

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FERULİK ASİDİN METABOLİK VE ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ezgi GÜRLER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2019**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ezgi GÜRLER tarafından hazırlanan “Ferulik Asidin Metabolik ve Antioksidan Enzimler Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 17/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Adviye Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP
Gazi Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Üye : Doç. Dr. Fadime KIRAN
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

17/06/2019


Ezgi GÜRLER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FERULİK ASİDİN METABOLİK VE ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ezgi Gürler

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Özlem Yıldırım

Ferulik asit (FA) bitkilerde yüksek miktarda bulunan fenolik asitlerden biridir. Mısır kepeği (2610-3300 mg/100 g), buğday kepeği, patlıcan gibi gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. FA, gıdalarda hem konjuge hem de serbest formlarda bulunur ve çok düşük bir toksisiteye sahiptir. Oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki dengenin bozulması sonucu serbest radikallerin hücre hasarına neden olmasının bir sonucu olarak oksidatif stres meydana gelmektedir. Güçlü bir antioksidan molekül olarak bilinen FA'nın, antioksidan potansiyeli kimyasal yapısında yer alan fenolik çekirdeğindeki fenoksi radikallerinden kaynaklanmaktadır. İlâveten, FA, serbest radikal zincir reaksiyonlarını temizleyebilme ve durdurabilme özelliğine sahiptir. Bu çalışmada FA'nın antioksidan metabolizmasında ve metabolik yollarda görev alan GST, SOD, GPx, KAT, KO, AR, HMG-KoA enzimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. FA ve kontrol olarak kullandığımız gallik asidin DPPH radikali için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0.02 ve 0,003mg/mL olarak hesaplanmıştır. FA'nin 1mg/mL konsantrasyonda SOD, GPx ve HMG-KoA enzimlerini, en düşük konsantrasyonda ise GST enzimini etkili bir şekilde aktive ettiği gözlemlenmiştir. FA'nın HMG-KoA, SOD ve GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde ise, 1mg/mL konsantrasyonda sırasıyla, % 21, % 12,14 ve % 13,89 oranında aktivasyon gözlemlenmiştir. En düşük konsantrasyon değeri olan 0,03125mg/mL FA konsantrasyonunda ise GST enzim aktivitesinde % 11 oranında bir artış tespit edilmiştir. KO, KAT ve AR enzimlerinin aktivasyon/inhibisyon değerlendirmesinde tüm konsantrasyonlarda inhibisyon gözlemlenmiştir. KO, KAT ve AR enzimlerinin 1mg/mL için inhibisyon değerleri sırasıyla, % 10, % 4.75, % 11 şeklinde hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda kullanmış olduğumuz antioksidan ve metabolik enzimlerin FA üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Haziran 2019, 93 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan sistem, ferulik asit, hidroksisinnamik asit, hidroksibenzoik asit, fenolik bileşikler

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF FERULIC ACID ON METABOLIC AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES

Ezgi Gürler

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem Yıldırım

Ferulic acid (FA) is one of the most abundant phenolic acids in plants and might be found in high concentrations in foods such as navy bean, corn bran, wheat bran and eggplant. FA is present in food in both conjugated and free forms, and presents a very low toxicity. The uneven balance between oxidant and antioxidant molecules, which results in the induction of cell damage by free radicals, is referred to as oxidative stress and can trigger a series of chronic degenerative diseases such as arthritis, atherosclerosis, diabetes, cataracts. The antioxidant potential of FA can be attributed to the formation of a phenoxy radical from the phenolic nucleus. FA especially able to scavenge and stop free radical chain reactions. Therefore, the effects of FA on GST, SOD, GPx, KAT, KO, AR, HMG-KoA enzymes were investigated. The IC₅₀ values for the DPPH radical of FA and the gallic acid used as a control were as follows; 0.02 and 0.003mg/mL. It has been observed that FA activates on SOD, GPx and HMG-KoA enzymes at a concentration of 1mg/mL and GST enzyme at the lowest concentration of 0,03125mg/mL. The effect of FA on HMG-CoA, SOD and GPx enzyme activity was examined, as a result, enzyme activation at a concentration of 1mg / mL was observed in 21 %, 12.14 % and 13.89 % respectively. At the lowest concentration of 0.03125mg / mL FA, an increase of 11% was observed in GST enzyme activity. Inhibition on all concentrations was observed in the activity / inhibition evaluation of KO, KAT and AR enzymes. Inhibition values of KO, KAT and AR enzymes for 1mg / mL were calculated as 10 %, 4.75 % and 11%, respectively. As a conclusion, the effect of antioxidant and metabolic enzymes on FA was determined.

