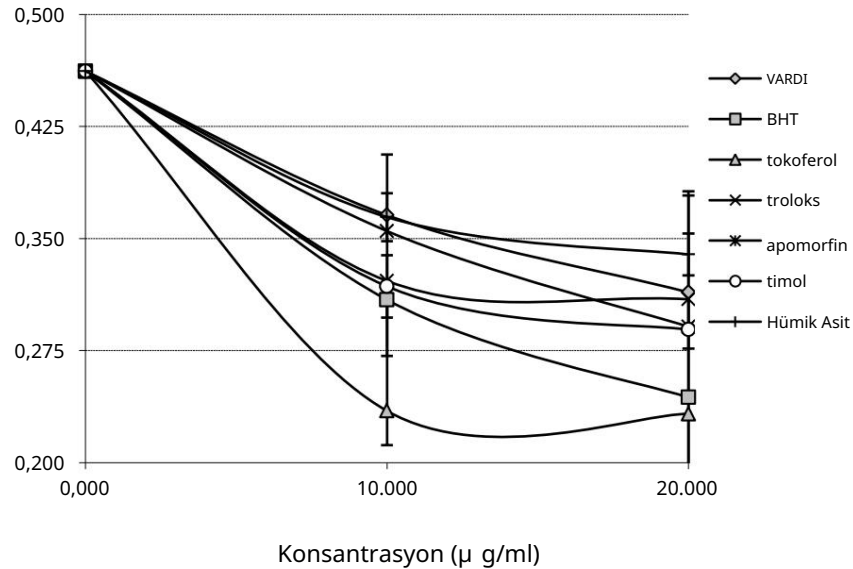
Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) çelatlama aktivitesi sergilediler: Apomorfin > -Tokoferol > α -Troloks > BHA > BHT > Hüyük asit > Timol.

4.1.6. Süperoksit radikal giderme aktivitesi bulguları

Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri riboflavin / metiyonin / ı Çı k metoduna göre yapıldı . Ortamdan giderilen süperoksit anyon radikalleri aÇağı da verilen denklemden yüzde olarak hesaplandı .

$$\text{O} \cdot \text{giderme aktivitesi (\%)} = \left(\frac{\lambda_{560-K} - \lambda_{560-K}^{\text{kontrol}}}{\lambda_{560-K}^{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

Formülde verilen λ_{560-K} kontrol nümunesinin absorbans değeridir. λ_{560-K} ise çalı Ğmada kullanılan antioksidan numunelerin absorbans değeridir (Gülçin et al. 2004b).



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

Fenolik bileşiklerin süperoksit radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 4.6) her bir standart ve fenolik için ayrı ayrı IC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşikler ve standart antioksidanların süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitelerinde IC50 değerleri

Antioksidanlar	[IC50] (µg/ml)
VARDİ	34,47
BHT	20,62
α-Tokoferol	16,90
Trolloc	29,74
apomorfin	29,11
timol	26,45
Hümk 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 > Hümk asit.

4.1.7. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

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

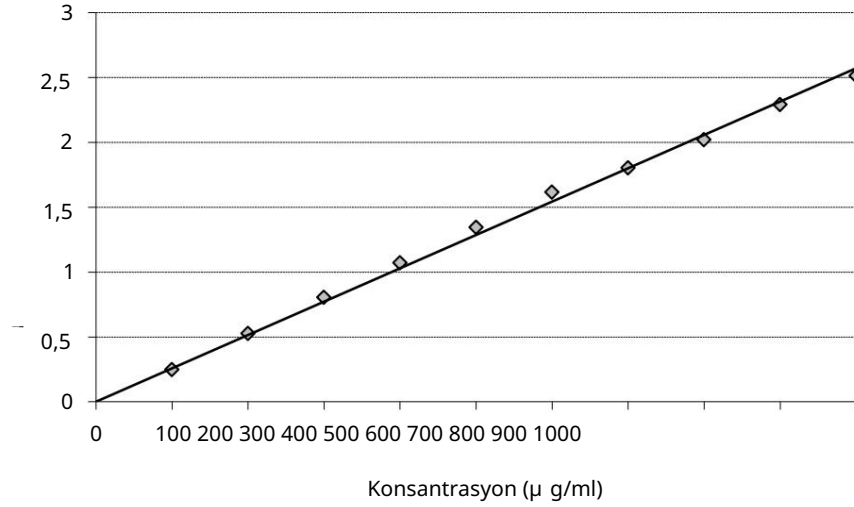
DPPH radikali giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan DPPH radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbanlar } (\lambda_{517\text{nm}}) \times 0,0026 \times [\text{DPPH}]$$

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar ağağı daki eğitliğe göre yapı ldı .

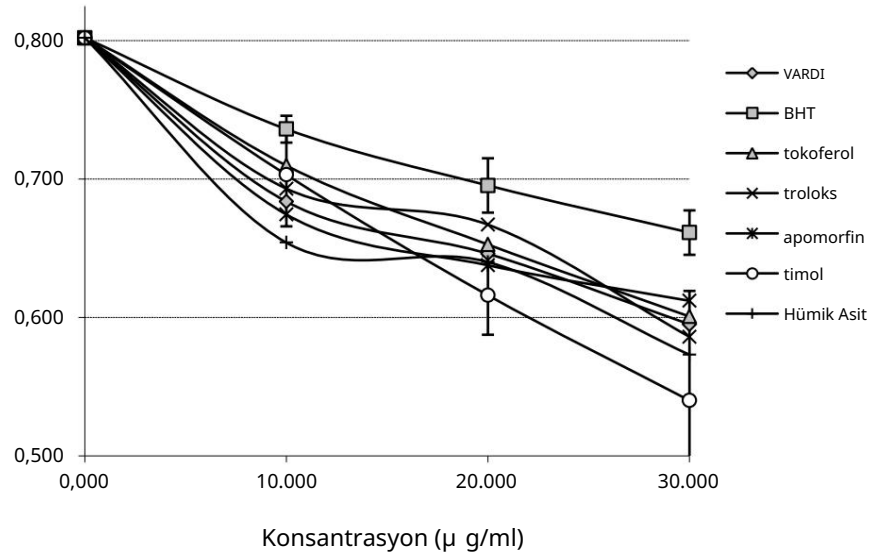
$$\text{DPPH giderme aktivitesi (\%)} = 1 - \left(\frac{\lambda_{517-N}}{\lambda_{517-K}} \right) \times 100$$

Burada λ_{517-N} DPPH radikal çöztisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbands değeri, λ_{517-K} ise sadece DPPH radikal çöztisi içeren kontrol değerin absorbands değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanı ldı .



Ėekil 4.7. DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazı rlanan standart DPPH grafiği

Fenolik bileğik çöztilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Ėekil 4.8' da görüldüğu gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



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

Fenolik bileşik çözeltilerinin DPPH radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil

4.8) her bir standart ve fenolik bileşik için ayrı ayrı IC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Fenolik bileşiklerin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

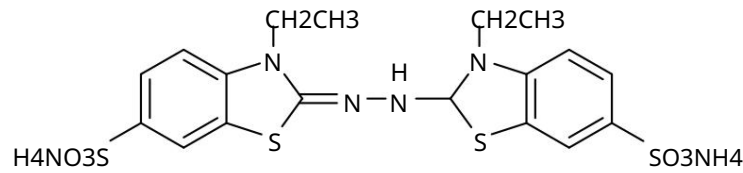
Antioksidanlar	[IC50] (µ g/ml)
VARDI	65,37
BHT	80,00
α-Tokoferol	69,30
Trolloc	66,63
apomorfin	67,28
timol	44,55
Hümik asit	58,23

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

4.1.8. ABTS serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi gibi ABTS^{•+} giderme aktivitesi de sulu karışımlarının, içeceklerin, ekstraların veya saf maddelerin radikal giderme aktivitelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Miller et al. 1996; Gülçin et al. 2007a). Bunun için öncelikle ABTS'den ABTS^{•+}'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 çözeltime 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, -tokoferol ve troloks gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS^{•+} giderme aktiviteleri tayini için öncelikle standart grafik oluşturuldu ($r^2: 0,9688$, şekil 4.10). ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan ABTS^{•+} miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda da verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbanlar } (\lambda_{734\text{nm}}) \times 0,001 \times [\text{ABTS}]^{*+}$$

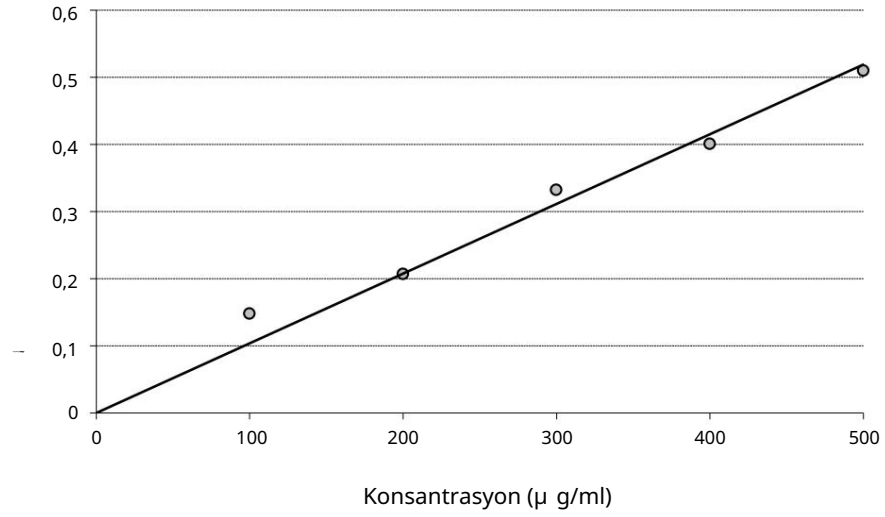
ABTS^{•+} giderme ile ilgili hesaplamalar aÇağı daki eÇitliğe göre yapı ldı .

$$\text{ABTS } \ddot{\text{G}}\text{iderme (\%)} 1- = \left(\frac{\lambda_{734\text{-N}}}{\lambda_{734\text{-bin}}} \right) \times 100$$

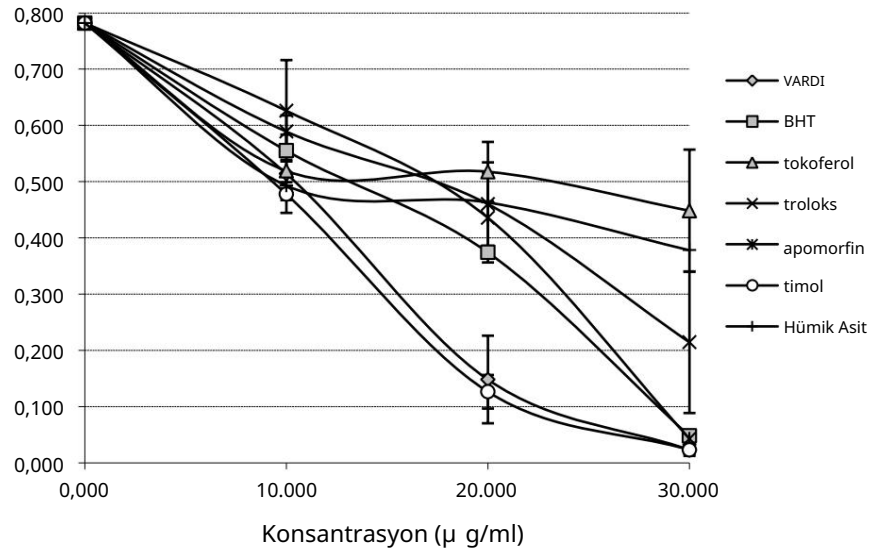
Burada $\lambda_{734\text{-N}}$ ABTS^{•+} çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri, ise sadece

$\lambda_{734\text{-K}}$ ABTS^{•+} zeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder.

Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks kullanıldı (Đekil 4.11).



Đekil 4.10. ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS^{•+} için hazı rlanan standart grafik



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin (10-30 µg/ml) ABTS•+ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Fenolik bileşik çözeltilerinin ABTS•+ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.11) herbir standart ve fenolik bileşik için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki fenolik bileşiklerin ABTS•+ giderme aktivitesinde IC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, -tokoferol ve troloks ile karşılaştırılmaları

Antioksidanlar	[IC ₅₀] (µ g/ml)
VARDI	14,37
BHT	16,85
α-Tokoferol	33,47
Trolloc	21,60
apomorfin	17,85
timol	14,06
Hümik asit	26,25

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

4.1.9. DMPD serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

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

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

$$\text{Absorbanlar } (\lambda_{505\text{nm}}) = 0.0008 \times [\text{DMPD}]^{\bullet+}$$

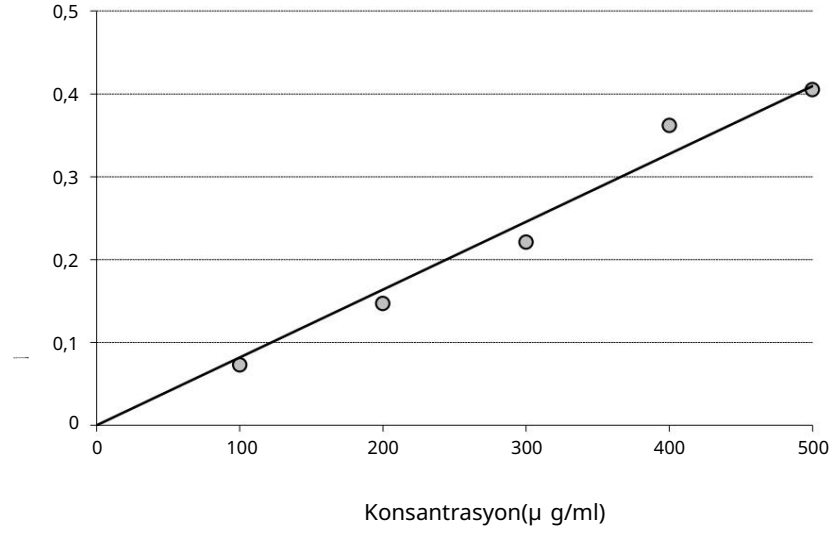
DMPD^{•+} miktarındaki azalma yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

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

Burada $\lambda_{505\text{-K}}$, DMPD^{•+} çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorban değeri, ise sadece

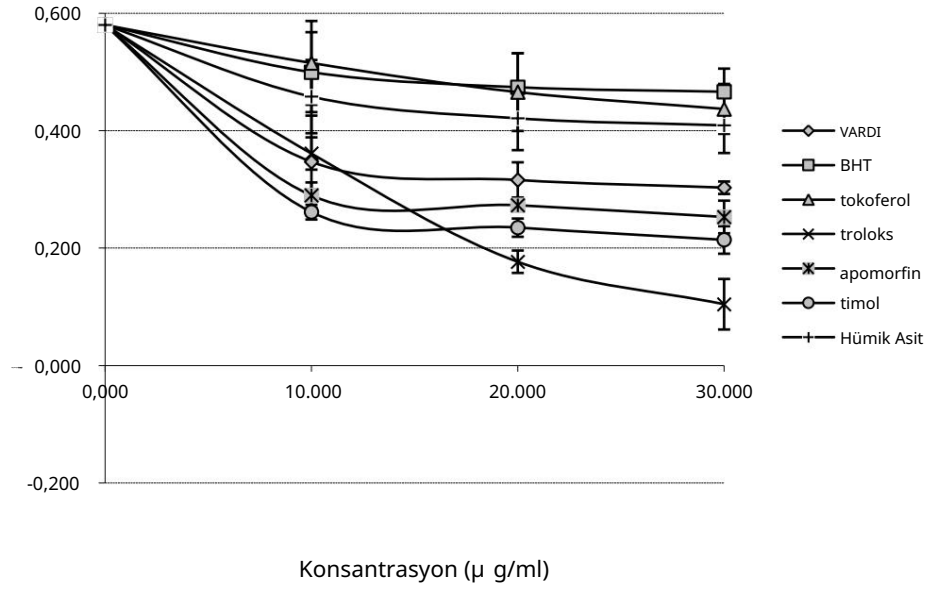
$\lambda_{505\text{-K}}$ DMPD^{•+} çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbanı'nı ifade eder.

Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı (şekil 4.13).



Şekil 4.12. DMPD•+ giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

Fenolik bileşik çözeltilerinin DMPD•+ 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•+ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması

Fenolik bileşiklerin DMPD•+ radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (ğekil 4.13)

her bir fenolik bileşik ve standart için ayrı ayrı IC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklerin DMPD•+ giderme aktivitelerinin IC50 değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA ve troloks ile karşılaştırılması

Antioksidanlar	[IC50] (µ g/ml)
VARDI	26,34
Trolloc	12,13
apomorfin	20,68
timol	17,32
Hümik asit	50,58

Fenolik bileşikler ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla Çizelgede DMPD•+ giderme aktivitesi sergilediler: Troloks > Timol > Apomorfin > BHA > Hümik asit.

Anlatılan antioksidan metotlarda grafiklerdeki üstel denklemler kullanılarak IC50 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 (Fe²⁺) ferrik iyonlarına (Fe³⁺) yükseltir. Daha sonra yükseltgenen ferrik iyonları (Fe³⁺) tiosiyanat (SCN⁻) ile Fe(SCN)₂⁺ kompleksi oluşur.

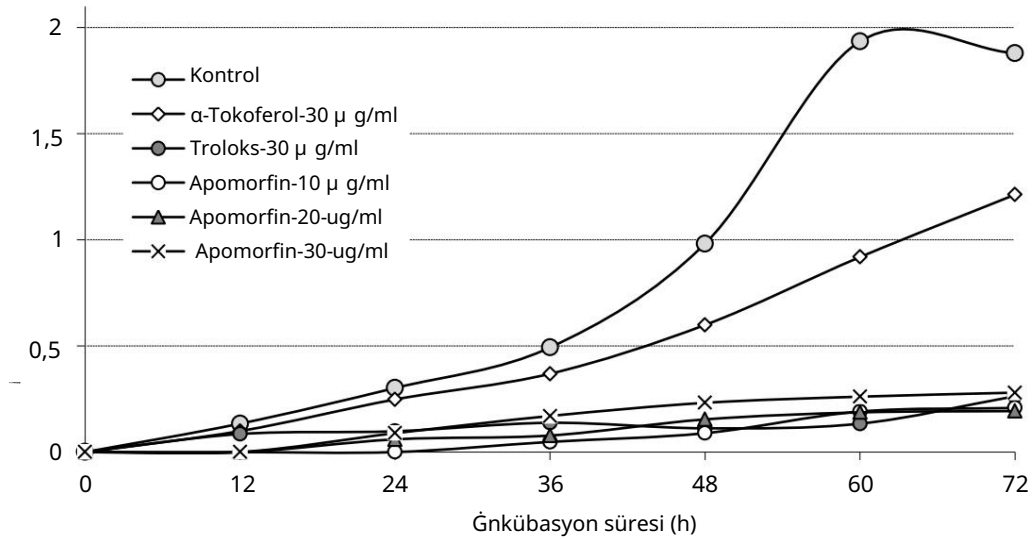
Oluşan bu kompleksin ise spektrofotometrik olarak 500 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Yüksek absorbans, peroksidasyon sonucu oluşan peroksit miktarını nifazlalığı gösterir. Total antioksidan aktivite her bir fenolik bileşik için 10-30 µg/ml konsantrasyonlarındaki emülsiyonunun etanoldeki çözeltisinin 500 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir (ğekil 4.14, 4.15, 4.16).

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

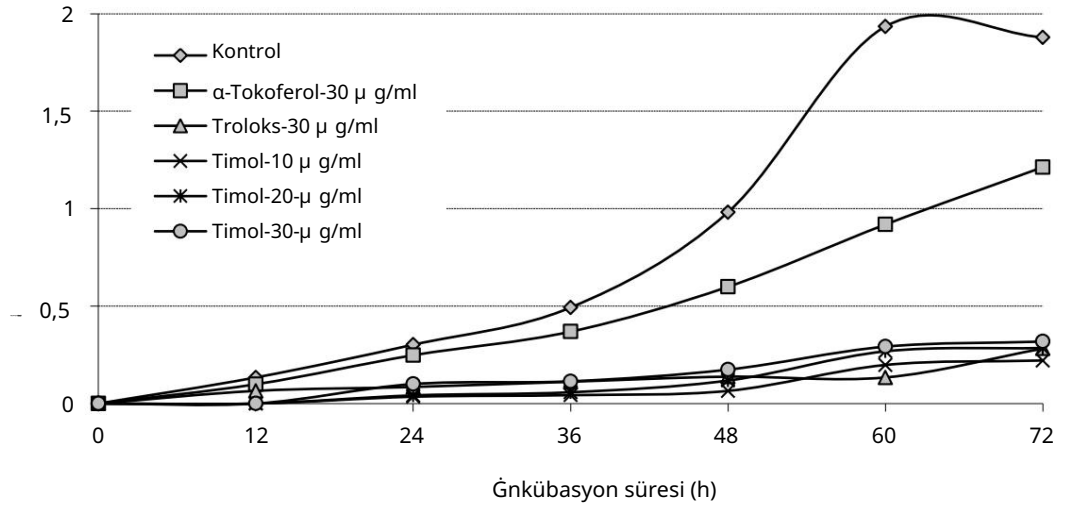
Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme miktarı yüzde olarak aşağıda verilen eşitlikten bulundu.

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

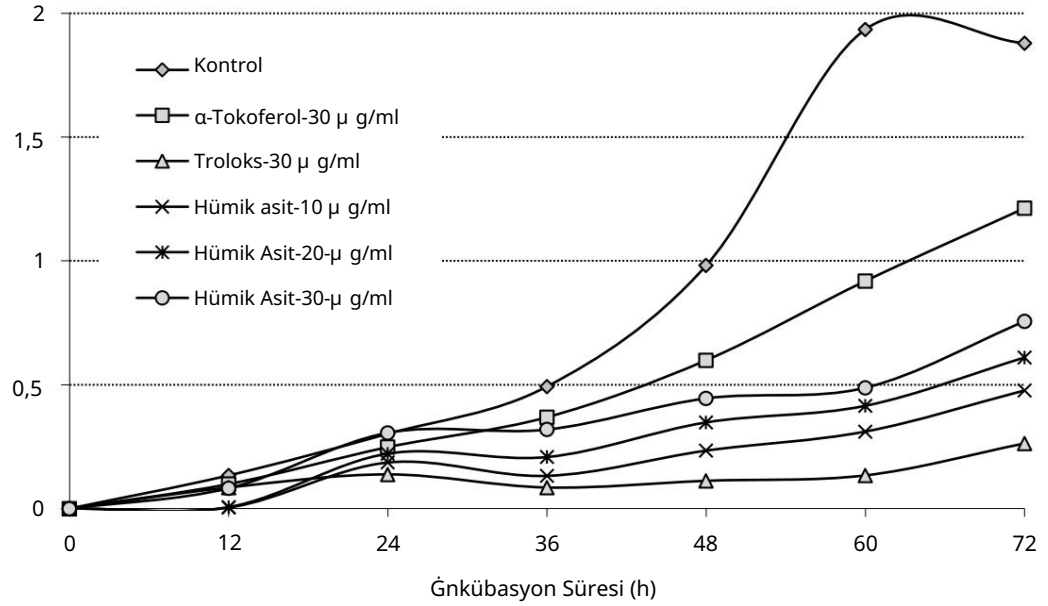
Burada λ_{500-N} , numune veya standart antioksidanların linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorpsiyon değeri, λ_{500-K} ise linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu için bulunan absorpsiyon değeri ifade eder. Pozitif kontrol olarak α tokoferol ve troloks kullanıldı.



ğekil 4.14. Apomorphinin (10-30 µg/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması



Şekil 4.15. Timolün (10- 30 µ g/ml) total antioksidan aktivitesinin aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olan α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırılması



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

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

Çizelge 4.7. Doğal fenolik bileşiklerin ve standart antioksidanların 30 µ g/ml ve 60. saate karşılıklı gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri

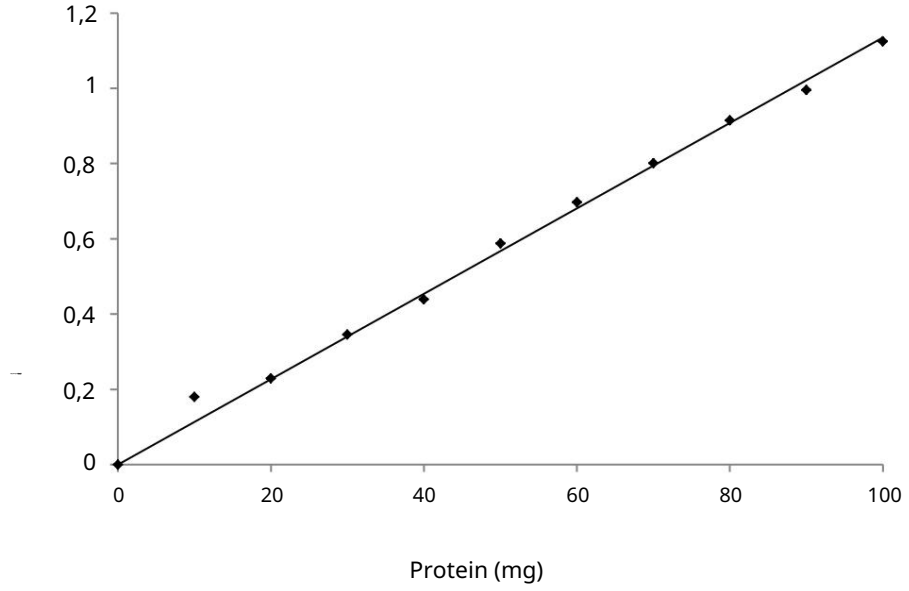
Antioksidanlar	% giderme (30 µ g/ml - 60 h)
α-Tokoferol	52,51
Trolloc	93,07
apomorfin	86,51
timol	84,90
Hümik asit	74,78

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 -tokoferol için %52,5 olarak bulunmuştur. Buna göre doğal fenolik bileşiklerin total antioksidan aktivite kapasitesi karşılıklı olarak sıralandı: Troloks > Apomorfin > Timol > Hümik asit > α-Tokoferol olarak belirlenmiştir.

4.2. Karbonik Anhidraz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

4.2.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart 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 ($r^2 : 0,996$).



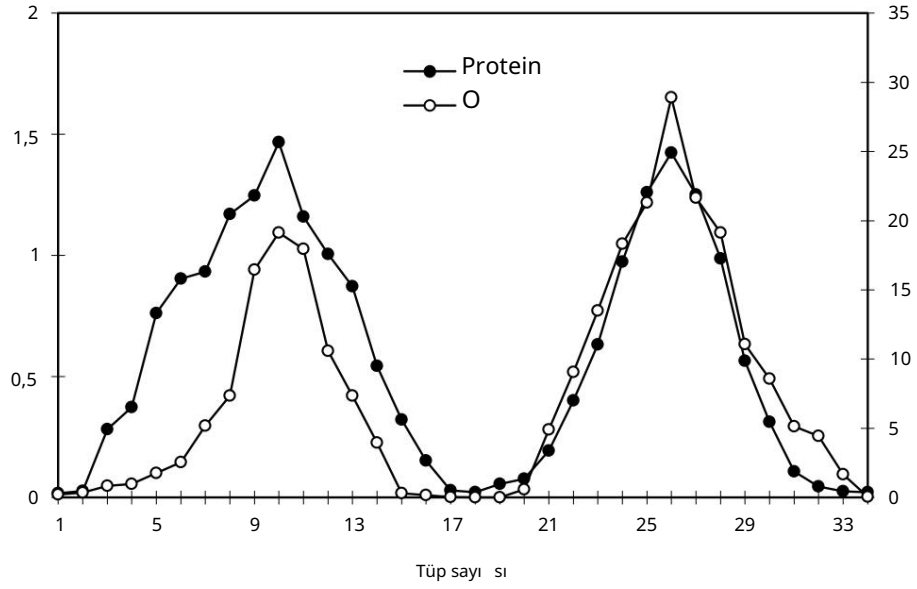
Şekil 4.17. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sı ğı r serum albümini kullanı larak hazı rlanan protein tayini için hazı rlanan standart grafik

4.2.2. hCA-I ve hCA-II Ğzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi Ğle SaflaĞtı rı lması

Sonuçları

Ğnsan eritrositlerinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaĞtı rı lması ayrı ayrı yapı ldı . Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmı Ğ olan hemolizat kolona yüklendi.

Kolondan önce 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH:6,3) tamponu geçirilerek hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayı cı yardı mı yla elüatlar 3'er ml halinde tüplere alı ndı ve 280 nm'deki absorbansları na bakı ldı . Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakı ldı . Çok sayı da yapı lan saflaĞtı rma iĞlemlerinden 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 Na₂HPO₄ pH:6,3 ve 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ pH:5,6 tamponları ile 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 ile Saflaştırma Basamakları Sonuçları

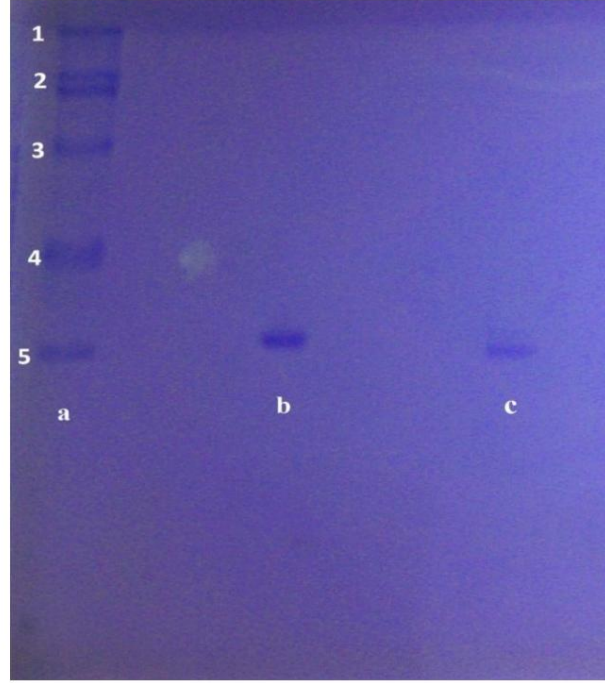
İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er ml numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre hemolizattan Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı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

Çizelge 4.8. Afinite kolonundan insan kanı ndan elde edilen enzim hemolizati nda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve hemolizattan saflaştırılması için hCA-I ve hCA-II enzimlerinin enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırılma sonuçları

Saflaştırılma Basamakları	Aktivite (AB/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (AB)	Aktivite özgülü (AB/mg)	Verim (%)	Saflaştırılma katsayısı
hemolize	144	30 23,55		706.5	4320	6.11	100	1
Sefaroz-4B								
L-tirozin	CA ben 428	6	0,36	2,16	2568	1188,9	59,4	194,5
sülfanilamit								
kolon afinitesi	CA II 712	4	0,14	0,56	2848	5085,7	65,9	832,4
senin kromatografi n								

4.2.4. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanı ndan elde edilen hemolizattan saflaştırılması için hCA-I ve hCA-II enzimlerinin saflığı nı kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamit jel elektroforezi daha önce anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül ağırlığı belli olan standart protein markörleri kullanıldı. SDS-poliakrilamit jel elektroforezine insandan saflaştırılması için izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarını n fotoğrafı çekildi (şekil 4.19).

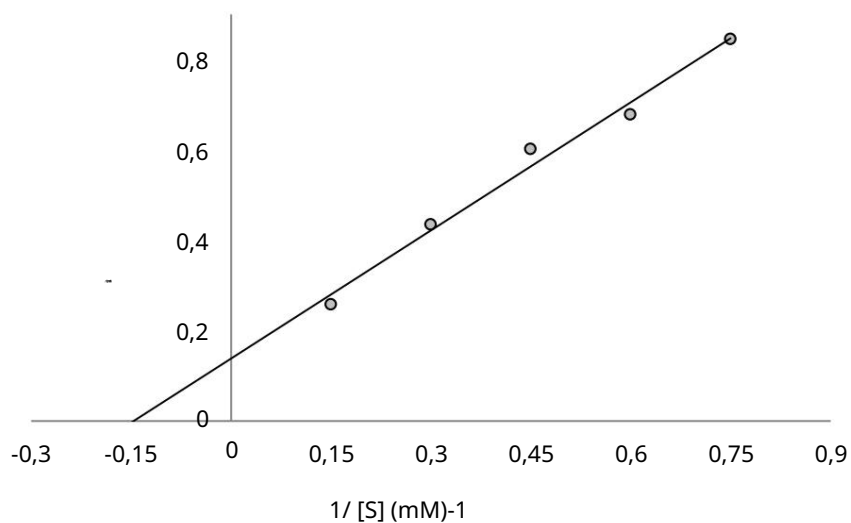


Şekil 4.19. Afinite kromatografisi ile saflaŞtı rı lan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı *a: Standart proteinler (1: 116 kDa β -Galaktozidaz (E. Coli), 2: 97 kDa fosforilaz (tavÇan kası), 3: 66 kDa Albumin (sı ğı r), 4: 45kDa Albumin (Ovalbumin), 5: 29 kDa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

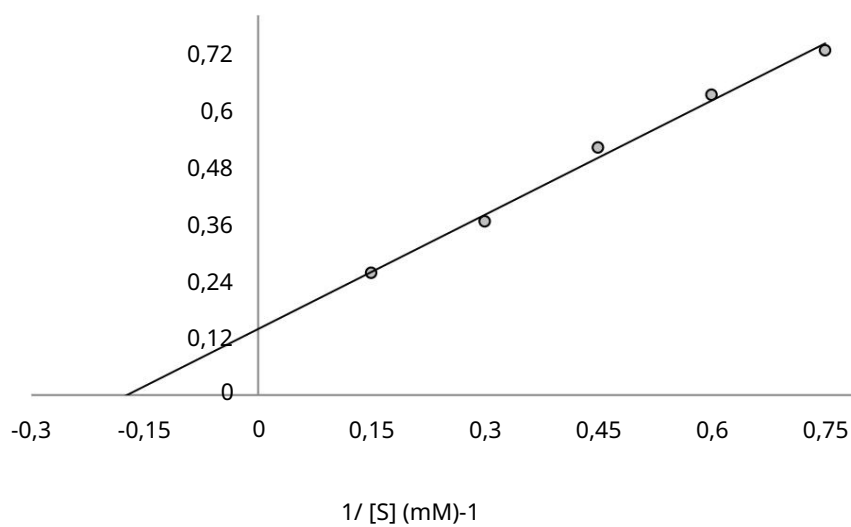
4.2.5. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri ile ilgili yapı lan kinetik çalı Şmaları n sonuçları

4.2.5.a. Enzim için Km ve Vmax değerlerinin bulunması ile ilgili çalı Şmaları n sonuçları

İnsan kanı ndan saflaŞtı rı lan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi için enaz 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanı larak optimum Çartlarda aktivite ölçümü yapı ldı . Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek ve bu grafiklerden her bir izoenzim için Km ve Vmax değerleri hesaplandı (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21).



Şekil 4.20. İnsan eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.21. İnsan eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen hCA-II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

İnsan eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen 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 çalışmanın sonuçları

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

Doğru substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-I izoenzimi için 3 farklı fenolik asitin, saflaştırılarak 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 (I50 değerleri) hesaplandı.

Şekil 4.21'den elde edilen $y=100e^{-5,36x}$ denkleminde hümik asit için I50 değerinin nasıl bulunduğunu hesaplırsak;

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

y yerine I50'yi ifade eden %50'yi koyulursa; $50 = 100e^{-5,36[Hümik Asit]}$

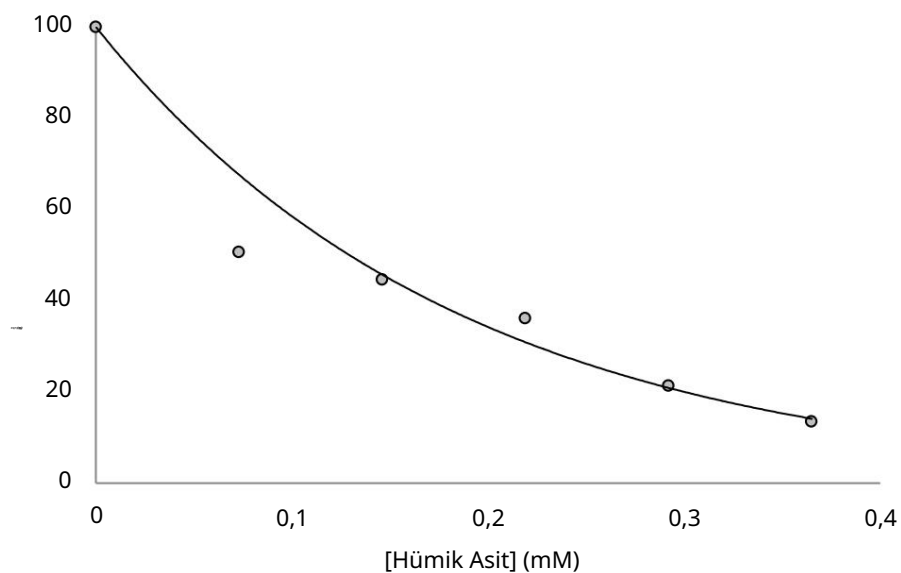
$50 = 100e^{-5,36[Hümik asit]}$ (Eşitliğin her iki tarafı da 100'e bölünür ve ln logaritması alınır)

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

$-5,36[Hümik asit] = -0,684$

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

Hümik asit için I50=0,127 mM olarak bulunur.

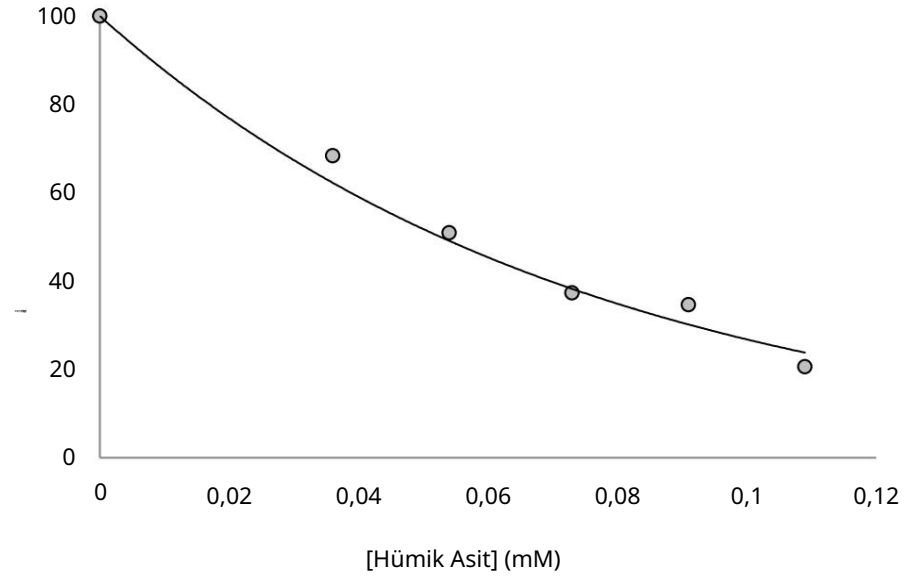


Şekil 4.22. hCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda I50 değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği

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

Doğun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-II izoenzimi için 3 farklı doğal fenolik bileşiğin, saflağtırılı olan 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 (I50 değerleri) hesaplandı .



Şekil 4.23. hCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda I50 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

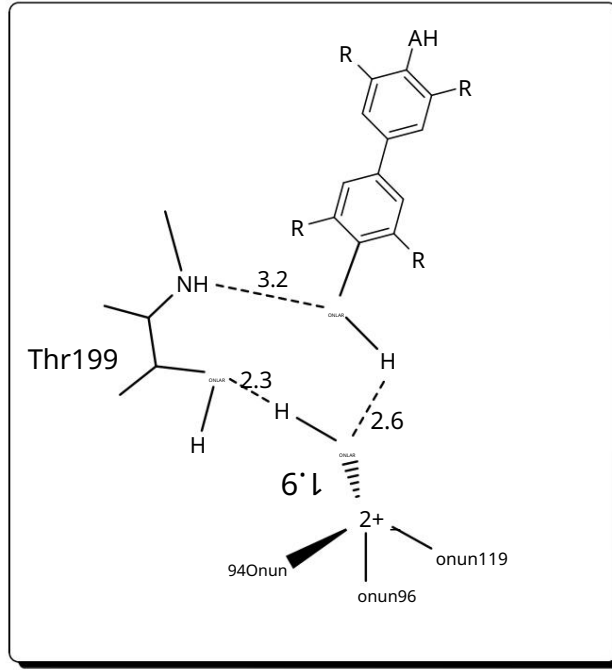
% Aktivite-[I] grafikleri çizilen her bir fenolik bileşiğin daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (I50 değerleri) hesaplandı. Tüm verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için bu değerler bir tablo halinde gösterildi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (I50 değerleri)

[ben] (mM)	Hümik asit
[I50] hCA-I	0,127
[I50] hCA-II	0,052

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

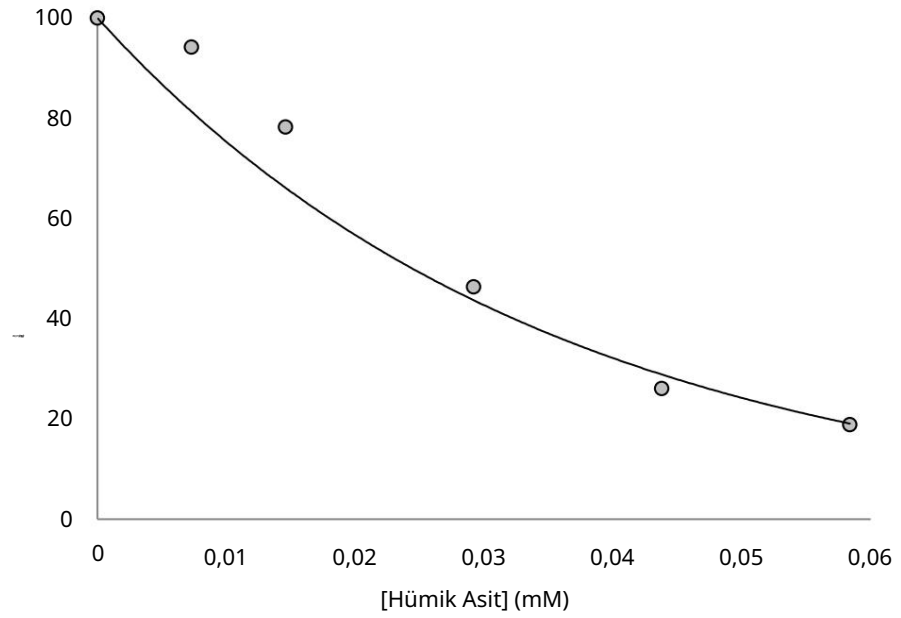
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna hidroksil ve metoksi grupları nı n iyonik etkileşimle veya direk bağlanarak inhibisyon gösterdiği sanılmaktadır. İnhibitörlerin bağlanma modeli aşağıdaki gibi önerilmiştir (Gentürk et al. 2009).



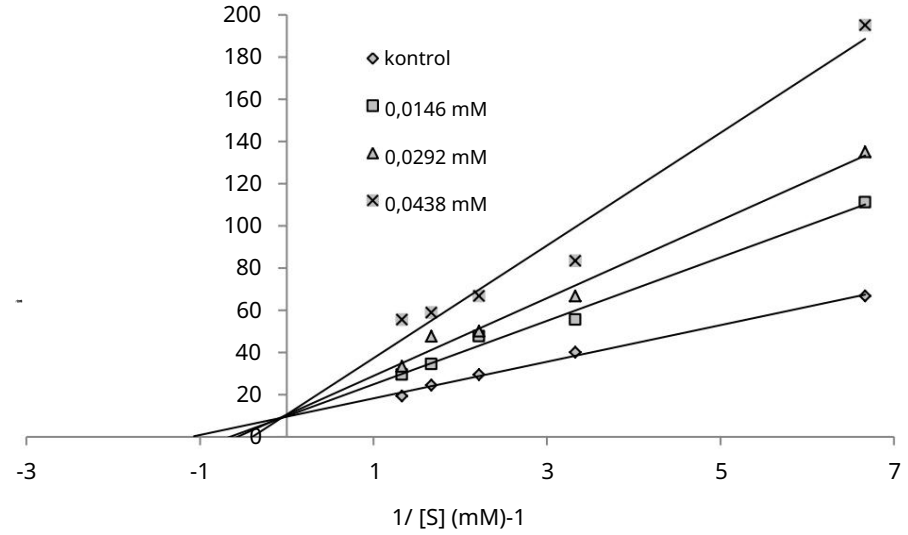
Şekil 4.24. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} iyonuna fenolik antioksidan inhibitörlerin bağlanma modeli

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

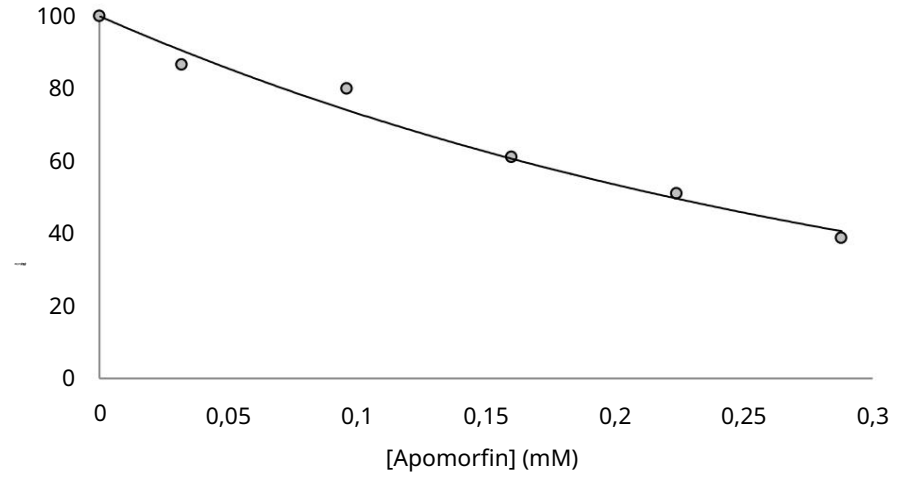
Doğru substrat konsantrasyonunda insan eritrosit hCA-I izoenzimi için 3 farklı doğal fenolik bileşiğin, saflaştırılan hCA-I izoenzimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik için aktivite(%)-[I] ve K_i grafikleri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



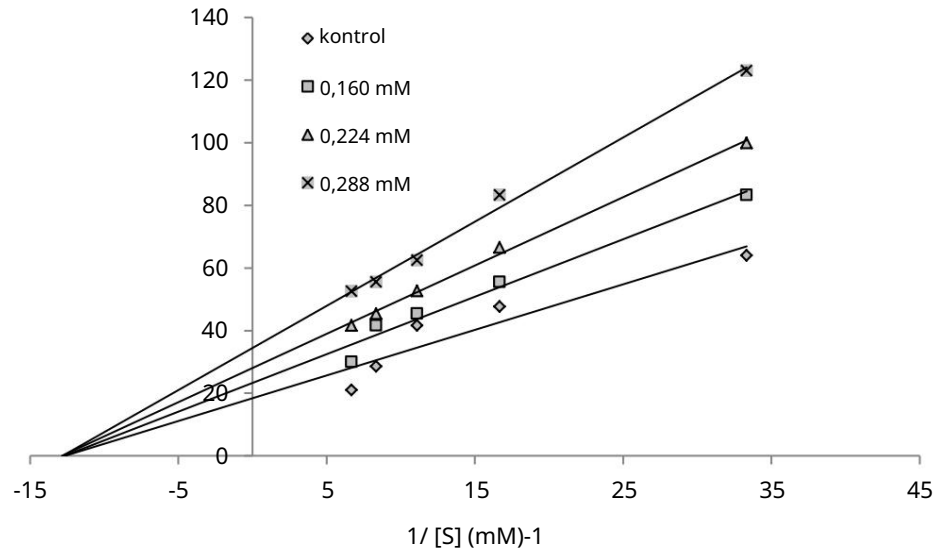
Şekil 4.25. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalıştırılarak 5 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği



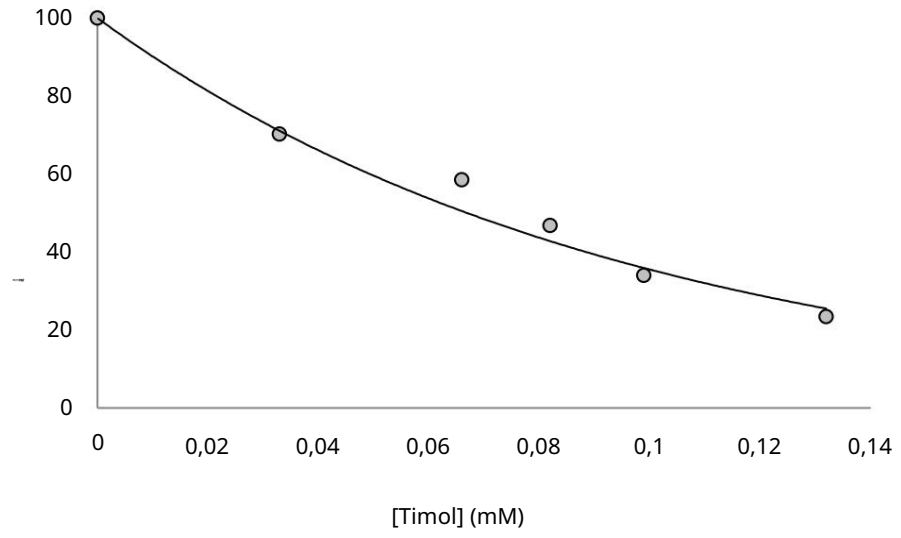
Şekil 4.26. hCA-I izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



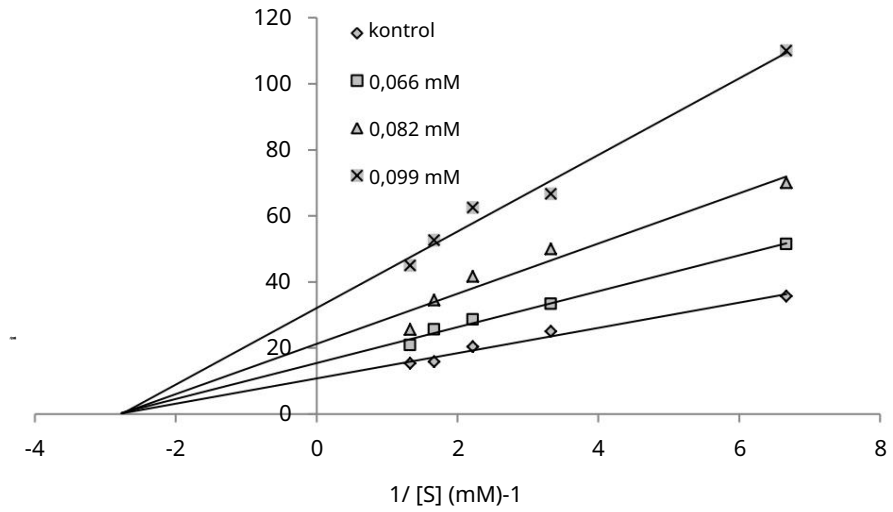
Şekil 4.27. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalıştırılarak elde edilen 5 farklı apomorfin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) - [Apomorfin] grafiği



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



Şekil 4.29. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalıştırılan 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