June 2019, 93 pages

Key Words: antioxidant system, ferulic acid, hydroxycinnamic acid, hydroxybenzoic acid, phenolic compounds

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her konuda destekleyen ve yönlendiren, akademik bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren değerli danışmanım ve hocam sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmam süresince laboratuvar çalışmalarımda bana her türlü desteği sağlayan Okan ONAR'a, kıymetli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocam Başar KARACA'ya (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Tez dönemimde araştırmacı olarak bulunduğum Leiden Üniversite'si Tıp Fakültesi Proteomiks Departmanı üyelerinden değerli proje danışmanım sayın Doç. Dr. Paul J. HENBERGEN'a (Leiden University Medical Center – Center for Proteomics & Metabolomics), desteğini her zaman hissettiğim hocam Dr. Ivo HORN'a (Hogeschool Leiden), dostluğuyla Hollanda'yı güneşli kılan sevgili arkadaşım Dr. Aswin VERHOEVEN'a (LUMC) ve sevgili Sharon'a, lisans serüvenimden itibaren başından beri yanımda olan sevgili dostum Ayşegül ER'e, değerlilerim Haluk BÖLÜKBAŞ, Nurcan BÖLÜKBAŞ ve Mert Can BÖLÜKBAŞ'a,

Eğitim hayatıma teşrifinden itibaren, bir bilim insanı olarak yetişmemde, bakmamda, yorumlamamda büyük emeği olan sevgili arkadaşım ve değerli hocam Prof. Dr. Willem van LEEUWEN'a (Hogeschool Leiden),

Fedakarlıklarıyla ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili annem Cemile GÜRLER, sevgili babam Osman GÜRLER ve kardeşim Sevgi GÜRLER'e,

Sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ezgi Gürler

Ankara, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI.....	
ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRAKT.	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.	3
2.1 İkincil Metabolitler... ..	3
2.2 Ferulik Asit... ..	6
2.2.1 Ferulik asidin doğal kaynaklardan üretimi ve kimyasal sentezi	10
2.2.2 Antioksidan madde olarak ferulik asit.....	15
2.2.3 Ferulik asidin antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar etkisi	15
2.2.4 Ferulik asidin anti kanser etkisi	19
2.3 Antioksidan ve metabolik enzimler	20
2.3.1 Glutatyon peroksidaz (GPx)	20
2.3.2 Süperoksit dismutaz (SOD).....	21
2.3.3 Katalaz (KAT)	23
2.3.4 Glutatyon S-transferaz (GST)	24
2.3.5 Aldoz redüktaz (AR)	25
2.3.6 Ksantin oksidaz (KO)	26
2.3.7 3-Hidroksi-3-Metilglutaril koenzim A (HMG-KoA)	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1 Materyal	31
3.2 Yöntem	32
3.2.1 Ferulik asidin antioksidan aktivite analizi.....	33
3.2.2 Sığır karaciğerinden homojenat hazırlanması	33
3.2.3 Sığır karaciğerinden aldoz redüktaz enzim izolasyonu	34

3.2.4 Ferulik asidin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine etkisi	34
3.2.5 Ferulik asidin süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine etkisi	35
3.2.6 Ferulik asidin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerine etkisi	35
3.2.7 Ferulik asidin glutatyon s-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerine etkisi...	36
3.2.8 Ferulik asidin aldoz reduktaz (AR) enzim aktivitesi üzerine etkisi	37
3.2.9 Ferulik asidin ksantin oksidaz (KO) enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
3.2.10 Ferulik asidin HMG-KoA enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
3.2.11 İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1 Ferulik asidin total antioksidan aktivitesi.	40
4.2 Ferulik asidin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
4.3 Ferulik asidin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
4.4 Ferulik asidin katalaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	43
4.5 Ferulik asidin glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	46
4.6 Ferulik asidin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	47
4.7 Ferulik asidin ksantin oksidaz enzim aktivitesi üzerine ekisi	48
4.8 Ferulik asidin HMG-KoA redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	93