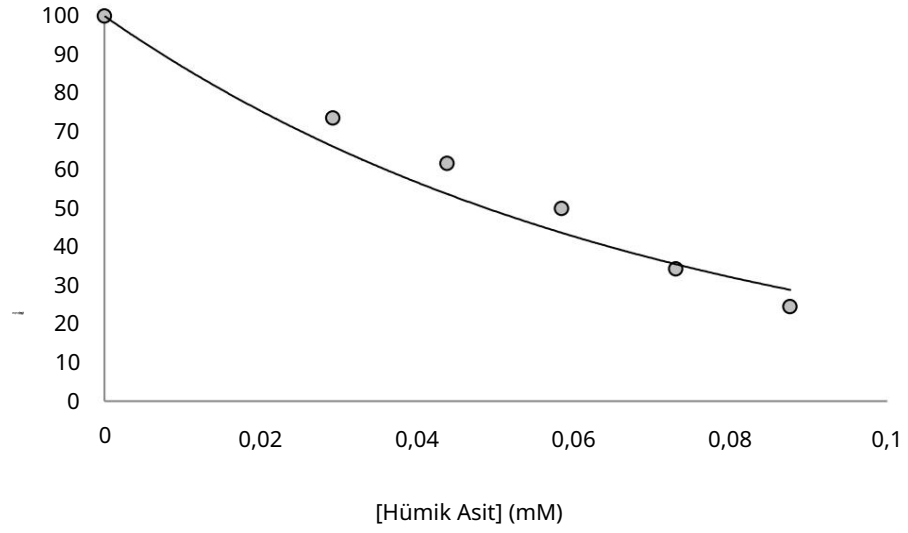
Çizelge 4.10. hCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren fenolik bileşiklerin Ki değerleri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	I ₅₀ (mM)	[I] (mM)	Ki değerleri	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon türü	
Hümkik asit	0,024		0,015	0,022	0,0205±0,005	Yarı Şmalı
			0,029	0,015		
			0,044	0,024		
apomorfin	0,219		0,160	0,611	0,457±0,142	Yarı Şması z
			0,224	0,430		
			0,288	0,331		
timol	0,066		0,066	0,154	0,096±0,053	Yarı Şması z
			0,082	0,085		
			0,099	0,050		

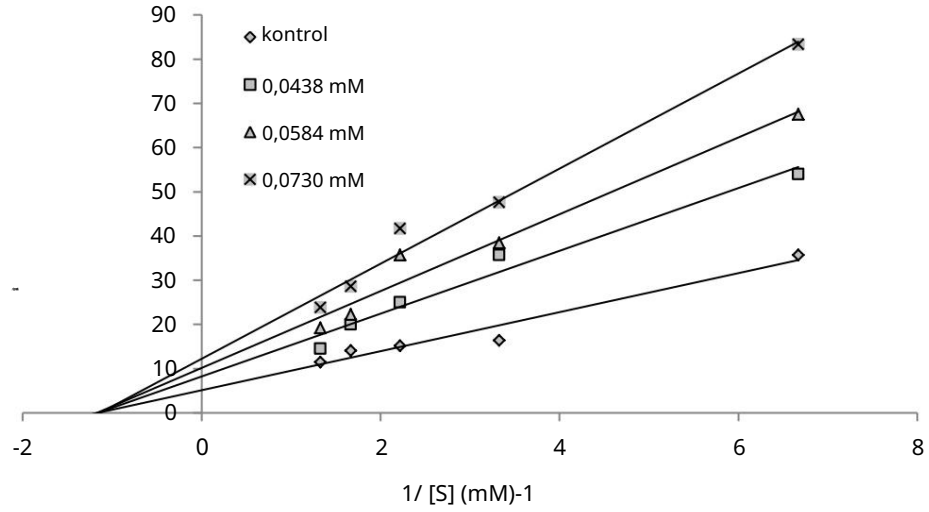
4.2.6.e. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal fenolik bileşiklerle ilgili sonuçları

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

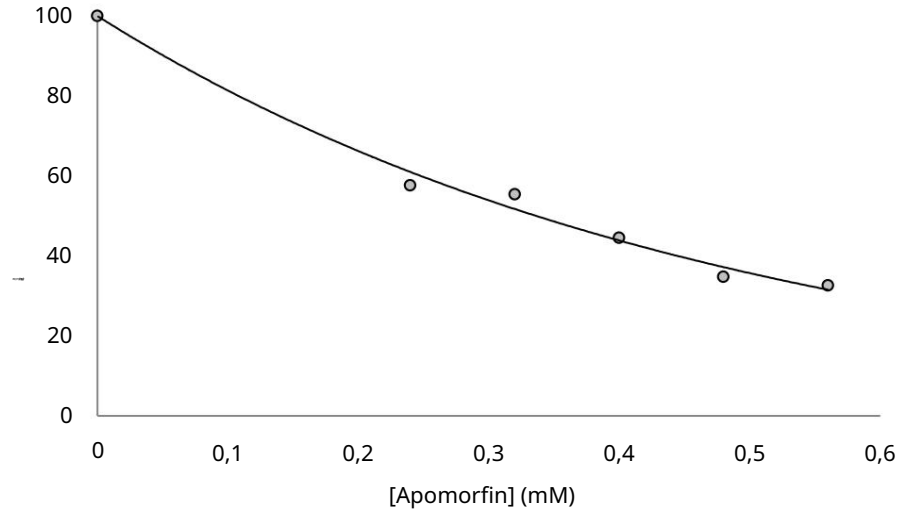
Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemleriyle yapıldı . İnhibisyon etkisi gösteren her bir fenolik bileşik için aktivite (%)-[I] ve Ki grafikleri çizildi. Ve çizilen grafiklerden her bir fenolik bileşik için Ki değerleri hesaplandı .



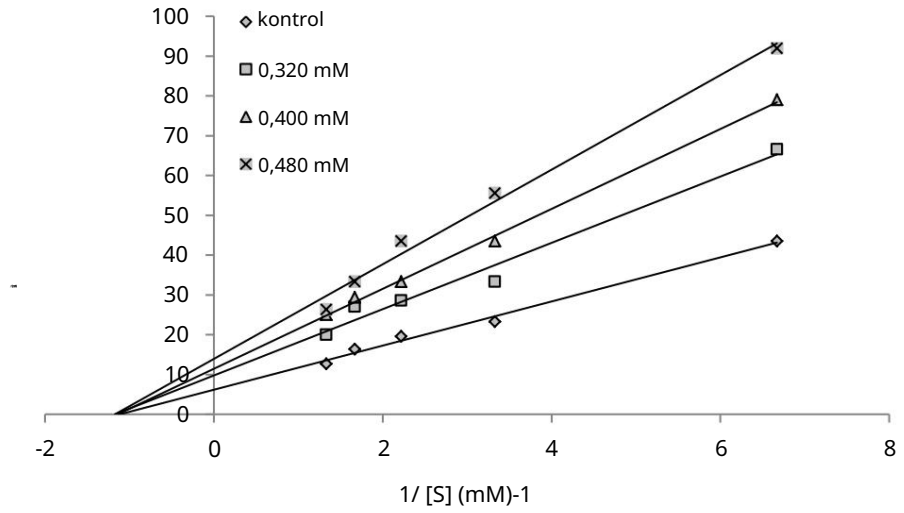
Şekil 4.31. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalıştırılarak elde edilen 5 farklı hümitik asit konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Hümik asit] grafiği



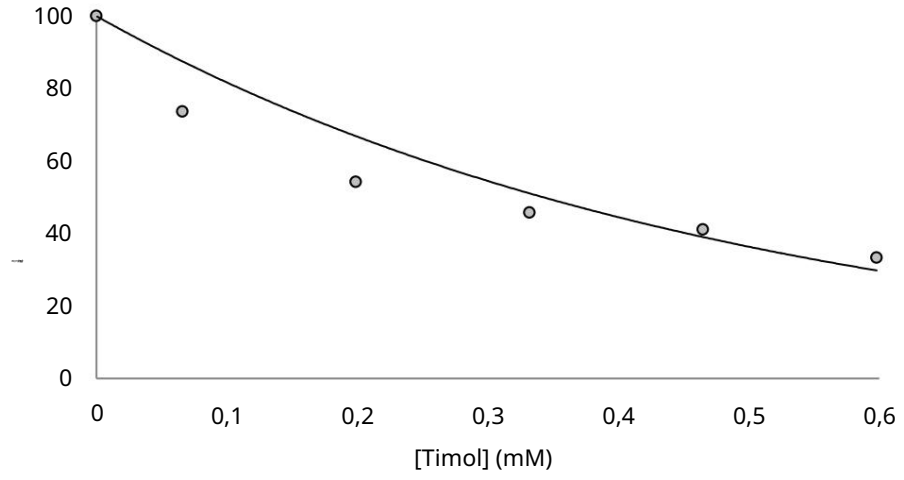
Şekil 4.32. hCA-II izoenzimi kullanılarak elde edilen 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı hümitik asit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



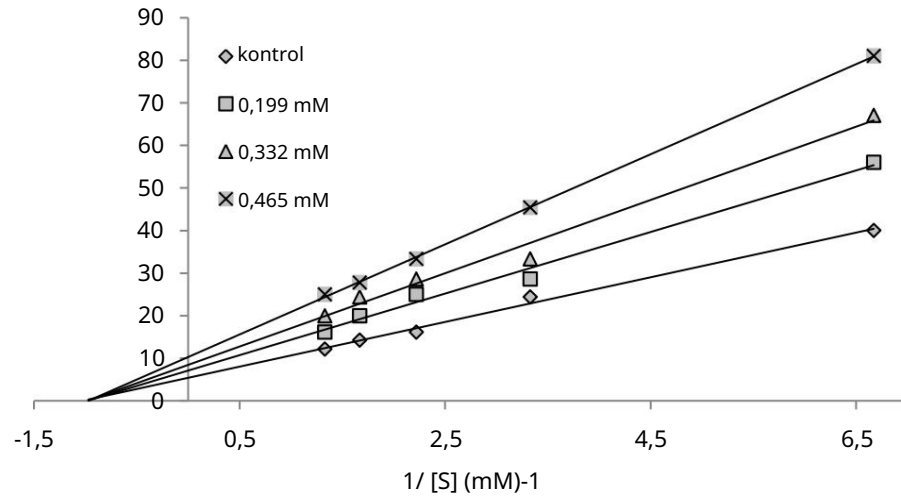
Şekil 4.33. hCA-II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan 5 farklı apomorphin konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[Apomorphin] grafiği



Şekil 4.34. hCA-II izoenzimi kullanılarak 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı apomorphin 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 Ki değerleri ve inhibisyon türleri

İnhibitör	^{ben50} (mM)	^[BEN] (mM)	Ki değerleri	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon türü
Hümkik asit	0,056	0,0438	0,072	0,061±0,010	Yarı İmsası z
		0,0584	0,059		
		0,0730	0,052		
apomorfin	0,331	0,320	0,556	0,468±0,087	Yarı İmsası z
		0,400	0,468		
		0,480	0,382		
timol	0,338	0,199	0,642	0,584±0,062	Yarı İmsası z
		0,332	0,592		
		0,465	0,518		

5. TARTIĞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan araştırmalar apomorfin, timol ve hümik asitin Çelatlama 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 çalışmada kapsamı içinde bu doğal fenolik bileşiklerin antioksidan ve antiradikal özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarıyla, tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite, Fe³⁺ -Fe²⁺ transformasyonu metoduna göre indirgeme kapasitesi, kuprak metoduna göre Cu²⁺ -Cu⁺ indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre Fe³⁺ -TPTZ indirgeme kapasitesi, ferröz iyonları nı (Fe²⁺) Çelatlama aktivitesi, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS^{•+} + giderme aktivitesi, DMPD^{•+} + giderme aktivitesi, riboflavin-metiyonin-ı Çık 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 farmakoloji sanayinde yaygın olarak kullanılan BHA, BHT, α-tokoferol ve α-tokoferolün suda çözünen analogu olan troloks gibi sentetik ve standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı. Zhu ve arkadaşları nın 2002 de yaptıkları çalışmalarıda çeğitli kronik hastalıkları n ve gelişiminde ortaya çıkan sorunları n 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 Çelatlamalarda, DPPH ve ABTS giderme aktivitelerinde de artış gözlenmiştir. Ancak ferröz iyonları nı (Fe²⁺) Çelatlama aktivitesi ve DMPD ile süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde ise konsantrasyon ile pozitif bir korelasyon gözlenmedi.

Antioksidan ve antiradikal çalışmaları nı n mukayesesinde BHA, BHT, -tokoferol ve troloks gibi standart maddeler kullanıldı . Bazı antioksidan analizlerde apomorfin, timol ve hümkik asit aktivitelerinin kullanı lan standartları n aynı konsantrasyonlardaki aktivitelerinden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

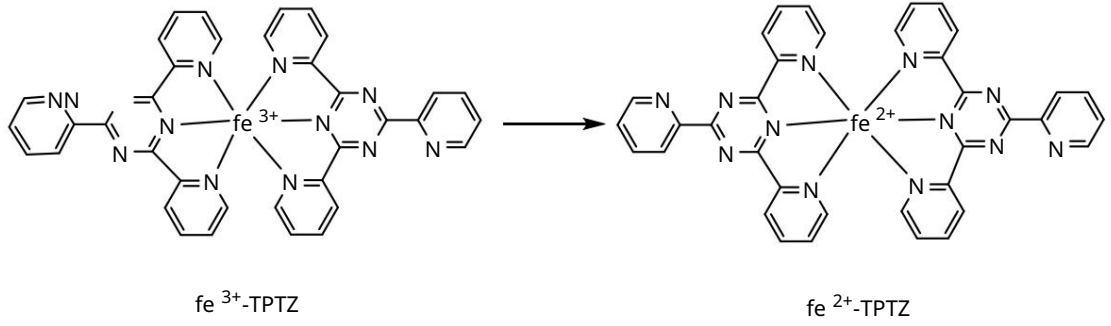
Doğal fenolik bileşiklerin toplam antioksidan özellikleri ile indirgeme kapasiteleri arası nda korelasyonun olduğu görölmektedir. Fenolik bileşikler özellikle flavonoitler hidroksil grupları nda bulunan hidrojenlerini kolaylı kla verebilirler. Çünkü fenolik bileşiklerdeki oksijen ile hidrojen arası ndaki bağ, oluşacak fenol radikalinin rezonans kararlı lı ğı ndan dolayı kolaylı kla homolitik olarak parçalanabilir ve böylece üzerinde bir tane elektron bulunduran hidrojen kolaylı kla verilebilir.

Bir kimyasalı n indirgenmesi, elektron kazanı mı olarak tanı mlanmaktadır . Oksidasyon ise elektron kaybı olarak tanı mlanır . Bir indirgeyici ajan elektron veren ve böylece diğer bir reaktantı n indirgenmesine neden olan bir maddedir. Bir oksidan ve bir oksitleyici ajan ise elektronları kabul eden ve diğer bir reaktantı n yükseltgenmesine neden olur. Oksidasyon, sistemde bağka bir yerde indirgenme olmadan mümkün değildir. Kimyasal reaksiyonu karakterize eden bu indirgenme, yükseltgenme olayları na redoks reaksiyonları adı verilmektedir. Redoks reaksiyonları biyolojik oksidasyonları n temel reaksiyonudur ve kimyasal zincir reaksiyonları sayesinde havadan aldı ğı mı z oksijenle besinlerin yı kı mı ndan oluşan kimyasalları okside ederek canlı sistemler için enerji sağlamaktayı z. Ayrıca, antioksidanlar, pro-oksidanları n etkilerini önemli ölçüde azaltı rken Fe³⁺'yı indirgemeyebilir. Bir antioksidan bir indirgeyicidir fakat her indirgeyici bir antioksidan olmak zorunda değildir (Prior and Cao 1999). Bir çok çalı şmada bildirildiği gibi, hastalı kları etkileyen doğal antioksidan aktiviteleri patojenik bakteriyel gelişimi inhibisyonu, mutasyonlar, kanser oluşumu ve DNA hasarı nı n engellenmesi gibi yeteneğe sahip olmasıyla yakı ndan ilişkilidir (Roginsky and Lissi 2005). Fenolik doğal bileşiklerin indirgeme kapasitelerinin artan konsantrasyona bağlı olarak arttı ğı gözlemlendi. 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 geçiğ metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileğinin indirgeme gücü antioksidan özellik yönünden önemli değildir. Ama bileğinin sadece metal çözümlenme 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 geçiğ metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock 1997; Mavi 2005).

İndirgeme çalışmaları arasında 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+} -(TPTZ)₂] kompleksine [Fe^{2+} -(TPTZ)₂]⁺un mavi renkli ferröz Fe^{2+} indirgeyebilen antioksidanları ölçmekte kullanılır (Benzie and Strain 1996, 1999). Bu metod 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) antioksidanlarının belirlenmesi için uyarlanmıştır ve kullanılmaktadır.

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).



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

FRAP, asidik pH:3,6 'da demir çözünlüğünü 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 aktarımı yerine bir total elektron aktarımıdır, bu nedenle diğer metotlarla kombinasyonu, farklı antioksidanlarla ayrırt 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, absorpsiyon kafeik asit, tannik asit, ferulik asit, askorbik asit ve kuersetin gibi polifenoller için oldukça yavaş bir şekilde artar. Bundan dolayı tek bir nokta absorpsiyonu sonlanması, tamamlanmış bir reaksiyonu temsil etmeyebilir (Prior et al. 2005).

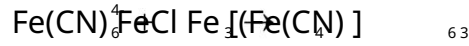
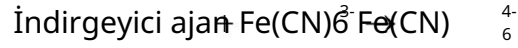
Kendisiyle ilişkileriyle ilgili olarak redoks potansiyeli Fe^{3+}/Fe^{2+} redoks çiftinden daha düşük olan herhangi bir bileşik, FRAP değerlerine ve hatalı yüksek sonuçlarının azaltılmasına katkıda bulunmak için Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ya indirgeyebilir. Öte taraftan bütün antioksidanlar gözlem süresi içinde 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 reaksiyonları 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 bileşiklerini kıma 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 iyonlarını (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 abartılması engelleyebilir. Örneğin, Benzie ve Strain'in 1999'da bilirubin için aldığı bir FRAP değeri bildirmişlerdir, çünkü bilirubin, 593 nm'de oldukça absorbe olan biliverdine okside olmuştur. Aynı zamanda bu metod 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).

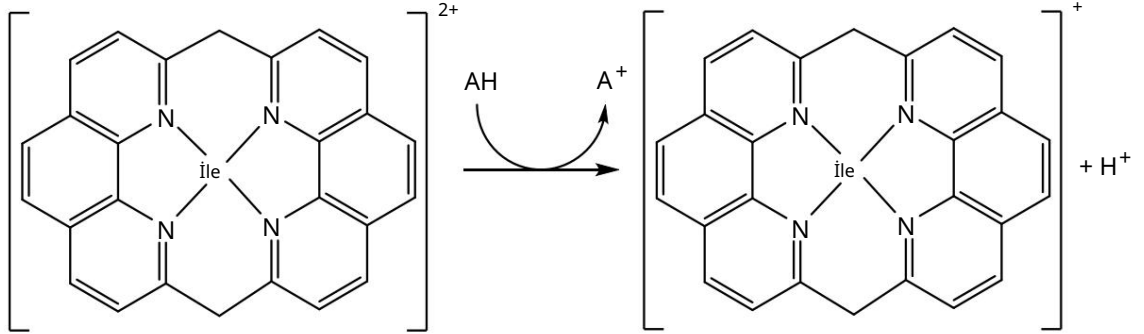
Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenmesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileğin indirgeme kapasitesi nin $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{2-}$ ye $\text{Fe}[(\text{CN})_6]^{3-}$ indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe^{3+} ün ilavesi, 700 nm'de güçlü absorbanza sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ oluşumuna yol açar. Absorbansdaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artış ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir.



63

Bu analizde test çözeltilisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil ve mavi tonlarına dönüşür. Bir bileğin 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 araştırılmıştır.

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 hidrofiliğine 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 kullanılabılır (Huang ve diğerleri 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). Yapı lan çalı Ğmalarda fenolik doğal moleküllerin her iki indirgeme metodu arası nda bir korelasyon gözlemlendi ve artan konsantrasyona bağılı olarak indirgeme kapasitelerinde de artı Ğ gözlenmektedir (Çizelge 5.1).

Her iki metotta kullanı lan 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.

Kullanı lan fenolik doğal bileşiklerin içerisinde en yüksek ferrik iyonları nı (Fe^{3+}) ferröz iyonları na (Fe^{2+}) ve kuprik iyonları nı (Cu^{2+}) kupröz iyonları na (Cu^+) indirgeme apomorfinde gözlemlendi. Bunun sebebi ise moleküle bakı ldı Ğı nda her bir apomorfin molekülünde aromatik halkaya bağılı 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. Çalı Ğmada kullanı lan fenolik doğal bileğiklerin 20 µ g/ml konsantrasyonunda ferrik iyonları nı (Fe³⁺) ve kuprik iyonları nı (Cu²⁺) indirgeme kapasiteleri

Antioksidanlar	Absorbanlar (700 mil)	Absorbanlar (593 deniz mili)	Absorbanlar (450 mil)
VARDI	1.858*	2.368*	0,703
BHT	1.457	1.600*	0,639
α-Tokoferol	1.026	1.963*	0,489
Trolloc	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 çalı Ğı lmı Ğtı r.

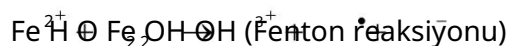
In vivo olarak serbest demir ve bakı rı n varlı Ğı kontrol edilebilmektedir. Demir iyonları barsaklar tarafı ndan emilir ve transferin proteinleri tarafı ndan ferrik iyonları (Fe³⁺) formunda demir ihtiyacı olan hücrelere taÇı nı r ve ferröz iyonları (Fe²⁺) Ğeklinde ferritin ve hemosferin proteinlerinde depolanı r. Spesifik olarak transferine bağlı olan demir iyonları serbest radikal reaksiyonları na katı lmazlar. Fazla olan demir iyonları ise birer "demir havuzu" olan ferritin ve hemosferinde depolanı rlar. Ğnsan plazması nda bulunan bakı rı n büyük bir kı smı serbest radikal reaksiyonları nı uyarmayan bir formda olup, seruloplazmin proteinine bağlı haldedir (Halliwell 1994). Bazı hemostatik durumlar değiğtiğinde hidroksil radikali oluğur (Chevion et al. 1993).

Doku hasarları sonucu fagositlerin aktivasyonu veya liziz olmuğ hücrelerden geğiğ metal iyonları nı n yayı lması sonucu serbest oksijen türleri oluğabilmektedir. Bu durum hücre ve dolayısı yla doku hasarı nı daha da hı zlandı rı r. Örneğin travmatik beyin hasarı sonucu demir iyonları na bağlı serbest radikalik reaksiyonlar meydana gelebilir. Parkinson hastalı Ğı , beyinde substantia nigra'da mevcut hücrelerin ölü mü sonucu meydana gelmektedir. Demir iyonları ölü hücrelerin parçalanması sonucu açı Ğa çı kmaktadır. Böylece Parkinson hastalı Ğı na yakalanan hastalar oksidatif strese maruz kalı r.

Bu durumda serbest radikalik reaksiyonlar muhtemelen substantia nigra'nın dejenerasyonuna katkı da bulunmaktadır. Bunun yanı sıra serbest oksijen radikalleri, enzim ve proteinlerin yapıları nda 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).

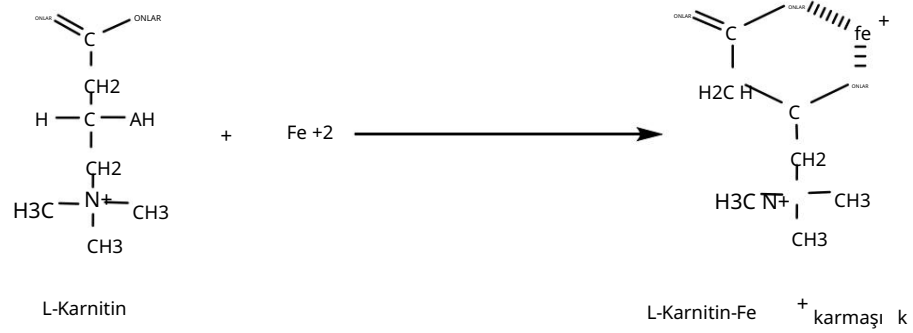
Ferröz (Fe^{2+}) iyonu gibi iyonik türler, organizmada ROS üretimini kolaylaştırır. İçin, demir Çelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları Çelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıkı sıkı kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Demir organizmalar için esansiyel bir mineraldir, fakat aşırı miktar 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).



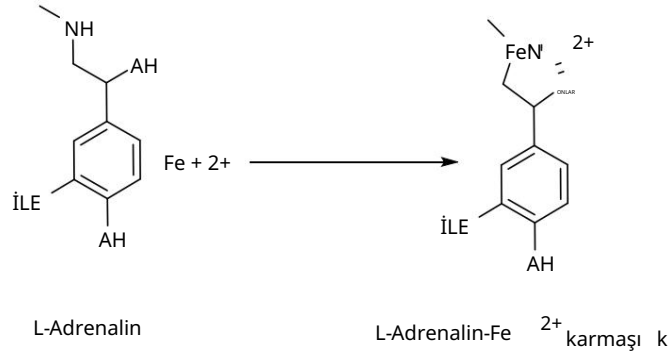
Böylece ferröz iyonları (Fe^{2+}) Çelatlama kapasitesi ferröz iyonları (Fe^{2+}) konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Gülçin et al. 2007b). Ferrozin, ferröz iyonları (Fe^{2+}) gibi iki değerlikli metal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

Metal Çelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal Çelatlama aktivitesinde 562 nm'de absorbansta meydana gelen azalma metal Çelasyonunun 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 Çelatladığı gözlenmiş ve Şekil 5.1'de görüldüğü gibi L-karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) arasındaki metal Çelatlama mekanizması aydınlatılmıştır (Gülçin 2006b). Şekilde de görüldüğü gibi bir L-karnitin molekülünün karboksil grubu ile yine aynı L-karnitin molekülünün γ -karbonuna bağlı hidroksil grubu arasında bir metal köprüsü oluşarak bir ferröz iyonu (Fe^{2+}) Çelatlanır.