SİMGELER DİZİNİ

Cu	Bakır
Cm	Santimetre
Dk	Dakika
Δ	Delta
dH ₂ O	Distile su
EtOH	Etanol
Gr	Gram
OH	Hidroksil
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidrojen Klorür
IC ₅₀	İnhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
Mn	Manganez
NaOH	Sodyum hidroksit
nM	Nanometre
NO ⁻	Nitrik oksit
Sn	Saniye
U	Ünite
α	Alfa
β	Beta
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

AR	Aldoz redüktaz
C	Karbon
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DNA	Deoksirübo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EA	Enzim Aktivitesi
GA	Gallik Asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
HMG-KoA	3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A
FA	Ferulik Asit
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OD	Optik dansite
KO	Ksantin oksidaz

ROT	Reaktif oksijen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSA	Süpürücü Aktivite
SOD	Süperoksit dismutaz
KAT	Katalaz
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
μM	Mikrogram
μM	Mikromolar NBT Nitro blue tetrazolyum
UV	Ultra viyole
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bitki ikincil metabolitlerinin ana grupları.....	3
Şekil 2.2 Fenolik asit grubuna ait hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit grup üyeleri....	6
Şekil 2.3 Ferulik asidin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.4 Ferulik asidin cis(a) ve trans(b) formları	9
Şekil 2.5 Ferulik asidin ilk olarak 1866 yılında izole edildiği bitki: Ferula foetida	10
Şekil 2.6. Ferulik asidin sentetik üretimi	13
Şekil 2.7 Ferulik asit ve diğer aromatik bileşiklerin şikimat yolu ile sentezi	14
Şekil 2.8 Antioksidan mekanizmasının etki ettiği 5 temel basamak.....	17
Şekil 2.9 Ferulik asidin (FA) radikal temizleme etkisi	18
Şekil 2.10 Süperoksit dismutaz ailesine ait üç enzimi karakterize eden üç boyutlu yapıları	22
Şekil 2.11 Poliöl yolağı ve glikoz metabolizması.....	26
Şekil 2.12 Pürin bozulma yolu	28
Şekil 2.13 Ksantin oksidoredüktazın ksantin ile reaksiyon mekanizması; A) indirgeyici yarı reaksiyon; B) oksidatif yarı reaksiyon.....	28
Şekil 2.14 HMG-KoA, HMGR' ın doğal substratı ve ilk statin olarak kullanılan kompaktinin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 4.1 Ferulik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiğı.....	40
Şekil 4.2 Standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiğı.....	41
Şekil 4.3 Ferulik asit çözeltisinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	42
Şekil 4.4 Ferulik asit çözeltisinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	43
Şekil 4.5 H ₂ O ₂ Kalibrasyon eğrisi	44
Şekil 4.6 Ferulik asit çözeltisinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	45
Şekil 4.7 Ferulik Asit Çözeltisinin glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	46
Şekil 4.8 Ferulik asit çözeltisinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	47
Şekil 4.9 Ferulik asit çözeltisinin ksantin oksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	48
Şekil 4.10 Ferulik asit çözeltisinin HMG-KoA redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi	49
Şekil 4.11 Ferulik asidin konsantrasyon aralığının çalışılmış tüm enzimlerin aktivitesi üzerine olan etkisi.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Ferulik asit ve gallik asit çözeltilerinin IC50 değerleri.....	41
--	----