Şekil 5.3. L-Karnitin ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) arasındaki önerilen metal Çelatlama mekanizması

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

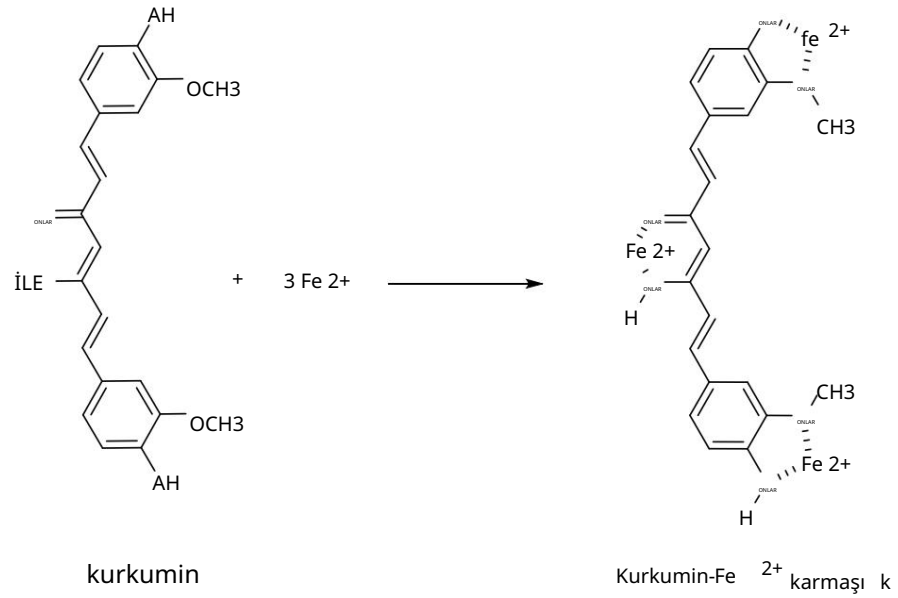


Şekil 5.4. L-Adrenalinin bir ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak L-Adrenalin- Fe^{2+} kompleksi oluşturması

Benzer mekanizmalar Kazazica ve arkadaşları tarafından da ileri sürülmüştür (2006). Son zamanlarda yapılan bu çalışmada kamferol gibi bir flavonoidin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) ve ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) fonksiyonel karboksil grupları üzerinden çelatlattığı bildirildi.

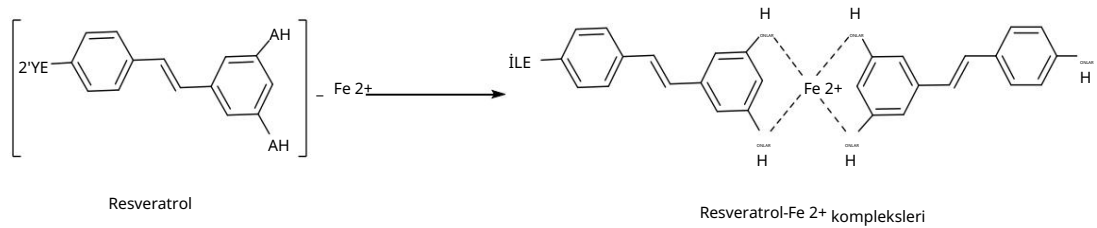
Bununla beraber, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_3$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$ ve $-\text{O}-$ fonksiyonel gruplardan iki veya daha fazlasına sahip olan moleküllerin metalleri kolaylıkla çelatlayabildikleri bilinmektedir. Bu grupların bulunması antioksidan moleküllerin metal çelatlamada yapı-fonksiyon konfügrasyonunun lehinedir (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2009a).

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



Şekil 5.5. Bir kurkumin molekülünün üç ferröz iyonu (Fe²⁺) ile bağlanarak kurkumin Fe²⁺ kompleksi oluşması

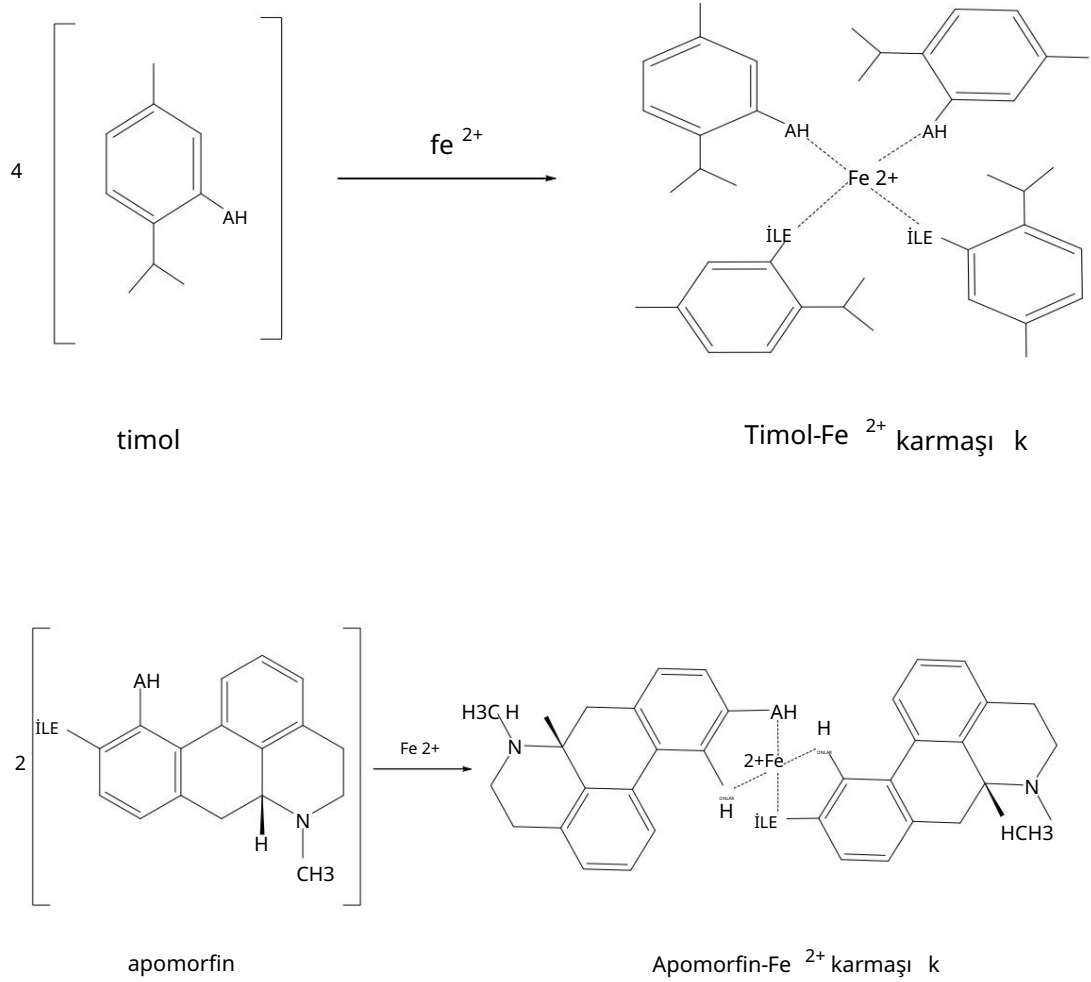
Son zamanlarda yapılan diğer bir çalışmada ise üzüm ve üzüm ürünlerinde bol miktarda bulunan trifenolik bir bileşik olan rezveratrolün ferröz iyonları (Fe²⁺) çelatlama aktivitesi için mümkün olan mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır (Gülçin 2009b). Çki rezveratrol molekülünün ihtiva ettiği her iki difenolik aromatik halkalar arasında bir adet ferröz iyonunun (Fe²⁺) çelatladığı gözlenmiştir.



Şekil 5.6. Çki molekül rezveratrolün iki adet ferröz iyonu (Fe²⁺) ile bağlanarak Resveratrol-Fe²⁺ kompleksi oluşması

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

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



Şekil 5.7. Apomorfin ve timolün ferröz iyonu (Fe²⁺) ile bağlanarak oluşturduğu kompleks

Çalışmada kullanılan fenolik doğal bileşiklerin içerisinde en kuvvetli metal çelatlama apomorfinde gözlemlendi. Metal çelatlama aktivitelerinin IC₅₀ değerleri ile diğer antioksidanların IC₅₀ değerleri mukayese edildiğinde ise timol için 35 µg/ml, apomorfin için 16 µg/ml ve humik asit için bu değer 29 µg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 5.2). Standart antioksidanların metal çelatlama aktivitelerine ait IC₅₀ 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 Çelatlama aktivitelerinin IC50 değerleri 15-35 µ g/ml arası nda iken α-hederin, hederasaponin C, hederakolçizit ve E hederakolçizit F gibi doğal antioksidanların metal Çelatlama aktivitelerinin IC50 değerleri sırasıyla 51, 53, 71 ve 61 µ g/ml olarak bulunmuştur (Gülçin et al. 2004d). Bipiridil metal Çelatlama aktivitesine bakıldığında apomorfinin yüksek Çelatlama kapasitesine sahip olduğu teyit edilmiştir.

Çizelge 5.2. Standartlar ve fenolik doğal bileşiklere ait DPPH•, ABTS••, DMPD•• ve O₂•• ve metal Çelatlama aktiviteleri ile ilgili IC50 (µ g/ml) değerleri

Antioksidanlar	Fe ²⁺ jelatlam	O ₂ •• - giderme	DPPH• giderme	ABTS•• giderme	DMPD•• giderme
VARDI	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	-
Trolloc	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
Hüyük 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 lipid peroksidasyonunu hızlandırmakta ve ürünün kalitesini düşürmektedir (Min 1998).

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

ABTS^{•+} giderme aktivitesi (Gülçin et al. 2006a), DMPD^{•+} giderme aktivitesi (Basile et al. 2006), PMS-NADH-NBT sistemleri (Gülçin 2005), ksantin-ksantin oksidasyon sistemleri (Nagai et al. 2001) ve riboflavin-metiyonin-ı Çı k 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 gözlemlendi.

Fenolik bileşiklerin süperoksit giderme aktivitesi IC50 değerleri ise 25-40 µg/ml civarında iken α-hederin, hederasaponin C, hederakolçizit ve E hederakolçizit F gibi doğal antioksidanların IC50 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 kanıtlanmıştır.

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

Koklamak





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

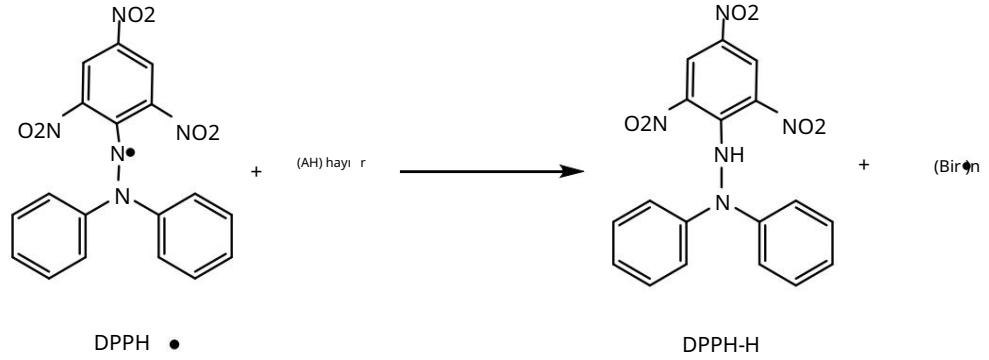
Bu kromojenlerden DPPH radikali uzun ömürlü ve azot merkezli bir radikalidir. Antioksidan maddelerin radikal giderme aktivitelerini belirlemek için en sık kullanılan metotlardan biridir (Özçelik et al. 2003). DPPH giderme dolaylı olarak antioksidan aktivitenin belirlenmesi için kullanılan en eski metotlardan 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 esasını hidrojen veren guruplara sahip antioksidan maddelerin varlığında, alkolde çözünen DPPH radikallerinin redüksiyonuna dayanmaktadır. 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 5.8"de belirtildiği gibi indirgenmiş DPPH-H formuna dönüşmektedir (Gülçin 2002).

Çalışmada DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili sonuçlara bakıldığında çalışmada kapsamı içinde kullanılan fenolik bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi ile ilgili IC50 değerleri 40-70 µg arası arasında değiştiği gözlenmektedir (Çizelge 5.2).

Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında ise benzer değerlere sahip oldukları gözlenmektedir. DPPH radikali giderme aktivitesinin IC50 değeri, L-

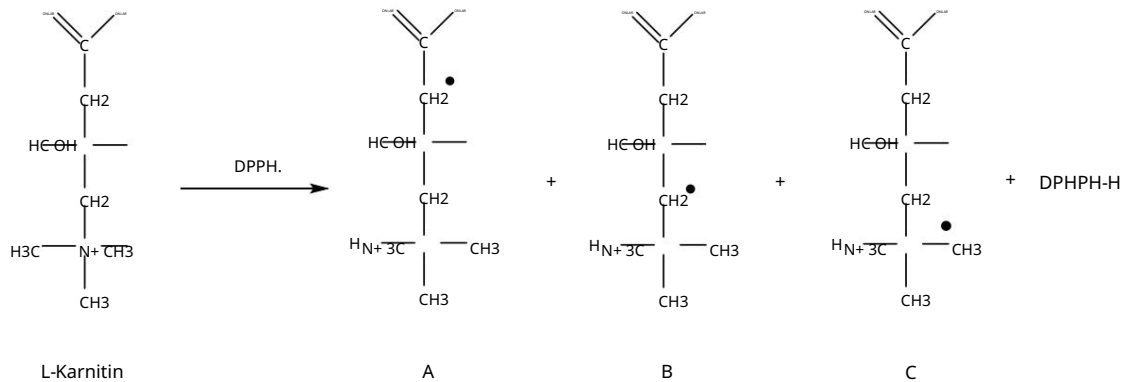
Adrenalin (Gülçin 2009a) için 30,6 μ g, kurkumin için 34,9 μ g (Ak and Gülçin 2008), silmarin için 20,8 (Gülçin et al. 2009d) ve α -hederin için 69,4 μ g (Gülçin et al 2004d) olarak bulunmuştur.



Şekil 5.8. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

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

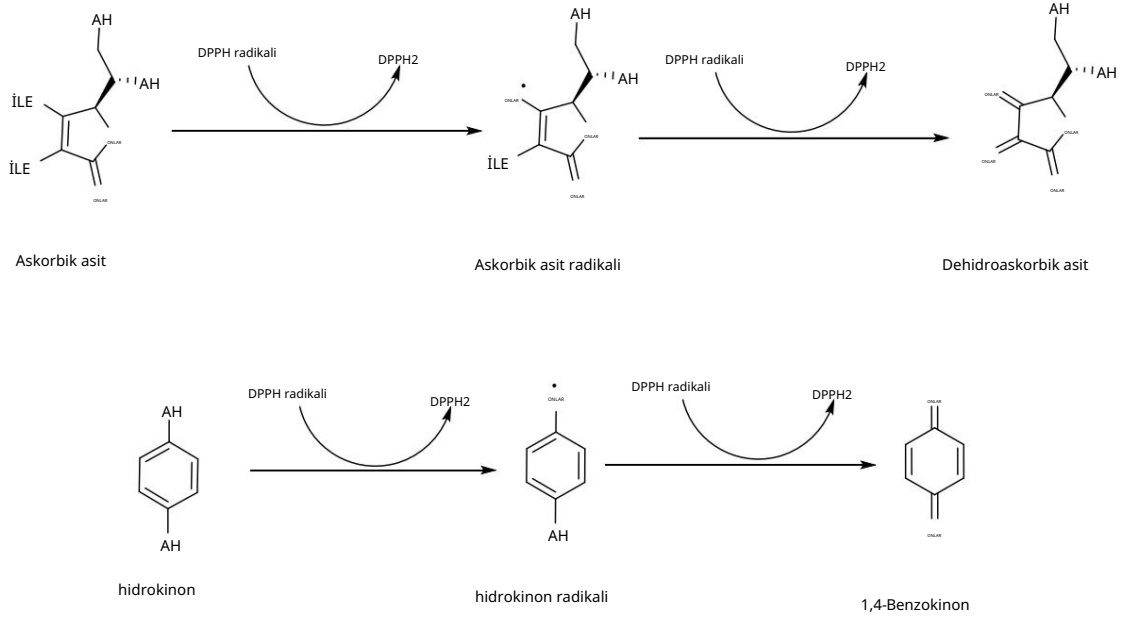
Gülçin tarafından DPPH radikal giderme aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada L-karnitin ile DPPH radikal giderme aktivitesi arasındaki mekanizma aydınlatılmıştır ve bu mekanizma Şekil 5.9'da özetlenmiştir (Gülçin 2006b).



Şekil 5.9. L-Karnitin ile DPPH radikali arasında önerilen radikal giderme mekanizması

L-Karnitinde bulunan karbonil gurubu, α -karbonundaki konjugasyon ile oluŖan radikali stabil hale getirir. L-Karnitin molekülünde karboksilat gurubu bir adet karbonil birimine sahiptir. L-Karnitindeki iki nolü karbon atomundan bir hidrojeni kolayca koparı labilir ve bir L-karnitin ara ürün radikali oluŖabilir. Koparı lan hidrojen tarafı ndan da DPPH radikali söndürülebilir. Teorik olarak enerji hesaplamaları yapı ldı ğı nda da gerçekten ğekil 5.9'da görüldüğü gibi L-karnitin ara ürün radikallerinden A'nı n oluŖumunun daha muhtemel olduğu ve diğer ara ürünlerden daha stabil bir yapı ya sahip olduğu belirlenmiŖtir.

Benzer bir mekanizma Nishizawa ve arkadaŖları tarafı ndan konjuge guruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon için de öne sürülmüŖtür (2005). DPPH radikalleri giderme aktivitesi antioksidan vitaminler ile polyhidroksi aromatik bileŖiklerin değerlendirmesinde uzun zamandan beri sı klı kla kullanı ldı ğı bilinmektedir (Yoshida et al. 1989; Nishizawa ve diğ. 2005)



ğekil 5.10. Konjuge guruplara sahip askorbik asit ve hidrokinon ile DPPH radikalleri arası nda meydana gelen reaksiyon

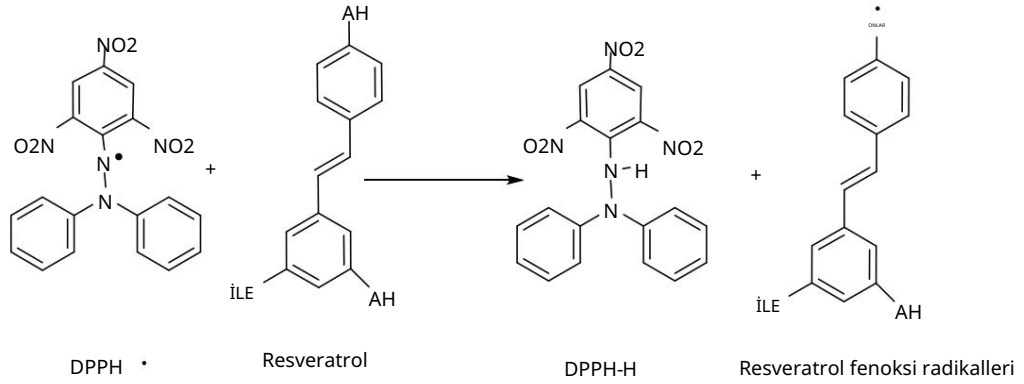
Askorbik asit DPPH radikalleri etkileğtiğinde askorbik asidin üç nolü karbon atomuna bağlı olan hidroksil gurubundan bir adet hidrojen homolitik olarak ayrı larak DPPH•'ı

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 1,4-benzokinona dönüşür ve iki radikali söndürür.

Gı da bileşenlerinin güçlü DPPH. giderme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda yine Gülçin tarafından yapılan diğer çalışmada farklı moleküllerin DPPH serbest radikali ile etkileşme mekanizmaları na açıklık getirilmiştir.

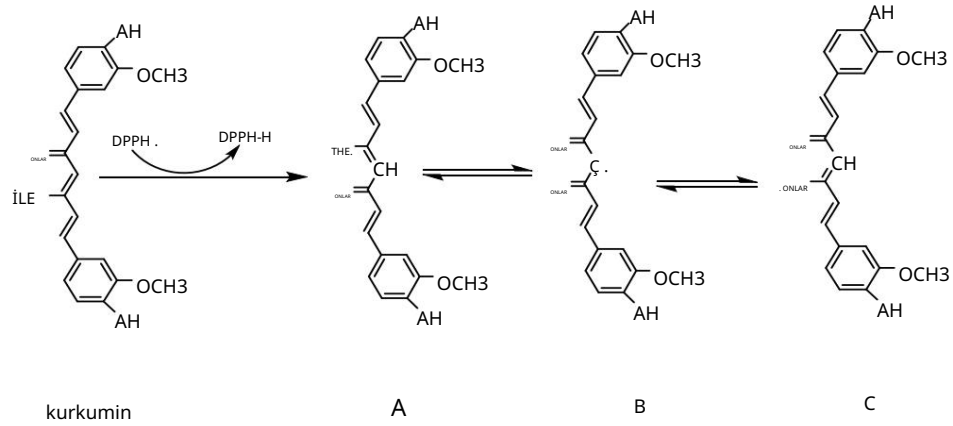
Bu anlamda rezveratrol ile ilgili yapılan bir çalışmada (Şekil 5.11) bir rezveratrol molekülünün birebir DPPH• radikalini söndürdüğü ve rezveratrol fenoksi radikali ara ürününün oluştuğu bildirilmiştir. Daha sonra oluşan bu radikali k ara ürünün radikal formunun fenolik halka tarafından süspansiyon edilerek 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 gruplarını redoks özelliğine ve kimyasal yapıları boyunca elektron delokalizasyonu potansiyeline bağlıdır. Rezveratrolün yapısı DPPH. 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

Aynı ca fenolik gruplar rezonans yapı ları ile birlikte fenolik karbon üzerinde oluşturulmuş bir radikal stabilize eder. Rezveratrolün monofenol ve difenol olmak üzere iki fenolik halkası vardı r. Monofenolik bir hidroksil grubundan bir hidrojen atomu almak kolaylı kla meydana gelebilir. Farklı bir mekanizma ise kurkumin molekülü üzerinde görülmüştür. (Ak and Gülçin 2008).

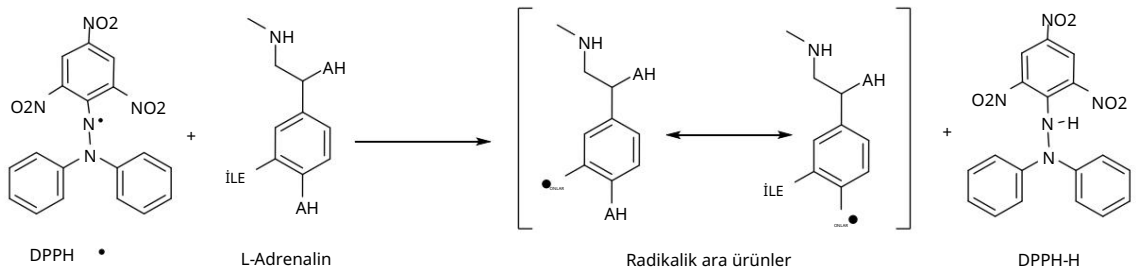


Şekil 5.12. DPPH radikali ile kurkumin arası nda önerilen reaksiyon mekanizması

Şekil 5.12'de görüldüğü gibi, keto formundaki kurkuminde, iki metoksifenol halkası arası ndaki heptadienon bağlantı sı son derece aktive olmuş karbon atomu içerir. Aynı Şekilde kurkumin bu karbon atomundan bir hidrojen atomunu kolaylı kla koparabilir. Kurkuminin fenolik hidrojen atomu komşu metoksi grupları na 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" özellikteki kurkuminden sorumlu olan serbest hidroksil grupları ndan H atomunu kolayca koparı r. sonuç olarak alkol ortamı ndaki kurkumin DPPH radikalini 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.

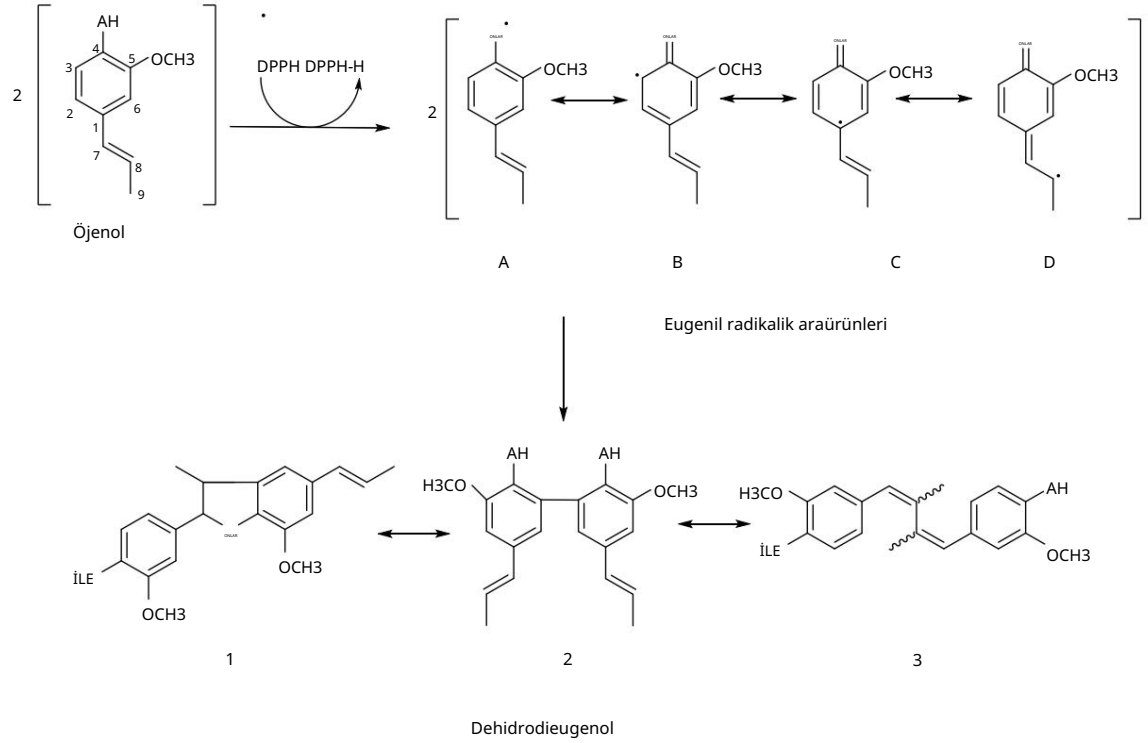
Diğer bir çalışmada ise benzer mekanizma da metabolizmada organizmayı acil harekete hazırlama, kanın iç organlar ve deriden kaslara sevk edilmesi, karaciğerdeki glikojenin glikoza dönüşmesi ve böylelikle acil bir enerji kaynağı sağlanması etkisine sahip olan L-Adrenalin için öngörülmüştür (Gülçin 2009a).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



şekil 5.13. Bir L-Adrenalin molekülünün birebir DPPH• radikali söndürmesi ve L-Adrenalin'in radikalik ara ürünlerin oluşumu

Öte yandan Kawabata ve arkadaşları DPPH radikali ile reaksiyonundan sonra, gallik ve protokatekoik asitlerinin dimerlerinin oluşumunu bildirmiştir (2002). ayrıca DPPH'ın BHT, eugenol ve izoeugenol ile olası mekanizmaları üzerinde çalışın Brand-Williams ve arkadaşları nın 1995'te ve Bondet ve arkadaşları nın 1997'de yaptığı çalışmaları da bu konuda önemli katkılar sağladıkları için teşekkür ederiz. Yan zincir üzerinde yapılan gözlemleri onaylamak adına, üç

monofenol grubu, yani izoeugenol, dihidroeuogenol ve eugenolün bir çift bağ ve/ veya zincirdeki pozisyonları nı n da farklı olduğu görülmüştür.



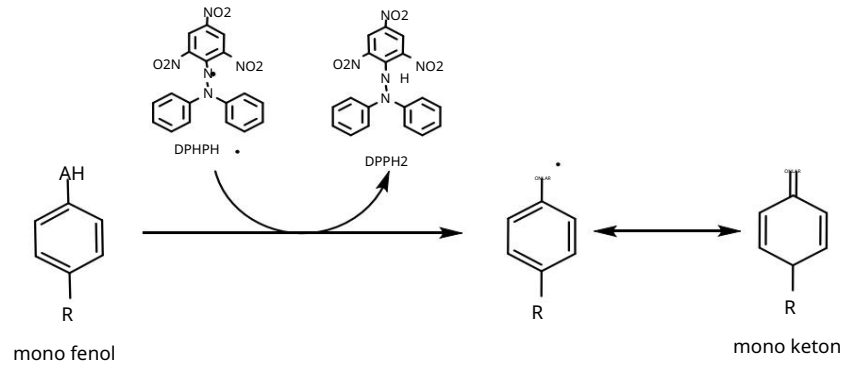
Şekil 5.14. Eugenol'ün DPPH radikal giderme mekanizması ve eçleme tepkimesiyle dehidrodieugenol oluşumu

Hidroksil grupları ndaki hidrojen varlığı na 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 çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda fenolik asitlerin DPPH• radikali 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• radikalini giderme mekanizması

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

Apomorfin iki, timol bir adet fenolik OH grubuna sahipken, hümkik asit ise polifenol grubuna sahiptir. Bundan dolayı hümkik asidin apomorfin ve timole göre daha kuvvetli DPPH• giderme aktivitesine sahip olması gerekir. Ancak Şekil 4.6 ve Çizelge 4.4 veya 5.2'deki sonuçlara bakıldığında hümkik asidin DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin apomorfine ait IC50 değerinden daha yüksek iken timolden daha düşük olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni timolün kendi içindeki rezonans kararlılığıdır. Apomorfin, timol ve hümkik asidin DPPH serbest radikali giderme aktivitelerine ait IC50 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 tarafı ndan okside edilerek yoğun renkli radikal katyonu olan ABTS.+ 'ye çevrilir ve antioksidan kapasitesi, deney bileşiklerinin doğrudan ABTS radikal ile oluşan renk reaksiyonunu azaltma yeteneği olarak ölçülür. ABTS.+ hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikler için uygulanabilir. ABTS.+ radikalleri DPPH.

radikalinden daha aktiftir ve hidrojen atom transferi içeren DPPH radikal reaksiyonları nı n aksine, ABTS.+ radikal reaksiyonları hem hidrojen atom transferi hem de tek elektron transferi içermektedir. ABTS.+ radikal katyonunun üretilmesi, saf maddelerin, sulu karışımları n ve içeceklerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturur (Gülçin 2009a).

Uygulamalar sı rası nda ele alı nan en uygun format, kabul edilmiş antioksidan reaksiyonları ndan önce sabit bir formda doğrudan üretilen radikalde renksizleştirme tekniklerinin uygulanması dır. ABTS.+ sulu ortamda (414, 734 ve 815 nm) ve alkol ortamı nda (414, 730 ve 873 nm) maksimum absorbanza sahiptir. İlk olarak ABTS.+ giderme çalışmaları Miller ve arkadaşları tarafı ndan geliştirilmiştir (1993). Bu yöntem, ABTS.+ radikal katyonu oluşturmak üzere ABTS ile reaksiyona girdikten sonra H₂O₂ ile ferrilmiyoglobin radikali oluşturmak için peroksidaz olarak hareket eden metmiyoglobin aktivasyonunu esas alı rdı (Re et al. 1999).

Bağlangı çta, ABTS'nin ABTS.+ formuna reaksiyonundan sonra ferrilmiyoglobini oluşturmak için H₂O₂ ve metmiyoglobin kullanı r (Miller et al. 1993). Test koşulları na göre, referans antioksidanları n seçimi, uygun dalga boyunun tesbiti, uygulanan reaksiyon süresi ve ABTS üretimi için farklı stratejiler uygulamaya konulmuştur. ABTS, oksidan tarafı ndan okside edilerek radikal katyonu olan ABTS.+ 'ye çevrilir.

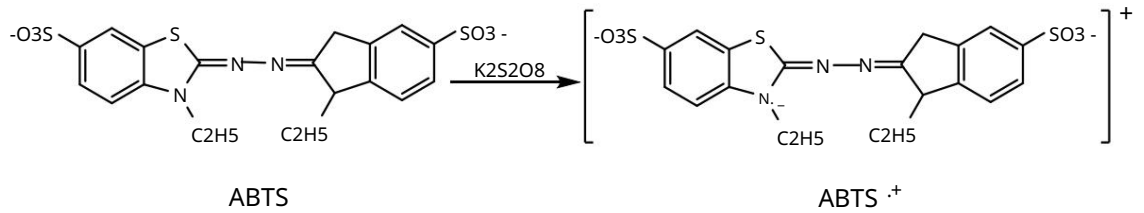
Bu amaçla ABTS.+ radikal katyon MnO₂'nin önemli reaksiyonları olan redoks, oksidasyon ve redüksiyonuyla ilişkili olan MnO₂ kimyasal reaksiyonu (Miller et al. 1996), 2,2'-azobis(2-amidino-propan)dihidroklorit (AAPH) (Van den Berg ve ark. 1999) veya K₂S₂O₈ (Miller et al. 1996), metmiyoglobin veya yaban 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.+ radikal katyonu genellikle K₂S₂O₈'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).

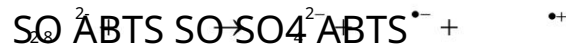
Miktar olarak absorpsiyon değeri, geriye kalan ABTS konsantrasyonu ile orantılı olarak ölçülür (Magalhaes et al. 2008). Genellikle kimyasal reaksiyonlar uzun bir zaman (K₂S₂O₈ için en fazla 16 saat) veya yüksek sıcaklıklar gerektirirken, enzim üretimi daha hızlı ve reaksiyon şartları daha hafiftir.

Cano et al. 1998'de ABTS.+ oluşturmak için yabancu peroksidazı kullandı ve reaksiyonun geniş bir pH aralığında çalışabileceğini gösterdi. Bununla birlikte, reaksiyon mekanizması pH değişimi ile değişmektedir. Örneğin; elektron transferi asidik pH 8.0'de daha kolay gerçekleşmektedir. Bu varyasyon, sırasıyla tamponlanmış ortam ve organik çözücülerle gerçekleştirilen, heksan ve sulu çözeltiler arasındaki antioksidanları ayırtarak (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 K₂S₂O₈ kullanılarak elde edilen sonuçlar peroksidisülfat varlığında ABTS.+ oranını arttırdığını göstermiştir. ABTS.+ , ABTS/ K₂S₂O₈ sistemiyle üretilir.



Şekil 5.16. K₂S₂O₈ ile ABTS'nin oksidasyonu mekanizması



Burada peroksidisülfatın yığılması elektron transferinden sonra meydana gelebilir. Ağır ABTS varlığına, sülfat radikali şu reaksiyona göre tepkime verir.



net reaksiyon ise şöyle cereyan eder:



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 çalışılan kapsamda kullanılan bütün fenolik doğal bileşiklerin oldukça kuvvetli bir şekilde ABTS radikallerini giderdiği gözlenmektedir.

Çalışmada ABTS radikallerini giderme tayininde fenolik doğal bileşiklerin IC50 değerleri 14-30 µg/ml arası 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^{•+} giderme aktivitesidir. DMPD^{•+} (N,N-dimetil-p-fenilen diamin), ABTS^{•+} kullanımına çok benzer başka bir çalışmadır (Fogliano et al. 1999). N,N-dimetilfenilendiamin'den türetilen kararlı DMPD^{•+} radikal katyonu ile ABTS^{•+}'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; Schlesier ve ark. 2002)

Bir oksitleyici veya bir asidik pH varlığında, DMPD kararlı ve renkli DMPD radikal katyonuna (DMPD•+) dönüştürülür. DMPD•+, UV-görünür bölge spektrumu 505 nm'de maksimum absorbanası gösterir. Bununla birlikte, radikal kararlılığı 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•+'ye bir hidrojen atomu aktarabilen antioksidan bileşikler, çözelti rengini söndürür ve çözeltilerde renksizleşme sağlar. Bu reaksiyonlar hızlıdır ve kararlı sonlanma noktası antioksidan verimliliğinin bir ölçüsü olarak alınmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada DMPD•+'den gelen tek bir elektronu süpürmek için radikal hidrojen verici yeteneğini yansıtılmaktadır. Reaksiyon oldukça kararlıdır (Şekil 5.17, Fogliano et al. 1999; Ak and Gülçin 2008).



Şekil 5.17. Kararlı bir radikal olan DMPD•+'nin oluşumu ve giderilme mekanizması

Ön deneyler göstermiştir ki oksidan çözelti seçimi ve DMPD•+ konsantrasyonu ile oksidatif bileşiğin konsantrasyonu arasındaki oran yöntemin etkinliği için oldukça önemlidir. Aslında radikal katyon oluşumu oldukça yavaşdır ve sürekli bir absorbanın artışıyla sonuçlanır.

En iyi sonuçlar son konsantrasyonu 0,1 mM olan ve kararlı renk çözeltisi veren FeCl₃ ile elde edilmektedir. Dahası, bu metod düşük maliyet ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlar (Gülçin 2008). DMPD deneyi, hidrofobik antioksidanlar için özellikle uygundur ancak hidrofobik biyoaktif bileşiklerde daha az hassasiyete sahiptir. Diğer durumlarda ise ABTS ve DPPH kullanımı daha uygundur.

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

Çalışmada kullanılan fenolik bileşiklerden timol ve apomorfinin DMPD.+ giderme aktiviteleri, standart olarak kullanılan BHA bileşiciden daha etkin aktiviteye sahiptir. Fenolik bileşiklerin DMPD.+ giderme aktivitelerine ait IC50 değerleri 10-50 μ g/ml arası nda değişmektedir. Bununla beraber çalışmada kullanılan fenolik bileşikler arası nda en düşük IC50 değeri 50,58 μ g/ml ile humik asitte gözlenirken, en yüksek IC50 değeri 17,32 μ g/ml ile timolde gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan BHT ve α -tokoferol gibi pozitif kontrollerin IC50 değerleri kontrol değerine yakın olduğundan dolayı kıyaslamada kullanılmamıştır (Çizelge 4.5 veya Çizelge 5.2). Literatürdeki diğer çalışmalar ile mukayese edildiğinde ise daha etkili oldukları gözlenmiştir. IC50 değerleri L-Adrenalin için 15,6 μ g/ml (Gülçin 2009a) ve kurkumin için ise 34,5 μ g/ml (Ak and Gülçin 2008) olarak bulunmuştur.

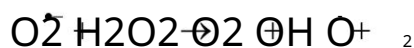
Radikal giderme kapsamı nda yapılan çalışmalarda son olarak süperoksit anyon radikalleri giderme aktivitesi de araştırılmıştır. Süperoksit anyon radikalleri lipid peroksidasyonunu direkt başlatan oksijen merkezli radikallerdir.

Süperoksit anyon radikalleri (O_2^-) biyolojik olarak oldukça zehirlidir ve istilacı mikroorganizmaları öldürmek için bağışıklık sistemi tarafından dağıtılır. Fagositlerde, istilacı patojenlerin oksijen-bağımlı öldürme mekanizmalarını kullanması 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 uyarı lmayla oluşan oksijen aktivasyonu sonucu doğar (Halliwell 2006). Süperoksit anyon enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalarla H₂O₂ içine gönderilir (Fridovich 1989). H₂O₂, indirgenmiş demir veya bakır gerektiren (Halliwell and Gutteridge 1990) Fenton reaksiyonu ile daha reaktif olan HO[•] 'a dönüştürülür (Gardner and Fridovich 1992). Kı smen zayı f bir oksidan olması na rağmen, süperoksit sı nı rlı kimyasal reaktivite sergiler, fakat lipidlerin peroksidasyonuna yol açan 1O₂ ve HO[•] içeren daha tehlikeli türleri üretilmesine neden olabilir (Halliwell ve Chirico 1993).

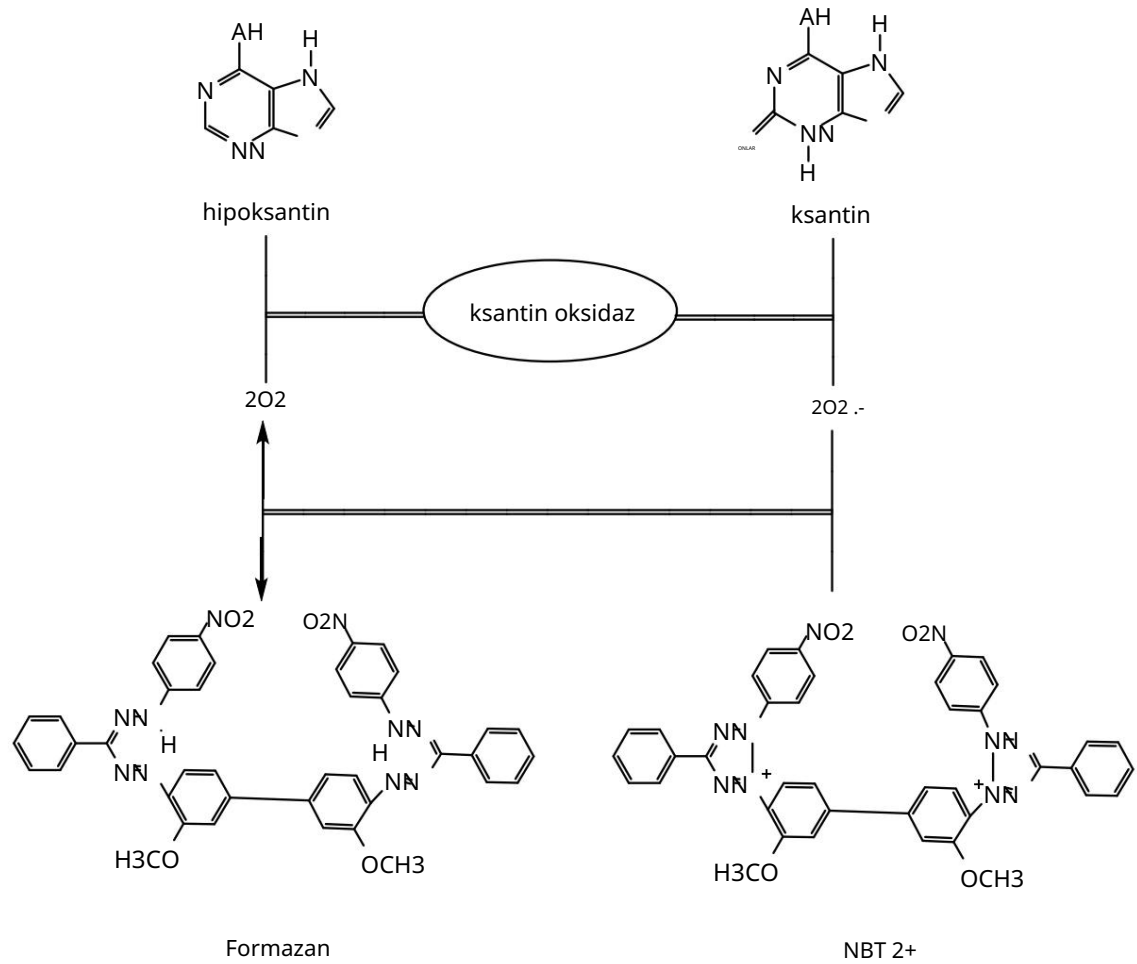
Süperoksit anyonları biyolojik makro moleküllerle reaksiyon için potansiyele sahip ve aktif serbest radikallerin habercisidir ve böylece doku hasarı na neden olur (Halliwell and Gutteridge 1984). Süperoksit doğru reaksiyon hızı sabitlerinin ölçülmesine imkan tanı yan oksijen varlığı nda suyun radyolize edilmesiyle kolaylıkla oluşturulur (Gülçin and Dağtan 2007). HO[•] gibi daha reaktif türlere dönüşmesi nedeniyle birçok patofizyolojik süreçlerde ortaya konmuştur. Aynı zamanda süperoksitin lipid peroksidasyonunu doğrudan bağılattığı gözlenmiştir (Wickens 2001).

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



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 sı ra lipid, 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). Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin esasen süperoksit anyon radikalini süpürmede etkili olduğu bildirilmiştir.

O_2 .- süpürme aktivitesi tayini için kullanı lan 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).



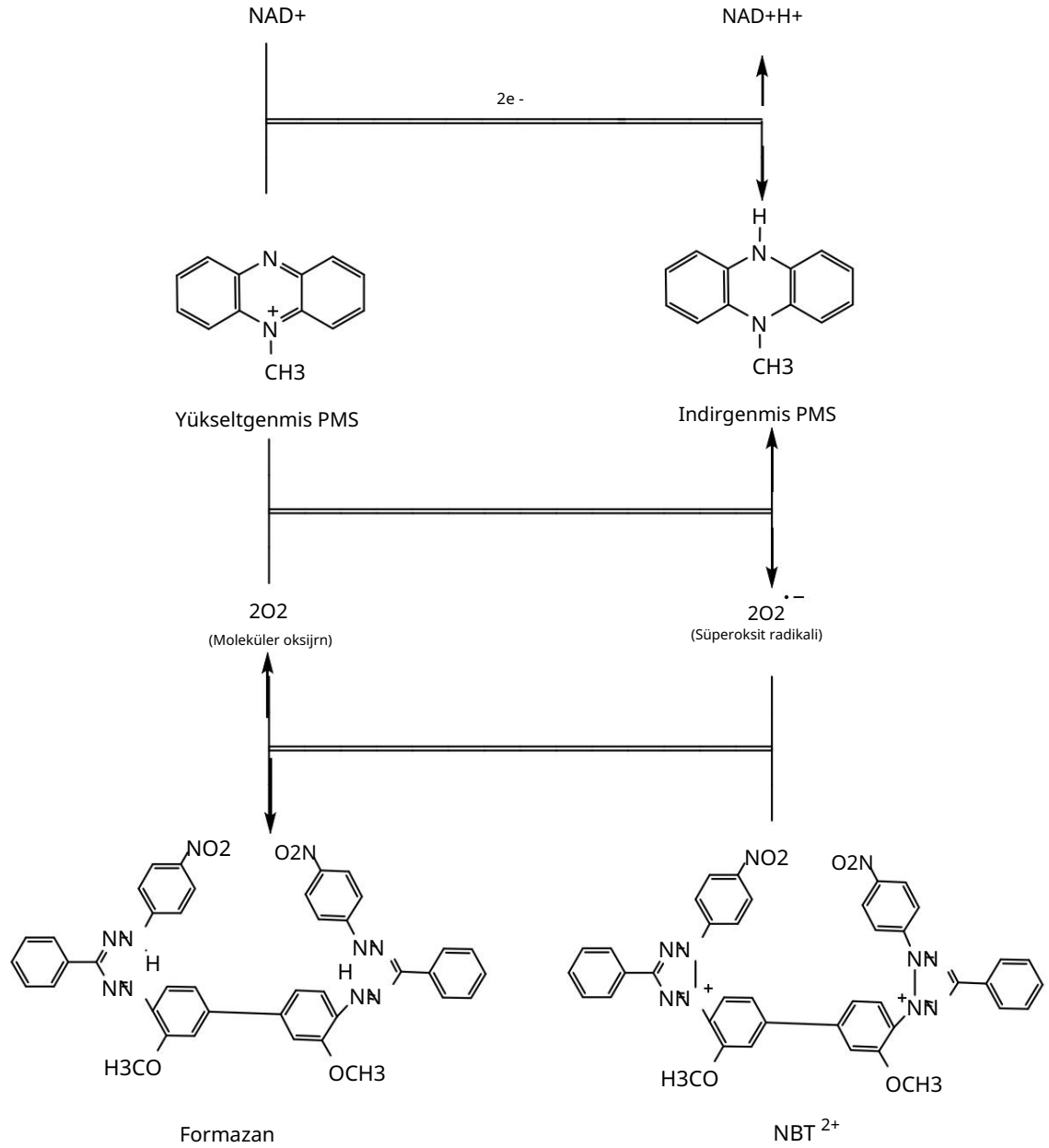
şekil 5.18. Ksantin/ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT2+'yi formazana indirger

Normal dokularda ksantin oksidaz nikotinamid adenin dinukleotid (NAD)'e elektron transfer eden bir dehidrogenaz enzimidir. Stress dönemlerinde, bu enzim bir oksidaz enzimine dönüşür ve O_2 .- ve H_2O_2 üretir. Böylece, ksantin oksidaz artı hipoksantin (veya ksantin), test tüpü içinde pH:7,4 'te O_2 .- üretmek için kullanı labilir. Bu reaksiyon O_2 .- '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 için, son zamanlarda NBT yerine sitokrom c kullanılan mikro-plaka formatı uyarlanmıştır ve 550 nm'de okunmuştur (Quick et al. 2000; MacDonald-Wicks et al. 2006; Gülçin 2011).

Ayrıca, ksantin-ksantin oksidaz elde etme sistemini kullanan, O₂ .- 'ye karşı süpürme kapasitesi, gaz kromatografisi ile ölçülen, etilen üreten a-ketometiolbütirik asit reaksiyonuyla hesaplanmıştır (Vonkruedener et al. 1995; Lavelli et al. 1999). Radikal süpürme kapasitesi de ESR spektrometrisi ile ölçülebilir (Rimbach and Pallauf 1998; Calliste ve ark. 2001).

Ksantin-ksantin oksidaz sistemine benzer olarak, O₂ .- aynı zamanda nikotinamid adenin dinükleotid varlığında fenilazin metosülfatının (PMS) enzimatik olmayan reaksiyonuyla da üretilebilir.

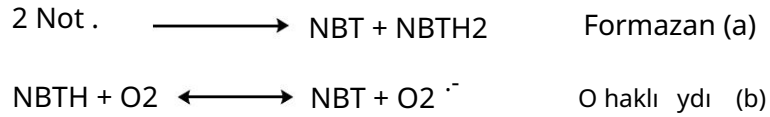


Şekil 5.19. NADH/PMS sisteminde üretilen süperoksit anyon radikallerinin NBT²⁺'yi formazana indirir

Her iki sistemde de O₂^{.-} NBT'yi formazana indirir ve bu reaksiyon spektrofotometrik olarak 560 nm'de ölçülür (Aruoma et al. 1993). Başka bir O₂^{.-} oluşturma sistemi de riboflavin-metiyonin-1-Gl kanlı rma sistemidir. Çözünmüş oksijenden türeyen süperoksit anyonları riboflavin-metiyonin-1-Gl kanlı rma sistemi ile NBT'yi indirgeyecektir. Bu yöntemde süperoksit anyonları sarı rengi (NBT²⁺) indirgeyerek 560 nm'de ölçülebilen mavi formazanı üretir. Antioksidanlar mavi renkli NBT oluşumunu engeller (Parejo et

al. 2002). Antioksidanlarla 560 nm'de görülen absorbans azalması, reaksiyon karışımında süperoksit anyonları miktarını azaldığını gösterir (Bursal and Gülçin 2011; Gülçin 2011).

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



Riboflavin fotokimyasal olarak aktif hale geldiğinde, a reaksiyonuna göre formazan oluşumuna yol açan NBTH elde etmek için NBT ile birleştirilir (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 O₂ için NBT ile yarı olarak, reaksiyon hızını düşürmektedir.

O₂ 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 azaltılması, sitokrom c'ye göre genellikle çok daha fazla olduğu gözlenmiştir (Aruoma et al. 1993). Bunun nedeni, O₂ için NBT ile olan reaksiyonundansa, sitokrom c ile daha hızlı reaksiyona girmesidir ve böylece eklenen O₂ 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/niçin sisteminde üretilmekte ve üretilen süperoksit anyon radikalleri yukarıda verilen mekanizmalar ile aynı şekilde NBT²⁺'yi formazana yükseltir. Oluşan formazan ise 560 nm'de maksimum absorbans verir.

Fenolik bileşiklerin süperoksit giderme aktivitelerine ait IC50 değerleri 25-40 μ g/ml arası nda değişmektedir. Bununla beraber en düşük IC50 değeri 26,70 μ g/ml ile timolde gözlenirken, en yüksek IC50 değeri 37,55 μ g/ml ile hümik asitte gözlenmiştir. Ayrıca, hümik asit IC50 değeri BHA 'dan düşük olması na rağmen, diğer standart antioksidanlarla kıyaslandı ğı nda 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 kapasitesilerinin belirlenmesidir. Total antioksidan kapasitesi gibi da ve tıbbi biyoaktif bileşenler için yaygın bir parametre olarak kullanılır. Lipit peroksidasyonu gibi oksidatif yıkımı engellemek amacıyla kullanılan bileşimin özelliği olarak tanımlanmaktadır (Roginsky and Lissi 2005).

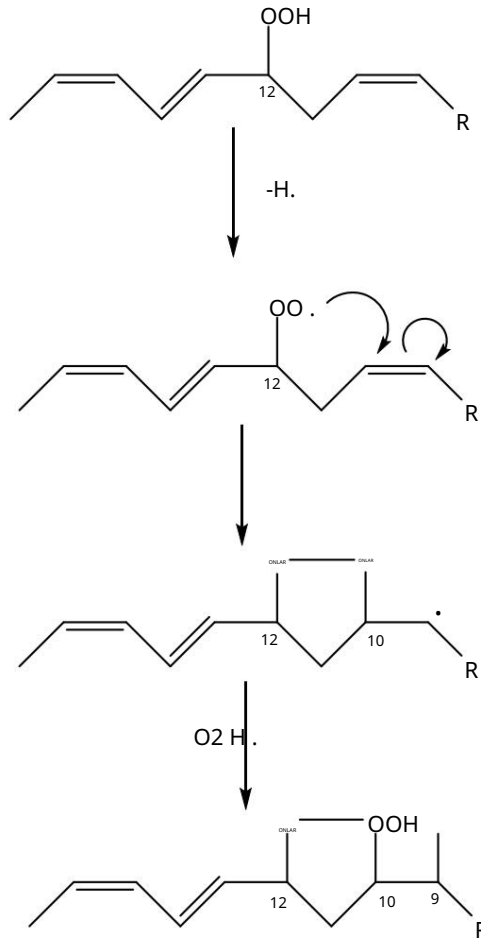
Lipit peroksidasyonu ise herhangi bir sayıda karbon-karbon çift bağı içeren lipitlerin oksidatif bozulması olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, biyoaktif bir bileşimin olası etkisinin belirlenmesi için, linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu kıstırmak amacıyla afinitesi test edilmiştir. Linoleik asit oksidasyonu, ikincil oksidasyon ürünlerini parçalayan linoleik asit hidroperoksitlerini üretir. Tiyosiyanat metodu lipit oksidasyonu bağlangıç aşamasında peroksit seviyesini ölçmek için kullanılır. Peroksitler, Fe³⁺ oluşturmak için Fe²⁺ ile reaksiyona giren linoleik asit oksidasyonu sırasında oluşur. Sonra, iyonlar tiyosiyanat (SCN⁻) ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks 500 nm'de maksimum absorbanısa sahiptir. Antioksidan varlığında, linoleik asit oksidasyonu oldukça yavaşdır. 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 aracı lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonunu harekete geçiren epoksiillilik proksil radikallerini oluşturmak için oksijenasyona ve demir aracı olarak 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 peroksidasyonu ile üretilen reaktif aldehitler, proteinler ve DNA gibi diğer hücre hedeflerine saldırabilirler; böylece, hücre membranlarında diğer makromoleküllere ilk hasarı yaparlar, 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 molekülleri 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 bağımı 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 karşı lı k gelen linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonu inhibe etme yüzdeleri

Antioksidanlar	% giderme (30 µg/ml - 60 h)
α-Tokoferol	52,51
Trolloc	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 karşılaştırdığımızda Çizelge 5.3'te görüldüğü gibi, kullandığımız fenolik bileşiklerden apomorfinin en yüksek IC50 değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda apomorfin, timol ve hümik asitin α-tokoferol'den çok daha yüksek IC50 değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Timol ve hümik asitte antioksidan kapasiteleri konsantrasyon artarken (ğekil 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 karşılaştırdığımızda 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 hidrolizaz E.C 4.2.1.1) enzimi ise eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici bir enzimdir. Karbon dioksinin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizler. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur (Gülçin et al. 2004c). CA bu reaksiyonun hızını ileri derecede arttırarak saniyede 104 -106 s reaksiyon hızına ulaştırdır (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 yapıları 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 matris olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi.

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

Tirozin ise enzimin ligantla daha iyi etkileşmesini sağlamak için uzantı kolu olarak seçildi. Zira karbonik anhidrazın aktif bölgesi enzimin globüler yapılarının 12-15 Å derinliğinde olduğu X ışınları kristalografisi ile belirlenmiştir (Cuatrecasas 1970). Bu durumda hazırlanan afinite jeline belirtilen derinliğe erişebilmek için istenilen uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. İşte tirozin bu amaçla kullanıldı.

Jele adsorbe olan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin elüsyonları için, sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH:6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) tampon çözeltileri kullanıldı. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıklarını kontrolü için SDS poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı. hCA-I ve hCA-II için tek bant gözlemlendi (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 Km ve Vmax değerlerinin bulunması için yapılan çalışmada Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan Km ve Vmax 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 absorbanları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorban 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 arasıdır (Bradford 1976). Enzim aktivitesi tayini için iki yöntem kullanıldı.

Birincisi; Maren ve arkadaşlarınıın modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂ hidrataz aktivitesidir (1960). Bu yöntemle CO₂'nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃ -'ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrıştırılarak ortamının 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 kullanılmaktadır.

Çalışmada kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından modifiye edilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarını parçalanmasına dayanmaktadır (1966). Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de absorpsiyon 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'sını 7,4 olmasıdır.

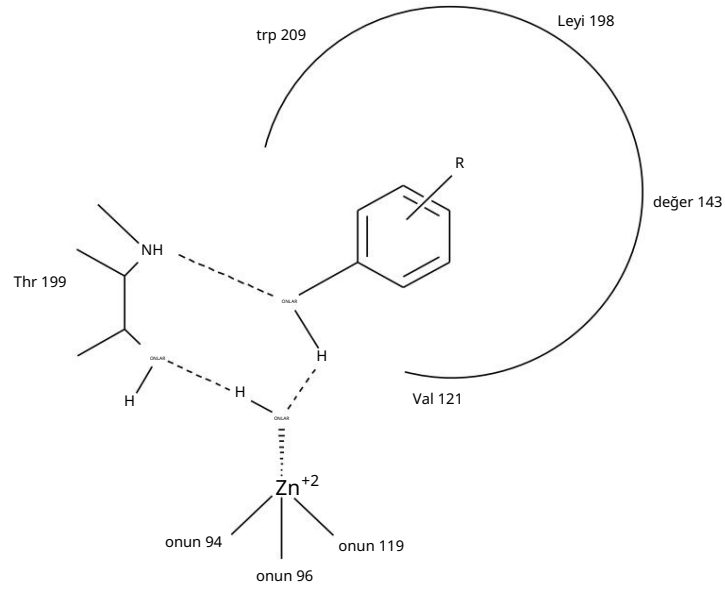
Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede I50 değerleri kullanılmaktadır. Sığırlar CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerini belirlemek için fenolik bileşiklerin konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde çözeltileri hazırlandı ve enzim üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için insan kanından saflaştırılan CA izoenzimleri için üç farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan hümkik asitin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi ve I50 değerleri bunlara bağlı olarak hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda çizilen Aktivite (%)-[I] grafiklerinden bulunan I50 değerleri Çizelge 4.9'da gösterildi.

Sonuçlara bakıldığında zaman CA için hidrataz metodunun esteraza göre daha düşük I50 değerleri verdiğini (Çizelge 4.9, 4.10 ve 4.11) ve bu yüzden hidrataz metodunu yani kendi substratı olan CO₂'yi tercih ettiği görülmektedir (ğentürk 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 Ki 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 araştırılması temel nedeni, basit fenollerin (PhOH) CA'nın en etkili izoformu yani hCA-II si bağta olmak üzere substrat olarak CO₂ ye karşı tek yarı çmalı inhibitör olduğunun ispatlanması ndan dolayıdır. Son zamanlarda yapı lan çalı şmalarda hCA-II ile fenollerin etkileşimini gösteren X-ray kristal yapı sı aydınlatıldı (Christie et al. 1997).

Bu çalı şmada enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ ile fenollerin fonksiyonel -OH grubunun bağlandı ğı nı göstermişlerdir. Katalitik bölge için oldukça önemli bir aminoasit olan Thr 199'un NH amidinin bir hidrojen bağı nı n yanı sıra ikinci bir hidrojen bağı vası tasıyla -OH'ı nı enzim aktif bölgesinin çinko bağı lı su/hidroksit iyonuna bağlayarak bu fenol bileşiklerinin CA ya bağlandı ğı nı ispatladılar (ğentürk et al. 2009).



Şekil 5.21. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktif bölgesinde bulunan Zn²⁺ iyonuna inhibitörlerin bağlanma modeli (Bayram et al. 2008)

Son zamanlarda grubumuz tarafı ndan fenol ve fenolün yerini alan türevlerden bazı ları nı n tüm memeli izozimlerle etkileşimlerini araştı rdılar. Aslı nda, çeşitli izoenzimlerin bu ajan sı nı fıyla olan inhibisyon profili, birçok basit fenol için milimolardan submikromolar arası nda 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 bileşiklerin 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 çökeltilmelerinde, DPPH ve ABTS gidermelerinde artış gözlenmiştir.
2. Ferröz iyonlarını çökeltilme aktivitesi, DMPD ve süperoksit anyon radikallerini giderme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı pozitif bir korelasyon gözlenmedi.
3. Antioksidan çalışmaları standart olarak, BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks kullanıldı. Mukayeseler sonucunda kullanılan apomorfin, timol ve hümik asitin kullanılan standartları n aynı konsantrasyonları ndaki aktivitelerine eş değer veya daha yüksek olduğu belirlendi.
4. Karbonik anhidraz enzimi Sepharose-4B L-tyrosin affinite jeli zaptan eritrositlerden saflaştırıldı.
5. hCA-I'in spesifik aktivitesi 1188,9 EU/mg olup %59,4 verimle saflaştırıldı. hCA II 5085,7 EU/mg spesifik aktiviteye sahip olup %65,9 verimle saflaştırıldı.
6. Saflaştırılan izoenzimlerin saflıkları nın kontrolü için SDS-Page elektroforezi uygulandı ve her iki izoenzim için (hCA-I ve hCA-II) tek bant gözlemlendi.

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

8. Enzim aktivitesi tayini için iki metot kullanıldı . Hidrataz aktivitesi sonuçları na 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 bileğiklerin Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı .

KAYNAKLAR

- Abuja, PM, Murkovic, M., Pfannhauser, W., 1998. Düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunda mürver (*Sambucus nigra*) ekstraktının antioksidan ve prooksidan aktiviteleri. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 46, 4091-4096.
- Abushita, AA, Hebshi, EA, Daood, HG, Biacs, PA, 1997. Domateslerde antioksidan vitaminlerin belirlenmesi. *Gıda Kimyası*, 60, 207-212.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Kurkuminin antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri. *Kimyasal-Biyolojik Etkileşim*, 174, 27-37.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Potansiyel karbonik anhidraz izoenzim inhibitörleri olarak yeni sülfamidler. *Biyoorganik ve Tıbbi Kimya (Kabul Edildi)*.
- Alcolea, JF, Cano, A., Acosta, M., Arnao, MB, 2002. Üzümlerin hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktiviteleri. *Nahrung*, 46, 353-356.
- Alhan, C., Çan, M., 2002. Kroner Kalp hastalığı tedavisinde anti-oksidanlar yararlı mı? *Türk Klinik Kardiyoloji*, 15, 203-213.
- Alonso, AM, Dominguez, C., Guillen, DA, Barroso, CG, 2002. Kırmızı ve beyaz şarapların antioksidan gücünün yeni bir elektrokimyasal yöntemle belirlenmesi ve bunun polifenolik içerikle ilişkisi. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 50, 3112-3115.
- Altınışık, M., 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. Aydın.
- Andersen, A., 2006. Sodyum p-kloro m-kresol, p-kloro-m-kresol, klorotimol, karışımlı kresoller, m-kresol, o-kresol, p-kresol, izopropil kresoller, timol, o-simenin güvenlik değerlendirmesi hakkında nihai rapor -5-ol ve karvakrol. *Uluslararası Toksikoloji Dergisi*, 1, 29-127.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, SE, Altun, M., 2005. Kromojenik oksidan olarak bakır (II)-neokuproin kullanan insan serumunun toplam antioksidan kapasite testi: CUPRAC yöntemi. *Serbest Radikal Araştırması*, 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. *Uluslararası Gıda Bilimi ve Beslenme Dergisi*, 57, 292-304.
- Arabshahi-Delouee S., Urooj A., 2006. Dut (*Morus indica* L.) yapraklarının çeşitli çözücü özlülerinin antioksidan özellikleri. *Gıda Kimyası*, 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. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinde E vitamininin karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerine etkisi in vitro ve 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, DV, Verpoorte, JA, Edsall, JT, 1966. İnsan eritrosit karbonik anhidrazının saflaştırılması ve özellikleri. *Biyoloji ve Kimya Dergisi*, 214, 5137.

- Arnao, MB, 2000. Kromojen radikalleri kullanılarak antioksidan aktivitenin belirlenmesinde bazı metodolojik problemler: pratik bir vaka. *Gıda Bilimi ve Teknolojisindeki Trendler*, 11, 419-421.
- Arouma, OI, Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., 1993. Gallik asit ve türevlerinin antioksidan ve proantioksidan etkilerinin değerlendirilmesi. *Ziraat ve Gıda Kimyası Dergisi*, 41, 1880-1885.
- Arouma, OI, Cuppett, SL, 1997. Antioksidan metodolojisi- in vivo ve in vitro kavramlar. *AOCS Basını* s 141-172, ABD.
- Awika, JM, Rooney, LW, Wu, X., Prior, RL ve Cisneros-Zevallos, L., 2003. Sorghum (*Sorghum bicolor*) ve Sorghum ürününün antioksidan aktivitesini ölçmek için tarama yöntemleri. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 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, DA ve Headley, O., 1999. Güneşte kurutulmuş kekik (*Thymus vulgaris* Linne) bitkilerinin değerlendirilmesi. *Yenilenebilir Enerji*, 17, 523-531.
- Basile, A., Senatore, F., Gargano, R., Sorbo, S., Del Pezzo, M., Lavitola, A., Ritieni, A., Bruno, M., Spatuzzi, D., Rigano, D. ve Vuotto, ML, 2006. *Sideritis italica* (Miller) greuter ve burdet esansiyel yağlarında antibakteriyel ve antioksidan aktiviteler. *Etnofarmakoloji Dergisi*, 107, 240-248.
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, O. I, Supuran, CS, 2008. Salisilik asit türevlerinin insan sitozolik karbonik anhidraz izozimleri I ve II üzerinde in vitro inhibisyonu. *Biyoorganik ve Tıbbi Kimya*, 16, 9101-9105.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Süperoksit dismutaz: geliştirilmiş analizler ve akrilamid jellere uygulanabilir bir analiz. *Analitik Biyokimya*, 44, 276-287.
- Benzen, EC, Musgrove, CC ve Kesterson, L., 1989. Gerbil inme modelinde Naloxone ve mortalite. *Güney Tıp Dergisi*, 82, 555-557.
- Benzie, IFF, 1996. Ölçüm için otomatik, spesifik, spektrofotometrik bir yöntem plazmada askorbik asit (EFTSA). *Klinik Biyokimya*, 111-116.
- Benzie, IFF, Strain, JJ, 1996. "Antioksidan gücün" bir ölçüsü olarak plazmanın ferrik indirgeme yeteneği: FRAP tahlili. *Analitik Biyokimya*, 239, 70-76.
- Benzie, IFF, Szeto, YT, 1999. Ferrik indirgeme/antioksidan güç analizi ile çayların toplam antioksidan kapasitesi. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 47, 633-636.
- Beydemir, G., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Gentamisin sülfatının insan eritrositlerinden in vitro ve sıçan eritrositlerinden in vivo karbonik anhidraz enzim aktiviteleri üzerine etkileri. *Biyolojik ve Eczacılık Bülteni*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Melatoninin insan eritrositinden in vitro ve sıçan eritrositinden in vivo karbonik anhidraz üzerine etkisi. *Enzim Engelleme ve Tıbbi Kimya Dergisi*, 19, 193-197.
- Bianchi, G. ve Landi, M., 1985. Sıçan plazmasında ve beyinde apomorfinin elektrokimyasal algılamalı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmesi. *Kromatografi Dergisi*, 338, 230-235.
- Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M., 1999. Flavonoidler. *Aktif Yayınevi*, 334-354. İstanbul.

- Bindolli, A., Rigobello, MP ve Deeble, DJ, 1992. Katekolaminlerin oksidasyon ürünlerinin biyokimyasal ve toksikolojik özellikleri. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 13, 391-405.
- Blois, MS, 1958. Stabil bir serbest radikal kullanılarak antioksidan tayinleri. *Doğa*, 26, 1199-1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. DPPH serbest radikal yöntemi kullanılarak antioksidan aktivitenin kinetiği ve mekanizmaları. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 30, 609-615.
- Botsoglou, NA, Grigoropoulou, SH, Bostoğlou, E., Govaris, A., Papgeorgiou, G., 2003. Diyet kekik esansiyel yağı ve α -tokoferil asetatı nın, soğutulmuş depolama sırasındaki yağ ve pişmiş hindide lipid oksidasyonu üzerindeki etkileri. *Et Bilimi*, 65, 1193-1200.
- Bradford, MM, 1976. Protein boya bağlama ilkesini kullanan protein miktarının belirlenmesi için hızlı ve hassas bir yöntem. *Analitik Biyokimya*, 72, 248.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, ME, Berset, C., 1995. antioksidan aktiviteyi değerlendirir. *Lebensm Bilgi Teknolojisi*, 28, 25-30.
- Bursal, E., Gülçin, İ., 2011. Kivinin (*Actinidia deliciosa*) liyofilize sulu ekstraktının polifenol içerikleri ve in vitro antioksidan aktiviteleri. *Uluslararası Gıda Araştırması*, 44, 1482-1489.
- Burt, E., Darlington, MV, Graf, G., Meyer, HJ, 1992. Böcek karbonik anhidrazının izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Böcek Biyokimyası ve Moleküler Biyoloji*, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Hisar, RO, Beydemir, G., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*) eritrosit karbonik anhidraz üzerinde bazı sülfonamid türevlerinin in vitro ve in vivo inhibitör etkileri aktivite. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 371-375.
- Cabiscol, E., Levine, RL, 1996. Karbonik anhidraz III'ün fosfataz aktivitesi, glutatinyolasyon ile tersinir şekilde düzenlenir. *Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları*, 93, 4170-4174.
- Calliste, CA, Trouillas, P., Allais, DP, Simon, A., Duroux, JL, 2001. Yedi bitkinin elektron spin rezonans spektroskopisi ve B16 hücresi antiproliferatif davranışları ile ölçülen serbest radikal yakalama aktiviteleri. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 49, 3321-3327.
- Canfield, LM, Valenzuela, JG, 1993. Kooksidasyonlar, in vivo karotenoid etki için önem. *Yıllık New York Akademik Bilim*, 691, 192-199.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., Arnao, MB, 2002. Çevrimiçi antioksidan aktivite belirleme: ABTS.+ testi kullanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktivitenin karşılaştırılması. *Redoks Raporu*, 7, 103-109.
- Cano, A., Hernandez-Ruz, J., Garca-Canovas, F., Acosta, M., Arnao, MB, 1998. Bitki materyalindeki toplam antioksidan aktivitenin tahmini için bir son nokta yöntemi. *Fitokimyasal Analiz*, 9, 196-202.
- Carter, N., Hewertt-Emmentt, D., Jeffery, S., Tashian, RE, 1981. Sığırcan karaciğerinin testosteron kaynaklı sülfonamid dirençli karbonik anhidraz izozimi, iskelet kası karbonik anhidraz III'ten ayrırt edilemez. *FEBS Mektupları*, 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, Baçkent Matbaacı İlişkileri, Ankara.
- Champe, PC ve Harvey, RA, 1997. Biyokimya.
- Chegwidden, WR, Edwards, Y., Carter, N., 2000. Karbonik anhidraz-yeni ufuklar. kalıtsal hastalıkların moleküler bazları (Scriver, CR, Beaudet, AL, Sly, WS ve Valle, D.) 8. Baskı, 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Chen, CJ, Cheng, FC, Liao, SL, Chen, WY, Lin, NN, Kuo, JS, 2000. Naloxone'un sıçan serebral iskemisi/reperfüzyonunda laktat, piruvat metabolizması ve antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkileri. Nörobilim Mektupları, 287, 113-116.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L., Akesson, B., 2003. Spektrofotometrik ve amperometrik yöntemlerle analiz edilen sığır sütünün antioksidan kapasitesi. Uluslararası Süt Dergisi, 13, 927-935.
- Chen, Y., Aviad, T., 1990. Hüyük maddelerin bitki okumaları na etkileri. uluslararası hüyük madde topluluğu tarafı ndan desteklenen sempozyum tutanakları, Chicago Illinois, 2 Aralık 1985 (Düzenleyen: P. MacCorty ve diğeri, 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. Bakır ve demir, miyokardiyal iskemiyi takiben harekete geçirilir: doku yaralanması için olası üretici kriterler. Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları, 90, 1102-1106.
- Chiara, G. And Gessa, GL, 1978. Apomorfinin farmakolojisi ve nörokimyası. Farmakoloji ve Kemoterapideki Gelişmeler, 15, 87-160.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M., 1991. Bazı doğal fenolik antioksidanların peroksi ve hidroksil radikal süpürücü aktivitesi. American Oil Chemical Society Dergisi, 68, 307-330.
- Christie, KN, Thomson, C., Xue, LZ, Lucocq, JM, Hopwood, D., 1997. Karbonik anhidraz izoenzimleri I, II, III ve IV insan yemek borusu epitelinde mevcuttur. Histokimya ve Sitokimya Dergisi, 45, 35-40.
- Ciani, E., Groneng, L., Voltattorni, M., Rolseth, V., Contestabile, A. ve Paulsen, R. E., 1996. Beyin Araştırmaları, 728, 1-6.
- Cuatracases, P., 1970. Afinitive kromatografisi ile protein saflaştırması. Agaroz ve poliakrilamid boncuklarını türevleri. Journal of Biological Chemistry, 245-3059.
- Çakır, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yıldırım, A., 2006. Antioxidant activities of the extracts and components of Teucrium orientale L. var. orientale. Turkish Journal of Chemistry, 30, 1-12.
- Çelik, G., 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, G., Gülçin, G., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 30, 2257-2261.

- Çoban, TA, Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci D., 2008. Etanolün karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibitör etkisi: in vivo ve in vitro çalışmaları. *Enzim Engelleme ve Tıbbi Kimya Dergisi*, 23, 266-270. Çoban, A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, CT, 2009. Sildenafil, memeli karbonik anhidraz izoformları I-XIV'ün güçlü bir aktivatörüdür. *Biyorganik ve Tıbbi Kimya*, 15;17, 5791-5.
- Dargel, R., 1992. Lipit peroksidasyonu-yaygın bir patogenetik mekanizma mı? *Deneysel ve Toksikolojik Patoloji*, 44, 169-181.
- Davies, KJA, 2000. Oksidatif stres, antioksidan savunmalar ve hasar giderme, onarım ve değiştirme sistemleri. *Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Life*, 50, 279-289.
- Denyer, SP ve Stewart, GSAB, 1998. Dezenfektanların etki mekanizmaları. *Uluslararası Biyolojik Bozulma Biyolojik Bozunma*, 248.
- Devlin, TM, 2002. Klinik korelasyonlu biyokimya. Kanada.
- Dinis, TCP, Maderia, VMC, Almeida, LM, 1994. Fenolik türevlerin (Asetaminofen, Salisilat ve 5-aminosalisilat) membran lipid peroksidasyonunun inhibitörleri ve peroksil radikal temizleyiciler olarak etkisi. *Biyokimya ve Biyofizik Arşivleri*, 315, 161-169.
- Diplock, AT, 1997. İyi periler lütfen bize E vitamininin insan dejeneratif hastalıkları azalttığı kanıtlayacaklar mı? *Serbest Radikal Araştırması*, 27, 511-532.
- Disilvestro, RA, 2001. Antioksidan olarak flavonoidler. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, s:127-138 Edit: Wildman, REC, CRC Press, ISBN: 0 8493 8734 5, ABD.
- Dizdaroğlu, M., 1991. Serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarını kimyasal olarak belirlenmesi. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 10, 225-242.
- Dizman, M., 2008. Hümkik asitler ve insan sağlığı, www.humikasit.blogspot.com.
- El-Bachá, RS, Daval, J., Koziel, V., Netter, P. ve Minn, A., 2001. Apomorfinin sıçan kültürlü nöronlar ve glial C6 Hücreleri üzerindeki toksik etkileri ve antioksidanlarla koruma. *Biyokimyasal Farmakoloji*, 66, 73-85.
- Endo, Y., Usuki, R., Kareda, T., 1985. Karanlıkta yağların otoksidasyonu üzerine klorofil ve feofitin antioksidan etkileri II. *American Oil Chemists Society Dergisi*, 62, 1387-1390.
- Ergün, A., Tuncer, G.D., Çolpan, G., Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükerman M.K., Küçükerman, S., Önel, A.G., Muğlalı, Ö.H., Şehin, A., 2002. Yemler, yem hijyeni ve teknolojisi. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Pozitif Matbaacılık, 465, Ankara.
- Faden, AI, 1988. Merkezi sinir sistemi hasarını sıçanlarda tiotropin salınan hormon ve opiat reseptör antagonistlerinin rolü. *Gelişmiş Nevroloji*, 47, 531-546.
- Falkbring, SO, Göthe, PO, Nyman, L., Porath, J. 1972. Afinité kromatografisi karbonik anhidraz. *FEBS Mektupları*, 24, 229.
- Fallis, RJ, Fisher, M. ve Lobo, RA, 1983. Akut inme tedavisi. *İnme*, 15, 627-629.
- Feldstein, JB, Silverman, DN, 1984. Sıçan tükürüğünden karbonik anhidrazın saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.

- Fernley, RT, Wright, RD, Coghlan, JP, 1988. Koyun tükürük karbonik-anhidrazı nı n tam amino asit dizisi. *Biyokimya*, 27, 2815-2820.
- Fidan, F.A., Dündar, Y., 2007. Yucca schidigera ve içerdği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipkolesterolemik ve antioksidan etkileri, *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47, 31-39.
- Flohe, RB, Traber MG, 1999. E Vitamini: fonksiyon ve metabolizma. *FASEB Dergisi*, 13, 1145-55.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. Antioksidan aktiviteyi ölçme yöntemi ve bunun şarapları n antioksidan kapasitesini izlemeye uygulanması . *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 47, 1035-1040.
- Foo, LY, Porter, LJ, 1981. Yenilebilir bazı meyvelerin tanenlerinin yapı sı . *Günlük Bilim Gıda Tarım*, 32, 711-716.
- Frel, B., 1994. İnsan sağlığı ve hastalığı nda doğal antioksidanlar, *Academic Press*, 387-409. *Sandiego*.
- Fresht, A., 1999. Protein biliminde yapı ve mekanizma. *WH Freeman ve Şirket*, 166 New York.
- Fridovich, I., 1983. Süperoksit radikali: endojen bir toksik. *Yıllık Gözden Geçirme Farmakoloji ve Toksikoloji*, 23, 239-257.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. Paramanyetik bir gaza adaptasyon. *Biyolojik Kimya Dergisi*, 264, 7761-7764.
- Gancher, ST, Woodward, WR, Boucher, B., Nutt, JG, 1989. İnsanlarda apomorfinin periferik farmakokinetiği. *Annals of Neurology*, 26, 232-238.
- Gaoni, Y., And Mechoulam, R., 1971. Esrardan delta-1-tetrahidrokanabinol ve diğer nötr kanabinoidlerin izolasyonu ve yapı sı . *American Chemical Society Dergisi*, 93, 217-224.
- Gardner, PR, Fridovich, I., 1992. Escherichia coli'de akonitazı n inaktivasyonu-reaktivasyonu. Hassas bir süperoksit radikal ölçüsü. *Biyolojik Kimya Dergisi*, 267, 8757-8763.
- García-Parrilla, MC, 2008. Akdeniz diyetinde antioksidanlar. *Klinik Beslenme Tıpı*, 3, 129-140.
- Gassen, M., Glinka, Y., Pinchasi, B., Youdim, MB, 1996. Apomorfin, sı çan beyninin mitokondriyal fraksiyonunda oldukça güçlü bir serbest radikal temizleyicidir. *Avrupa Farmakoloji Dergisi*, 308, 219-225.
- Gezici, O., 2004. Hümk asitlerin katı faz ekstraksiyon sisteminde kullanımı , *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya*.
- Gil, MI, Ferreres, F., Tomas-Barberan, FA, 1999. Taze kesilmiş ı spanağı n antioksidan bileşenleri (flavonoidler ve C vitamini) üzerinde hasat sonrası depolama ve işlemenin etkisi. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 47, 2213-2217.
- Gil, MI, 2000. Nar suyunun antioksidan aktivitesi ve bunun fenolik bileşim ve işleme ile ilişkisi. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 48, 4581-4589.
- Gözükara, E., 1997. Enzimler. *Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. ęti. Ankara*.
- Graham, DG, 1978. Nöromelanin ve sitotoksik kinonları n oluşumunda katekolaminler için oksidatif yollar. *Molecular Pharmacology*, 14, 633-643.

- Gülçin, Ğ., 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. Karabiber (*Piper nigrum*) tohumları nın antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleri. Uluslararası Gıda Bilimleri ve Beslenme Dergisi, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2006a. Kafeik asidin (3,4-dihidroksisinnamik asit) antioksidan aktivitesi. Toksikoloji, 217, 213-220.
- Gülçin, İ., 2006b. L-Carnitine'in antioksidan ve antiradikal aktiviteleri. Yaşam Bilimleri, 78, 803-811.
- Gülçin İ., 2007. L tirozin ve L-Dopa'nın in vitro antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin karşılaştırılması. Amino Asitler, 32, 431-438.
- Gülçin, İ., Daştan, A., 2007. Dimerik fenol türevlerinin sentezi ve in vitro antioksidan ve radikal yakalama aktivitelerinin belirlenmesi. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22, 685-695.
- Gülçin, İ., 2008. Melatonin ve serotoninin antioksidan yeteneğinin DMPD ve CUPRAC yöntemleriyle troloks eşdeğeri olarak ölçülmesi. Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry, 23, 871-876.
- Gülçin, İ. 2009a. L-Adrenalinin antioksidan aktivitesi: Bir aktivite yapısal anlayışı. Chemico-Biological Interaction, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., 2010. Resveratrolün antioksidan özellikleri: yapısal-aktivite anlayışı. Yenilikçi Gıda Bilimi ve Gelişmekte Olan Teknolojiler, 11, 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Gıda bileşenlerinin antioksidan aktivitesine genel bir bakış. İnceleme, Toksikoloji Arşivleri, 86, 345-391.
- Gülçin, Ğ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu Ö.Ğ., 2002. On the in vitro antioxidant properties of melatonin. Journal of Pineal Research, 33, 167-171.
- Gülçin Ğ., Büyükokuroğlu M.E., Küfrevioğlu Ö.Ğ., 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. Journal of Pineal Research, 34, 278- 281.
- Gülçin, Ğ., Beydemir, Ğ., Alici, H.A., Elmastağ, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. In vitro antioxidant properties of morphine. Pharmacological Research, 49, 59-66.
- Gülçin, G., gat, G.G., Beydemir, g., Küfrevioğlu, Ö.G., 2004b. Brokoli (*Brassica oleracea* L.) özlerinin in vitro antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi, İtalyan Gıda Bilimi Dergisi, 16, 17-30.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Büyükokuroğlu ME, 2004c. Dantrolenin karbonik anhidraz enzim aktiviteleri üzerindeki in vitro ve in vivo etkileri, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, 613-616.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R. 2004d. Sarmaşıktan izole edilen saponinlerin antioksidan aktivitesi: a-Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E ve hederacolchiside F. Planta Medica, 70, 561-563.
- Gülçin, İ., Alıncı, HA, Cesur, M., 2005a. Propofolün in vitro antioksidan ve radikal yakalama aktivitelerinin belirlenmesi. Kimya ve İlaç Bülteni, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., Berashvili, D., Gepdiremen, A., 2005b. Perilla pankinensis decne'den toplam antosiyaninlerin antiradikal ve antioksidan aktivitesi. Etnofarmakoloji Dergisi, 101, 287-293.

- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., 2006a. Saçak ağacı ndan (*Chionanthus virginicus* L.) lignanları n antioksidan aktivitesi. *Avrupa Gıda Araştırması ve Teknolojisi*, 223, 759-767.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006b. Hedera colchica meyvelerinden izole edilen bir triterpenoid glikozidin antioksidan aktivitesi: 3-O-(bD glukopiranosil)-hederagenin. *Fitoterapi Araştırması*, 20, 130-134.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., Köksal, E., 2007a. Saçak ağacı (*Chionanthus virginicus* L.) ekstraktları nı n antioksidan aktivitesi üzerine karşı laştı rmalı bir çalı şma . *Afrika Biyoteknoloji Dergisi*, 6, 410-418.
- Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, HY, 2007b. *Verbascum oreophilum* C.KOCH var . *joannis. Biyolojik Bilimler Araştırma Dergisi*, 2, 372-382.
- Gülçin, İ., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O., 2009. Bir su bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri: su mercimeği (*Lemna minor* L.). *Türk Tarım ve Orman Dergisi*, 37, 175-188.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, HM, Bilsel, M., Gören, AC, 2010. Erzurum, Türkiye'den liyofilize sulu propolis ekstraktı nı n polifenol içeriği ve antioksidan aktivitesi. *Gıda ve Kimyasal Toksikoloji*, 48, 2227-2238.
- Gülçin, Ğ., Topal, F., Çakmakçı , R., Gören, A.C., Bilsel, M., Erdoğan, U., 2011a. Ahududuları n (*Rubus idaeus* L.) evcilleştirilmiş ve üç yabancı ekotip formunun pomolojik özellikleri, beslenme kalitesi, polifenol içerik analizi ve antioksidan özellikleri . *Gıda Bilimi Dergisi*, 76, 585-593.
- Gülçin, J., Topal, F., Öztürk Sarı kaya, SB, Bursal, E., Gören, AC, Bilsel, M., 2011b. Muşmulanı n (*Mespilus germanica* L.) polifenol içerikleri ve antioksidan özellikleri . *Doğal Ürünlerin Kayı tları*, 5, 158-175.
- Gülçin, İ., Beydemir, ğ., 2012. Antioksidan olarak fenolik bileşikler: karbonik anhidraz izoenzim inhibitörleri. *Tı bbi Kimyada Mini İncelemeler*.
- Gündüz, T., 1998. Koordinasyon kimyası , *Gazi Kitabevi İkinci Baskı* , Ankara.
- Hagerman, AE, Riedl, KM, Jones, GA, Sovik, KN, Ritchard, NT, Hartzfeld, PW, Reichel, TL, 1998. Biyolojik antioksidanlar olarak yüksek moleküler ağı rlı klı bitki fenolikleri (tanenler). *Ziraat ve Gıda Kimyası Dergisi*, 46, 1887-1892.
- Halliwell, B., 1991. İlaç antioksidan etkileri. *İlaç*, 42, 569-605.
- Halliwell, B., 1994. Serbest radikaller ve antioksidanlar: Kişisel Bir Bakı ş. *Beslenme İncelemesi*, 52, 253-265.
- Halliwell, B., 1995. Antioksidan karakterizasyonu; metodoloji mekanizması . *Biyokimyasal Farmakoloji*, 49, 1341-1348.
- Halliwell, B., 1996. Oksidatif stres, beslenme ve sağlı k: insanlarda besinsel antioksidan alı mı nı n optimizasyonu için deneysel stratejiler. *Serbest Radikal Araştırması*, 25, 57-74.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC, 1984. Oksijen toksikolojisi, oksijen radikalleri, geçiş metalleri ve hastalı k. *Biyokimyasal Dergi*, 219, 1-4.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC, 1989. *Biyoloji ve tı pta serbest radikaller*, 2. baskı . Clarendon Bası n, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC, 1990. İnsan hastalı ğı nda serbest radikallerin ve katalitik metal iyonları nı n rolü: genel bir bakı ş. *Enzimolojide Yöntemler*, 186, 1-85.

- Halliwel, B., Chirico, S., 1993. Lipit peroksidasyonu: mekanizması , ölçümü ve önem. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715-725.
- Halliwel, B., Gutteridge, JMC, 1999. Biyoloji ve tı pta serbest radikaller. 3 üncü Baskı . Oxford University Press, New York.
- Hampson, AU, Grimaldi, M., Axelrod, J., Wink, D., 1998. Cannabidiol ve (-)Δ9 - tetrahidrokanabinol nöroprotektif antioksidanlardı r. *Ulusal Bilim Akademisi Bildiri Kitabı* , 95, 8268-8273, ABD.
- Handal, KA, Schauben, JL ve Salamone, FR, 1983. Naloxone. yı llı kları *Acil Tı p*, 12, 438-445.
- Harborne JB, 1964. Fenolik bileşiklerin biyokimyası , Academic Press, 618, New York.
- Haugaard, N., 1968. Oksijen toksisitesinin hücrese mekanizması . *Fizyoloji İncelemesi*, 48, 311-373.
- Hazen, SA, Waheed, A., Sly, WS, LaNoue, KF, Lynch, CJ, 1996. Adipositlerde piruvat karboksilasyonda CA V'nin farklı laşmaya bağı lı ifadesi ve karbonik anhidraz izozimlerinin rolü. *FASEB Dergisi*, 10, 481-490.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, BR, Shah, GN, Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, JM, Vihinen, M., Sly, WS , Parkkila, S., 2005. GPI bağı lantı lı yeni bir karbonik anhidraz formu olan CA XV'nin karakterizasyonu. *Biyokimyasal Dergi*, 392, 83-92.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, CT, 2005a. Gökkuş ağı alabalı ğı nı n (Oncorhynchus mykiss) düşük moleküler ağı rlı klı plazma inhibitörlerinin in vitro insan eritrositleri karbonik anhidraz-II izozim aktivitesi ve in vivo sı çan eritrositleri üzerindeki etkisi . *Enzim İnhibisyonu ve Tı bbi Kimya Dergisi*, 20, 35-39.
- Hisar, O., Beydemir, ğ., Gülçin, Ğ., Aras Hisar, ğ., Yanı k, T., Küfrevioğlu, Ö.Ğ., 2005b. Gökkuş ağı alabalı ğı (Oncorhynchus mykiss) eritrositlerinde melatonin hormonunun karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerine etkisi in vitro ve in vivo. *Türk Veterinerlik ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 29, 841-845.
- Hochstein, P., Atallah, AS, 1988. Mutasyon ve kanser inhibisyonunda oksidanları n doğası ve antioksidan sistemler. *Mutasyon Araştı rması* , 202, 363-375.
- Howlett, AC, 1987. Adenilat siklazı n kannabinoid inhibisyonu: esrar bileşenlerinin ve metabolitlerinin nispi aktivitesi. *Nörofarmakoloji*, 26, 507-512.
- Hua, SST, Grosjean OK, Baker JL, 1999. Tarafı ndan aflatoksin biyosentezinin inhibisyonu fenolik bileşikler. *Uygulamalı Mikrobiyolojide Mektuplar*, 29, 289-291.
- Huang, D., Ou, B., Prior RL, 2005. Antioksidan kapasite analizlerinin arkası ndaki kimya. *Dergi Tarı msal Gı da Kimyası* , 53, 1841-1856.
- Hudson, BJF, 1990, Gı da antioksidanları . Elsevier Applied Science, Londra ve Yeni York, 1-316.
- Hunaiti, AA, Soud, M., 2000. Kurşun konsantrasyonunun insan kanı ndaki glutatyon, glutatyon s-transferaz, redüktaz ve peroksidaz düzeyine etkisi. *Toplam Çevre Bilimi*, 248, 45-50.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., 1983. Biberiye (*Rosemarinus officinalis* L.) ve türevlerinin bileşenlerinin antioksidan etkisi . *Zirai Biyoloji ve Kimya*, 47, 521-528.

- Innocenti, A., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, CT, 2008. Karbonik anhidraz inhibitörleri: izozim seçici inhibitörler elde etmek için tioksolona karşı sülfonamidler? *Biyoorganik ve Tıbbi Kimya Mektupları*, 18, 3938-3941.
- Innocenti, A., Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, CT, 2010. Karbonik anhidraz inhibitörleri. Antioksidan polifenoller, memeli izoformları nı etkili bir şekilde inhibe eder I XV. *Biyoorganik ve Tıbbi Kimya Mektupları*, 20, 5050-3.
- Iwahara, S., 1983. Veratril tipi bileşiklerin bozulmaması ş fusarium hücreleri tarafı ndan metabolizması *Mokuzai Gakkaishi* 29, 329-335.
- Jabusch, JR, Deutsch, HF, 1989. p-nitrofenil asetat ile reaksiyona giren ubikuitin içinde aktillenmiş lizinlerin lokalizasyonu. *Biyokimya ve Biyofizik Arşivleri*, 238, 170-177.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, JM, 2003. İran Ocimum katı lı mları nı n antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik içeriği . *Gı da Kimyası*, 83, 547-550.
- Jongen, W., 2002. Kaliteyi artı ran meyve ve sebze işleme. 25-39-40.
- Jovanovic, SV, Steenken, S., Boone, CW, Simic, MG, 1999. H-atom transferi, kurkuminin tercih edilen bir antioksidan mekanizması dı r. *American Chemical Society Dergisi*, 121, 9677-9681.
- Juven, B., Henis, Y., 1970. Zeytin fenolik bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine araştı rmlar. *Uygulamalı Bakteriyoloji Dergisi*, 33, 721-32.
- Kahkönen, MP, Hopia, AI, Vuorela, HJ, Rauha, JP, Pihlaja, K., Kujala, TS, Heinonen M., 1999. Fenolik bileşikler içeren bitki ekstraktları nı n antioksidan aktivitesi. *Tarı m ve Gı da Kimyası Dergisi*, 47, 3954-3962.
- Karadeniz, F., 2006. Domates ve havuçta karotenoid madde dağı lı mı ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştı rma Projeleri, Proje No: 20030711077*.
- Kaviarasan, S., Naik, GH, Gangabthagirathi, R., Anuradha, CV, Priyadarsini, KI, 2007. Çemen otu (*Trigonella foenum graecum*) tohumları nı n antiradikal ve antioksidan aktiviteleri üzerine in vitro çalı şmalar . *Gı da Kimyası*, 103, 31-37.
- Kawabata, J., Okamoto, Y., Kodama, A., Makimoto, T., Kasai, T., 2002. DPPH radikal süpürme reaksiyonunda protokatekuik ve gallik esterlerden üretilen oksidatif dimerler. *Gı da ve Tarı m Bilimleri Dergisi*, 50, 5468-5471.
- Kazazica, SP, Butkovic, V., Srazica, D., 2006. Fe⁺ ve Cu⁺ iyonları nı n bazı flavonoidlerle gaz fazı lı gasyonu . *Tarı m ve Gı da Kimyası Dergisi*, 54, 8391-8396.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.Ğ., 2004. *Biyokimya, Aktif Yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Kersten, PJ, Tien, M., Kalyanaraman, B. ve Kirk, TK, 1985. *Fanerochaete chrysosporium*'un ligninazı , metoksibenzenlerden katyon radikalleri üretir. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 2609-2612.
- Khaliulin, I., Borman, JB, Chevion, M. ve Schwalb, H., 2003. Apomorfinin kardiyoprotektif ve antioksidan etkileri. *Serbest Radikal Araştı rması*, 37, 721-730.
- Kılı nç, K., Kılı nç, A., 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tı p Dergisi*, 33, 110-118.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, BE, Ferry, JG, Rees, DC, 1996. *Archaeon methanosarcina thermophila*'dan bir karbonik anhidrazı n kristal yapı sı tarafı ndan ortaya çı karı lan solak bir beta sarmalı . *EMBO Dergisi*, 15, 2323-2330.

- Kneepkens, CM, Lepage, G., Roy, CC, 1994. Lipit peroksidasyonunun bir ölçüsü olarak hidrokarbon nefes testinin potansiyeli. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 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, Ğ., 2008. antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) *Türk Tarım ve Orman Dergisi*, 32, 65-78.
- Köksal, E., Gülçin, Ğ., 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, SR, Suraveratum, N., Rochanakij, S. ve Krungkrai, J., 2001. Plasmodium falciparum'da karbonik anhidrazın karakterizasyonu. *Uluslararası Parazitoloji Dergisi*, 31, 661-668.
- Laemmli, DK, 1970. Bakteriyofaj T4'ün başını montajı sırasında yapısal proteinlerin bölünmesi. *Doğa*, 227, 680.
- Lakkis, MM, Bergenhem, NCH, Tashian, RE, 1996. Fare karbonik anhidraz VII'nin e-coli'de ifadesi ve CO2 hidraz aktivitesinin gösterilmesi. *Biyokimyasal ve Biyofiziksel Araştırma Bildirileri*, 226, 268-272.
- Larson, RA, 1988. Yüksek bitkilerin antioksidanları. *Fitokimya*, 27, 969-978.
- Lavelli, V., Hippeli, S., Peri, C., Elstner, EF, 1999. Taze ve havada kurutulmuş domateslerin radikal süpürme aktivitesinin üç model reaksiyonla değerlendirilmesi. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 47, 3826-3831.
- Lehninger, AL, 1993. *Biyokimyanın İlkeleri*, New York, Worth Publishers Inc., 2. Baskı, 198-239.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Principles of biochemistry*, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılcık N.), Palme Yayıncılık.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, AEMF, Rietjens, IMCM, 2001. pH'nin antioksidan özelliklerindeki etkisi ve hidroksiflavonların antioksidan etki mekanizmaları. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 31:869-881.
- Liang, YJ, Lipscom, WN, 1991. İnsan karbonik anhidraz II'ye bağlanan substrat ve inhibitör: teorik bir çalışma. *Karbonik anhidrazdaki inhibitörler*. *Biyokimya ve Fizyoloji ve Klinik Tıp*. VCH Yayıncıları, Weinheim, 50-64.
- Lindskog, S., 1997. Karbonik anhidrazın yapı ve mekanizması. *Farmakoloji ve Terapötikler*, 74, 1-20.
- Lindskog, S., Henderson, LE, 1971. Karbonik anhidraz. *Enzimler*, 5.3. New York, Academic Press, 587.
- Lindskog, S., Engberg, P., Forsman, C., İbrahim, SA, Jonsson, BH, Simonsson, I., Tibell, I., 1984. Karbonik-anhidraz izoenzimlerinin kinetiği ve mekanizması. *New York Bilimler Akademisi Yıllıkları*, 429, 61-75.
- Liochev, SI, Fridovich, I., 1995. Glikoz oksidazdan veya nitrobluedan süperoksit tetrazolyum. *Biyokimya ve Biyofizik Arşivi*, 318, 408-410.
- Loeckie, L., De Zwart, John, H., 1999. Hayvanlarda ve insanlarda serbest radikal hasar uygulamalarını biyobelirteçleri. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp* 26, 202-226.

- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., Horn, TF, 2003. Oxyresveratrol ve resveratrol, güçlü antioksidanlar ve serbest radikal temizleyicilerdir; migroglial hücrelerden elde edilen nitro sativ ve oksidatif stres üzerindeki etkisi. Nitrik Oksit, 9, 46-76.
- MacDonald-Wicks, LK, Wood, LG, Garg, ML, 2006. İn vitro biyolojik antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için metodoloji: bir gözden geçirme. Gıda ve Tarım Bilim Dergisi. 86, 2046-2056.
- MacDougall, DB, 2002. Kaliteyi artırıcı gıdalarda renk. Woodhead Yayıncılık Sınırlı, 179-221. Cambridge, İngiltere.
- Magalhães, LM, Segundo, MA, Reis, S., Lima, JLFC, 2008. Antioksidan özelliklerin in vitro değerlendirilmesine ilişkin metodolojik yönler. Analytica Chimica Acta, 613, 1-19.
- Magalhães, LM, Santos, M., Segundo, MA, Reis, S., Lima, JLFC, 2009. Antioksidan kapasitenin hızlı taranması için akış enjeksiyonuna dayalı yöntemler. Talanta, 77, 1559-1566.
- Magid, E., 1968. İnsan eritrosit karbonik anhidraz B ve C'nin dehidrasyon kinetiği. Biochimica et Biophysica Acta, 151-239.
- Majeau, N., Coleman, JR, 1994. Bezelyede karbonik anhidraz ve ribuloz 1.5 bishfosfat karboksilaz/ oksijenaz ifadesinin korelasyonu. Bitki Fizyolojisi, 104, 1393-1399.
- Malo, C., Wilson, JX, 2000. Glikoz, yetişkin insan ince bağırsak acelesiz zarı veziküllerinde c vitamini taşıması modüle eder. Beslenme Dergisi, 130, 63-69.
- Mansbach, RS, Rovetti, CC, Winston, EN ve Lowe, JA. Psikofarmakoloji, 124, 315-22.
- Maren, TH 1960. Karbonik anhidraz ve 1+5 inhibitörlerinin belirlenmesi için basitleştirilmiş bir mikro yöntem. Farmakoloji ve Deneysel Terapötikler Dergisi, 160, 26.
- Maren, TH, 1967. Karbonik anhidraz; kimya, fizyoloji ve inhibisyon. fizyolojik. İncelemeler, 47, 595-781.
- Maren, TH, Conto, ED, 1979. İnsan kırmızı hücre karbonik anhidrazını n anyon inhibisyonunun doğası. Biyokimya ve Biyofizik Arşivleri, 196-501.
- Maren, TH, Conroy, CW, Wynns, GC, Godman, DF, 1997. Yüksek moleküler ağırlıklı bir karbonik anhidraz inhibitörünün böbrek ve beyin omurilik sıvısı oluşumu farmakolojisi. Farmakoloji ve Deneysel Terapötikler Dergisi, 280, 98-104.
- Massie, BM, Szlachcic, Y., Tabau, JF, 1993. Asemptomatik hipertansiyonda sessiz koroner arter hastalığı için sintigrafik ve elektrokardiyografik kanıtı: bir vaka kontrol çalışması. Amerikan Kardiyoloji Koleji Dergisi, 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-Konu, D., Müller, N., 2008. Karvakrol, timol ve öjenol türevlerinin antioksidan ve biyolojik aktiviteleri üzerine karşılaştırmalı çalışma. Tarımsal Gıda Kimyası Dergisi, 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, SP, 1995. Çeşitli yaşlanan yaprakları n oksidatif savunma sistemlerinde sulu indirgeyici bileşiklerin belirlenmesi ve katı lı mı . Tarı m ve Gı da Kimyası Dergisi, 43, 1813-1819.
- Melis, MR, Succu, S., Sanna, F., Boi, A., Argiolas, A., 2009. Amigdalanı n ventral subikulumuna veya posteromedial kortikal çekirdeğine enjekte edilen oksitosin, penil ereksiyona neden olur ve çekirdekte hücre dı şı dopamin seviyelerini artı rı r erkek farelerin akkumbensleri. Avrupa Nörobilim Dergisi. 30, 1349-57.
- Miguel, MG, 2010. Tı bbi ve aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesi. Bir inceleme. Lezzet ve Koku Dergisi, 25, 291-312.
- Miller, DD, 1996. Mineral gı da kimyası , Fennema, OR (Ed.), Dekker: New York, 618-649.
- Miller, NJ, Rice-Evans, CA, Davies, MJ, Gopinathan, V., Milner, A., 1993. Antioksidan kapasiteyi ölçmek için yeni bir yöntem ve prematüre yenidoğanlarda antioksidan durumunu izlemek için uygulanması . Clinical Science, 84, 407-412.
- Miller, NJ, Sampson, J., Candeias, LP, Bramley, PM, Rice-Evans, CA, 1996. Karotenlerin ve ksantofillerin antioksidan aktiviteleri. FEBS Mektupları , 384, 240-242.
- Min, DB, 1998. Yenilebilir yağı n lipid oksidasyonu. Food lipits chemistry, Nutrition, and biotechnology içinde, Akoh, CC, Min, DB, (Eds), Marcel Dekker, New York, 283-296.
- Moure, A., Cruz, JM, Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, MJ, Parajo, JC, 2001. Artı k kaynaktan doğal antioksidanlar. Gı da Kimyası , 72, 145-171.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Bazı ticari balları n, arı sütünün ve propolisin antioksidan aktiviteleri. Gı da Kimyası , 75, 237-240.
- Nair, SK, Ludwig, PA, Christianson, DW, 1994. Bir karbonik anhidraz olarak fenol inhibitör. American Chemical Society Dergisi, 116, 3659-3660.
- Namiki, M., 1990, Gı dalarda antioksidanlar/antimutajenler. Gı da Biliminde Eleştirel İncelemeler ve Beslenme, 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, WE, Frankel, EN, Weisleder, D., 1981. Otoksidize lipidlerin yüksek basınçlı sı vı kromatografisi: II. Metil linolenattan hidroperoksi-siklik peroksitler ve diğer ikincil ürünler. Lipitler 16, 439-448.
- Nishimori, I., 2004. Karbonik anhidrazda akatalitik CA'lar, karbonik anhidrazla ilgili proteinler, inhibitörleri ve aktivatörleri (Supuran, CT, Scozzafava, A., ve Conway, J., Eds.) 24-43, CRC Press, Boca Raton , FL.
- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., 2005. 1,1,-difenil-2-pikrilhidrazilin (DPPH) indirgeyici olmayan peroksiradikal ile temizlenmesi: kantitatif analiz için yararlı bir yöntem peroksiradikal. Kimya ve İlaç Bülteni, 53, 714-716.

- Nisihina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T., 1991. Rumex japonicus'ta antioksidan bileşen, muisin, houtt. American Oil Chemists Society Dergisi, 68, 735-739.
- Nizamli oğlu, 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. Mitokondri kendiliğinden ve kalıcı bir reaktif oksijen türü kaynağı mıdır? Redoks Raporu, 8, 135-141.
- Oksay, T., 2006. Rat hiperhomosisteinemi modelinde kavernozaal 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 oftalmoloji. 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, EK, Prior, RL, Huang, D., 2002a. Prob olarak floresan kullanarak hidroksil radikal önleme kapasitesi için yeni florometrik analiz. Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi, 50, 2772-2777.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, JA, Deemer, EK, 2002b. Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) ve ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) deneyleri kullanılarak yaygın sebzelerin antioksidan aktivitelerinin analizi: karşılaştırılabilir bir çalışma. Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi, 50, 3122-3128.
- Ou, B., Prior, RL, Huang, D., 2005. Diyetdeki antioksidan kapasitesinin arkasındaki kimya deneyler. Ziraat ve Gıda Kimyası Dergisi, 53, 1841-1856.
- Oyaizu, M., 1986. Glikozdan hazırlanan esmerleşme reaksiyonu ürünü üzerine çalışmalar. Japon Beslenme Dergisi, 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. Biyoorganik ve Tıbbi Kimya Mektupları, 5, 4259-62.
- Pacific, RE, Davis, KJA, 1991. Oksidatif strese protein, lipid ve DNA onarım sistemi: yaşlanmanın serbest radikal teorisi yeniden ele alındı. Gerontoloji, 37, 166-180.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C., 2002. Altı maddenin radikal yakalama aktivitesi ile antioksidan aktivitesi arasındaki karşılaştırılabilirlik damıtılması ve damıtılması. Akdeniz bitkileri ve aromatik bitkiler. Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi, 50, 6882-6890.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran TC, 2004. Karbonik anhidrazlar: teknolojinin mevcut durumu. Terapötik Uygulamalar ve Gelecekteki Beklentiler, 3, 199-229.
- Patterson, BD, Atkins, CA, Graham, D., Wills, RBH, 1971. Karbonik anhidraz. Analitik Biyokimya, 44, 388-391.
- Payzın, S., 2000. Hipertansiyon ve damarlar. Türk Klinik Kardiyoloji, 13, 349-51.

- Pehlivan, M., Gülerüz, M., 2004. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 33, 51-57.
- Pekkarinan, SS, Heinonen, IM, Hopia, AI, 1999. Metil linoleatta antioksidanlar olarak flavonoidler quercetin, mirisetin, kaemferol ve (+)-kateşin. *Bilim ve Gıda Tarım Dergisi*, 79, 499-506.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del R., OD, Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Bitkisel besinlerin, içeceklerin ve tüketilen yağların toplam antioksidan kapasitesi İtalya'da üç farklı in vitro deneyle değerlendirilmiştir. *Beslenme Dergisi*, 133, 2812-2819.
- Pe'rez-Jime'nez, J., Saura-Calixto, F., 2005. Literatür verileri, tahılların gerçek antioksidan kapasitesini hafife alabilir. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 53:5036-5040.
- Peterson, RE, Tu, C., Linser, PJ, 1997. Zebra balığından (Danio rerio) bir karbonik anhidraz homologunun izolasyonu ve karakterizasyonu. *Journal of Molecular Evolution*, 44, 432-439.
- Picada, JN, Roesler, R., Henriques, JAP, 2005. Apomorfinin ve oksitlenmiş türevi 8-okso apomorfinin genotoksik, nörotoksik ve nöroprotektif aktiviteleri. *Brezilya Tıbbi ve Biyolojik Araştırma Dergisi*, 38, 477-486.
- Pietta, PG, 2000. Antioksidan olarak flavonoidler. *Doğal Ürünler Dergisi*, 63, 1035-1042.
- Popova, LP, Lazova. GN, 1993. Absicis asit ve jasmonik asidin, sikloheksiminde ve ahloramfenik ile etiyollenmiş bezelye fidelerinin karbonik anhidraz aktivitesi üzerindeki etkisi. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare Des Sciences*, 46, 101-104.
- Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., Artık, N., 2002. Türkiye'de Yetiştirilen Narlarda (Punica Granatum L.) Organik Asitler ve Fenolik Bileşikler. *Gıda Bileşimi ve Analizi Dergisi*, 15, 567-575.
- Prior, RL, Cao, G., 1999. İn vivo toplam antioksidan kapasitesi: farklı analitik yöntemlerin karşılaştırılması. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 27, 1173-1181.
- Prior, RL, Wu, XL, Schaich, K., 2005. Gıdalarda ve diyet takviyelerinde antioksidan kapasite ve fenoliklerin belirlenmesi için standartlaştırılmış yöntemler. *Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi*, 53, 4290-4302.
- Proteggente, AR, Kaldırma, AS, Ganga, G, Büren, LV, Wagner, E, Wiseman, S, Van de Put, F., Dacombe, C. ve Rice-Evans, C. 2002. Düzenli olarak tüketilen meyve ve sebzelerin antioksidan aktivitesi, fenolik ve C vitamini bileşimlerini yansıtır. *Serbest Radikaller Araştırması*, 36, 217-233.
- Pzedborski, S., Levivier, M., Raftopoulos, C., Naini, AB ve Hildebrand, J., 1995. Apomorfinin periferik ve merkezi farmakokinetiği ve insanlarda dopamin metabolizması üzerindeki etkisi. *Hareket Bozuklukları*, 10, 28-36.
- Quick, KL, Hardt, JI, Dugan, LL, 2000. Süperoksit temizleme etkinliği için hızlı mikropilaka testi. *Journal of Neuroscience Methods*, 97, 138-144.
- Raisanen, SR, Lehenkari, P, Tasanen, M, Rahkila, P, Harkonen, PL, Vaananen, HK, 1999. *FASEB Dergisi*, 13, 513-522.

- Re, R., Pellegrini, N., Protette, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Geliştirilmiş bir ABTS radikal katyon renk giderme testi uygulayan antioksidan aktivite. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 26, 1231-1237.
- Ren, S., Lien, EJ, 1997. Kansere kemopreventif ajanları olarak doğal ürünler ve türevleri. *İlaç Araştırması* nda İlerleme, 48, 147-71.
- Ren, XL, Lindskog, S., 1992. İnsan karbonik anhidraz-I tarafı ndan katalize edilen CO₂ hidrasyonunun tampon bağımlılığı. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 81-86.
- Rene, DT, Yolanda, V. ve Zeno, A., 2001. C vitamini eşdeğerleri olarak ölçülen meyve, sebze ve çayın antioksidan içeriğinin karşılaştırılması. *Toksikoloji*, 166, 63-69.
- Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, CT, 2000. İkincil amin parçalarını içeren karbonik anhidraz inhibitörleri, topikal sülfonamid antiglokom ajanları. *Biyorganik ve Tıbbi Kimya Mektupları*, 10, 673-676.
- Rice-Avans, CA, Miller, NJ, Bolwell, PG, Bramley, PM, Pridham, JB, 1995. Bitkiden türetilen polifenol flavonoidlerin nispi antioksidan aktiviteleri. *Serbest Radikal Araştırması*, 22, 375-383.
- Rice-Evans, CA, Miller, NJ, Paganga, G., 1996. Flavonoidlerin ve fenolik asitlerin yapı-antioksidan aktivite ilişkileri. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 20, 933-56.
- Richard, AL, 1992. Doğal olarak oluşan antioksidanlar, Boca Raton, Lewis Yayınları.
- Rickli, EE, Ghazanfar, SA, Gibbons, BH, Edsall, JT, 1964. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz. *Biyolojik Kimya Dergisi*, 239, 1065-1078.
- Rimbach, G., Pallauf, J., 1998. Fitik asit in vitro olarak serbest radikal oluşumunu inhibe eder, ancak büyüyen sıçanlarda karaciğer oksidan veya antioksidan durumunu etkilemez. *Beslenme Dergisi*, 128, 1950-1955.
- Roginsky, V., Lissi, EA, 2005. Gıdalarda zincir kırıcı antioksidan aktiviteyi belirlemeye yönelik yöntemlerin gözden geçirilmesi. *Gıda Kimyası*, 92, 235-254.
- Roughton, FJW ve Booth, VH, 1946. Substrat konsantrasyonunun, pH'ın ve diğer faktörlerin karbonik anhidrazın aktivitesi üzerindeki etkisi. *Biyokimyasal Dergi*, 40, 319.
- Ruch, RJ, Cheng, SJ, Klauning, JE, 1989. Çin yeşil çayı ndan izole edilen antioksidan kateşinler tarafı ndan sitotoksitenin önlenmesi ve hücreler arası iletişimin engellenmesi. *Karsinogenez*, 10, 1003-1008.
- Saija, A., 1995. Antioksidan maddeler olarak flavonoidler. *Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp*, 19, 481-486.
- Saija, A., Tomaino A., Trombetta, D., 1998. Flavonoidlerin in vitro deri geçirgenliği ve in vivo fotokoruyucu etkisi üzerinde farklı penetrasyon artırıcıları n etkisi. *Uluslararası Eczacılık Dergisi*, 175, 85-94.
- Saldamlı, G., 2007. Gıda kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, Ankara.
- Sanchez-Mareno, C., 2002. Gözden Geçirme: Gıdalarda ve biyolojik sistemlerde serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanılan yöntemler. *Uluslararası Gıda Bilimi ve Teknolojisi*, 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, PT, Schuster, GB, 1999. RNA/DNA hibrit duplekslerinde radikal katyon taşıması ve reaksiyonu: küresel yapı nın reaktivite üzerindeki etkisi. American Chemical Society Dergisi, 121:11027-11033.
- Schleisier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R., 2002. Farklı in vitro yöntemler kullanılarak antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi. Serbest Radikal Araştırması, 36, 177-187.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, LR, Gardner, PT, Heinonen, MI, Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., Mcphail, D., Skibsted, LH, Tijburg, L., 2001. İşlenmiş gıdaların lipid oksidasyonuna karşı korunması için bitki ekstraktlarını araştırmaları. radikal yakalama, lipid oksidasyonu ve temel antioksidan bileşiklerin analizine dayalı antioksidan deneylerinin karşılaştırılması. Avrupa Gıda Araştırması ve Teknolojisi, 212, 319-328.
- Segel, İH, 1968. Biyokimyasal hesaplamalar. John Wiley ve Sons Inc. 403, New York.
- Senn, TL, Kingman, AR, 1973. Humus ve humik asitlerin gözden geçirilmesi, Güney Karolina Tarımsal Deney İstasyonu, Clemson, SC, Araştırma Serisi Raporu No. 145.
- Serafoni, M., Del Rio, D., 2004. Diyet antioksidanları, redoks durumu ve hastalık arasındaki ilişkiyi anlamak: toplam antioksidan kapasitesi doğru araç mı? Redoks Raporu, 9, 145-152.
- Shahidi F., Janitha PK, Wanasundara PD, 1992. Fenolik antioksidanlar. kritik Food Science and Nutrition'da incelemeler, 32, 67-103.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Gıda fenolik kaynaklarını kimya etkileri uygulamaları. Technomic Yayınları, 235-277, ABD.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. Technomic Publishing Company Book, Lanchester, 199-225, ABD.
- Sherwin, ER, 1990. İçinde: Branen, AL, Davidson, PM, Salminen, S., (eds) Gıda katkı maddeleri, Marvel Dekker Incorporated, 139-193, New York.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., 2001. Doğal Antioksidanların Tanıtımı. Gıdalardaki antioksidanlar. Düzenleme: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., CRC Press, ISBN 1 85573 463, ABD.
- Sies, H., 1993. Antioksidan savunma stratejileri. Avrupa Biyokimya Dergisi, 215, 213-219.
- Simic, MG, Jovanovic, SV, 1994. Antikanserojen diyet fenolik bileşikler tarafından oksijen radikallerinin etkisizleştirilmesi. İçinde: Ho, CT, Osawa, T., Huang, MT, Rosen, RT (eds) Kanser önleme için gıda fitokimyasalları. Journal of American Chemical Society, 547, 20-32, Washington, DC.
- Skaper, SD, Bruani, A., Dal Toso, R., Petrelli, IL, Romanello, L., Facci, L. ve Leon, A., 1996. 3989.
- Skold, K., Twetman, S., Hallgren, A., Yücel Lindberg, T., Modeer, T., 1998, Klorheksidin/timol içeren verniğin dişeti oluşumunu etkisi. Avrupa Sözlü Bilimler Dergisi, 106, 571-575.
- Sly, SW, Hu, YP, 1995. İnsan karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz eksiklikler, Yıllık İncelemeler, 64, 375-401.
- Smith, EL, Lehman, IR, Lefkowitz, RJ, Handler, P., White, A., 1985. Biyokimyanın genel ilkeleri ilkeleri. yedinci baskı McGraw-Hill Kitap Şirketi, Hamburg, 179-240.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., 2007. Antioksidan ölçümleri. Fizyolojik Ölçümler. 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 Yılı Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Van.
- Söyüt H., 2006. Gökkuşuğu alabalığı (Oncorhynchus mykiss) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Spencer, KG, Kimpel, DL, Fisher, ML, Togasaki, K., Miyachi, S., 1983. Chlamydomonas reinhardtii II'de karbonik anhidraz. Bitki ve Hücre Fizyolojisi, 24, 301-304.
- Stadtman, ER, 2002. Oksidatif stres ve yaşlanmada bireyselliğin önemi. Özgür Radikal Biyoloji ve Tıp, 33, 597-604.
- Stom, DI ve Beym, AM, 1976. Fenollerin çeşitli alg türleri üzerindeki etkisi. Hidrobiyoloji Dergisi, 12, 43-46.
- Supuran, CT, 2004. Karbonik anhidrazlar: katalitik ve inhibisyon mekanizmaları, dağılım ve fizyolojik roller. Karbonik anhidrazda. İnhibitörleri ve aktivatörleri (Supuran, CT ve diğ., eds), CRC Press. 1-23.
- Supuran, CT, Manole, G., Andruh, M., 1993. Karbonik anhidraz inhibitörleri bölüm II. Heterosiklik sülfonamidlerin lantanitlerle koordinasyon bileşikleri, izozim I ve II'nin güçlü inhibitörleridir. İnorganik Biyokimya Dergisi, 49, 97-103.
- Supuran, CT, Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Capriou, MT, Maganu, M. ve Banciu, MD, 2000. Karbonik anhidraz inhibitörleri: furan-tiyofen içeren sülfonamidler ve pirol-karboksamido grupları, sulu süspansiyonlar olarak güçlü topikal göz içi basıncı düşürme özelliklerine sahiptir. Biyorganik ve Tıbbi Kimya, 8, 2145-2155.
- Supuran, CT ve Scozzafava, A., 2001. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri. Güncel Tıbbi Kimya, 1, 61-97.
- Sültemeyer, D., Schmidt, C., Fock, HP, 1993. Yüksek bitkilerde ve suda yaşayan mikroorganizmalarda karbonik anhidrazlar. Physiologia Plantarum., 88, 79-180. Şentürk, M., Gülçin, İ, Daştan A., Küfrevioğlu, Ö.İ. Supuran CT, 2009. Karbonik anhidraz inhibitörleri. İnsan eritrosit izozimleri I ve II'nin bir dizi antioksidan fenol ile inhibisyonu. Biyoorganik ve Tıbbi Kimya, 17, 3207-3211.
- Tan, KH, 1994. Çevresel Toprak Bilimi, 159-177, Dekker, New York.
- Tan, KH, Bringer, A., 1986. Humik Asitin Mırsırlar Bitkilerinde Alüminyum Toksisitesi Üzerine Etkisi. Toprak Bilimi, 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 Anabilim Dalı, Tokat.
- Topkafa, M., 2006. Gmmobilize hümmik 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. Zeytinyağının fenolik bileşikleri: Yapı, biyolojik aktivite ve insan üzerindeki faydalı etki sağlığı. Beslenme Araştırma İncelemeleri, 18, 98-112.

- Tümer Ö.L., 2006. Bazı nar çeğitlerinin olgunlaşma aşamaları nda fenolik bileşik miktarları ndaki değışimler, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Ubeda, A., Montesinos, C., Payá, M. And Alcaraz, MJ, 1993. Apomorfine ve bazı ilgili benzilzokinolinlerin demir indirgeme ve serbest radikal yakalama özellikleri. Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp, 15, 159-167.
- Vaklinova, SG, Goushtina, LM, Lazova, GN, 1982. Kloroplastlarda ve kloroplast fragmanları nda karbonik anhidraz aktivitesi. Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences, 37, 677-680.
- Van den Berg, R., Haenen, GRMM, Van den Berg, H., Bast, A., 1999. Karışımların antioksidan kapasite ölçümlerinin değerlendirilmesi için geliştirilmiş bir Trolox eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) testinin uygulanabilirliği. Gıda Kimyası, 66, 511-517.
- Van den Berg, R., Haenen, GRMM, Van den Berg, H., Van den Vijgh, W., Bast, A., 2000. Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) kullanan yapısal olarak ilişkili flavonoidlerin antioksidan kapasitesinin öngörü değeri) deneyi. Gıda Kimyası, 70, 391-395.
- Velioğlu, YS, Mazza, G., Gao, L., Oomah, BD, 1998. Seçilen meyve, sebze ve tahıl ürünlerinde antioksidan aktivite ve toplam fenolikler. Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi, 46, 4113-4117.
- Verpoorte, JA, Mehta S., Edsall JT, 1967. İnsan karbonik anhidrazları B ve C'nin esteraz aktiviteleri. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Vonkruedener, S., Schempp, H., Elstner, EF, 1995. Miyeloperoksidaz aktivitesi ve fenton tipi oksidanlar arası ndaki gaz kromatografik farklılaşması. Serbest Radikal Biyoloji ve Tıp, 19, 141-146.
- Wang, G., Xu, JJ, Ye, LH, Zhu, JJ, Chen, HY, 2002. Tirozinazın kitosan içinde immobilizasyonuna dayanan yüksek duyarlı lı ğa sahip sensörler. Biyoelektrokimya, 57, 33-38.
- Weber, G., Shen, F., Prajda, N., Yang, H., Li, W., Yeh, A., 1997. İlaçlarla sinyal iletim programını düzenlenmesi. Enzim Düzenlemesindeki Gelişmeler, 37, 35- 55.
- Wen, L., Wrolstad, RE, Hsu, VL, 1999. Ananas (Ananas comosus) ve adaçayı ndaki (Salvia officinalis) sinapil türevlerinin enzim destekli silolama (ENLAC) ile karakterizasyonu. Tarım ve Gıda Kimyası Dergisi, 47, 2959-2962.
- Wichi, HP, 1988. Ön mide ve yemek borusu skuamöz epiteli üzerindeki etki perspektifinden bütillenmiş hidrokşianisol (BHA) ile gelişmiş tümör gelişimi. Gıda ve Kimyasal Toksikoloji, 26, 717-723.
- Wickens, AP, 2001. Yaşlanma ve serbest radikal teorisi. Solunum Fizyolojisi, 128, 379-391.
- Wilbur, KM, Anderson, NG, 1948. Elektrometrik ve kolorimetrik tayini karbonik anhidraz. Biyolojik Kimya Dergisi, 176, 147-54.
- Wood, RJ, Ronnenberg, AG, 2006. İçinde: Shils, ME, Shike, M., Ross, AC, Caballero, B., Cousins, RJ, (eds) Modern beslenme sağlığı ve hastalıkları, 10. baskı. Lippincott Williams ve Wilkins, Philadelphia, 248.
- Wright, JS, Johnson, ER, DiLabio, GA, 2001. Fenolik antioksidanların aktivitesini tahmin etmek: teorik yöntemler, ikame edici etkilerin analizi ve başlıca antioksidan ailelerine uygulama. American Chemical Society Dergisi, 123:1173-1183.

- Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, SE, Beecher, G., Prior, RL, 2004. Lipofilik ve gı da toplam antioksidan kapasitesi kullanan bir veritabanı nı n geliştirilmesindeki faktörler hidrofilik oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORACFL): 28 gı danı n ön çalı şması . Gı da Bileşimi ve Analizi Dergisi, 17, 407-422.
- Yalçı n, H., Yı ldi z, H., Nergiz, C., 1997. Baharatları n Kimyasal bileşimi ve gı da sanayiinde kullanı mı . Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi Seri B Gı da Mühendisliği 15, 219-228.
- Yang, JB, Zhu, CH, Deng ve Duan, GL, 2006. Köpek plazması nda apomorfinin belirlenmesi için hassas ve hızlı bir sı vı kromatografi/tandem kütle spektrometri yönteminin geliştirilmesi. Kütle Spektrometresinde Hızlı İletişim, 20, 1883-1888.
- Yanishlieva, NV, Marinova, EM, Gordon, MH, Raneva, VG, 1999, Antioksidan aktivite ve timol ve karvakrolün iki lipid sisteminde etki mekanizması . Gı da Kimyası , 64, 59-66.
- Yenson, M., 1982. Kanda Hemoglobin ve eritrositler. Klinik biyokimya laboratuvar çalı şmaları . Sanal Matbaacı lı k, 5, 342.
- Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumara, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita Y., Okuda, T., 1989. Tanninler ve otoksidasyonun inhibisyon mekanizması üzerine çalı şmalar ve flavonoidler. V. Tanenlerin ve ilgili polifenollerin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali üzerindeki radikal süpürücü etkileri. Kimya ve Eczacı lı k Bülteni, 37, 1919-1921.
- Youdim, MB, Gassen, M., Gross, A., Mandel, S. ve Grunblatt, E., 2000. Dopamin reseptörü agonistinin demir şelatlayıcı , antioksidan ve sitoprotektif özellikleri; apomorfin. Dergi Nöral İletim Malzemeleri, 83-96.
- Yu, BP, Yang, R., 1996. Serbest radikal yaşlanma teorisinin eleştirel değerlendirmesi. Oksidatif stres hipotezi için bir öneri. New York Bilimler Akademisi Yı llı kları , 786, 1-11.
- Yu, L., Halley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M., 2002. Buğday özlerinin serbest radikal yakalama özellikleri. Ziraat ve Gı da Kimyası Dergisi, 50, 1619-1624.
- Yücel-Lindberg, T., Twetman, S., Skold-Larsson, K., Mooder, T., 1999, Antibakteriyel bir diş cilası nı n diş eti oluşu sı vı sı ndaki prostanoidler, lökotrien B4 ve interlökin-1 Beta seviyelerine etkisi. Acta Odontologica Scandinavica, 57, 23-27.
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve enzim kinetikleri. Temel Biyokimya, Kemal Matbaası , 1, 148-167.
- Zambranski, JM, Spetzler, RF, Selman, RS, Roessmann, UR, Hershey, LA, Chumrine, RC ve Macko, R., 1984. Fokal serebral iskemi sı rası nda nalokson tedavisi. Bir primat modelinde evrim. İnme, 15, 621-629.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. Dut üzerindeki flavonoid içeriklerinin belirlenmesi ve bunları n süperoksit radikali üzerindeki süpürücü etkileri. Gı da Kimyası , 64, 555-559.

ÖZGEÇMİŞİ

1983 yılı nda Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı . 2002 yılı nda girdiği Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi Bölümü'nden 2007 yılı nda yüksek lisans derecesi ile mezun oldu. Aynı yılı l Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalı nda doktora çalışmaları na başladı . 2012 yılı l aralık ayında doktora çalışmaları nı tamamladı .