1. GİRİŞ

Modern kimya ve biyoloji alanında iki asırdır süregelen bilimsel çalışmalar sonucunda hücre bölünmesi, büyümesi, solunum, depolama ve üreme gibi temel yaşamsal işlevlerde birincil metabolitlerin işlevlerinin önemli bir yer aldığı görülmektedir. Biyoloji alanında yapılmış bilimsel araştırmalar sonucu ikincil metabolit kavramını ortaya koyan Alman biyokimyacı Kossel' dir (Kossel 1891). 30 yıl sonra ise Alman botanikçi F. Czapek bitki biyokimyası serisinde ikincil metabolitleri son ürün olarak tanımlamıştır (Czapek 1921). Günümüzde ikincil metabolitler üzerinde yapılan bilimsel çalışmalar son 50 yıl içerisinde gitgide artan bir grafik çizmektedir. Bitkilerin çevreye adaptasyonunda önemli rol oynamalarını sağlayan ikincil metabolitler bilimsel anlamda önemli bir konuma getirmiştir (Bourgaud vd. 2001). 1960'lı yılların sonuna doğru geliştirilen ve uygulanmaya başlanan bitki hücre kültürü teknikleri ikincil metabolitlerin daha iyi araştırılmasına ve üretilmesine olanak sağlamıştır. *In vitro* sistemler üzerinde farklı stratejilerin geliştirilmiş olması bu bileşiklerin yaygın olarak üretilmesine olanak sağlamıştır. Özel işlem ve süreçlerden geçerek biyoreaktörlerde bitki hücrelerinin ve organ kültürlerinin tasarlanması ikincil metabolit üretimi için önemli bir adım olarak görülmektedir (Bourgaud vd. 2001). İkincil metabolitlerin antibiyotik, antifungal ve antiviral özelliklerinin varlığı bu metabolitleri taşıyan bitkileri patojenlere karşı korunmasında yardımcı olmuştur. Bununla birlikte bu metabolitler UV' nin zararlı etkilerine karşı bitki yapraklarının korumasında görev almaktadırlar (Li vd. 1993).

Bitki ikincil metabolitleri genellikle içerisinde buldukları biyosentetik yollara göre sınıflandırılmıştır. Günümüzde fenolikler, terpenler, steroidler ve alkaloidler olmak üzere dört büyük ikincil metabolit grubu yer almaktadır (Harborne ve Williams 2000). Bu bileşikler arasında en yaygın metabolit grubu fenoliklerdir. Fenolik bileşikler lignin sentezinde görev almakta ve hemen hemen bütün yüksek yapılı bitkilerin yapısında bulunmaktadır. Bunun yanısıra alkaloidler ise bitkiler aleminde spesifik cins ve türlere özgü olarak dağılmışlardır (Harborne ve Williams 2000).

İkincil metabolitlerin bu denli yayılım göstermeleri kemotaksonomi ve kimyasal ekolojinin temelini oluşturmuştur. Bitki ikincil metabolitleri, geniş spektrumlu biyolojik

aktiviteleri nedeni ile yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda batı ülkelerinin ilaç endüstrisinde kullandığı kimyasal moleküllerin % 25'inin doğal bitki kaynaklı olduğu ortaya belirlenmiştir. Buna örnek olarak salisilattan türevlenen aspirin gösterilebilir (Payne vd. 1991).

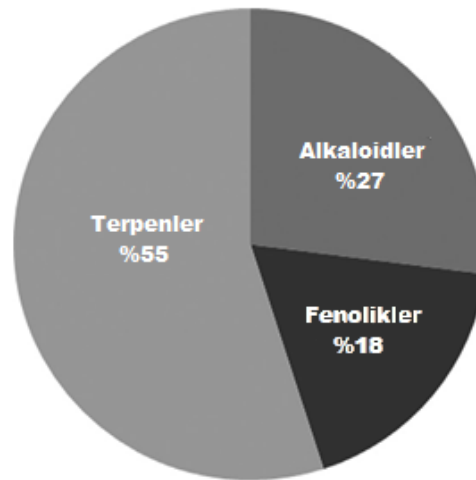
Fenolik asitler, yaygın olarak "fenolikler" olarak adlandırılan daha büyük bir metabolit kategorisinin alt sınıfıdır. Fenolikler terimi karbon iskeletlerinde fenol aromatik halkasına bağlı en az bir hidroksil grubu içeren ve yaklaşık 8000 doğal bileşeni bünyesinde barındıran bir grubu kapsamaktadır (Croteau vd. 2000). Antioksidan özellikleri ile literatürde dikkat çeken fenolik asitler, sağlık alanındaki potansiyel kullanımları ve faydaları açısından ilginin giderek arttığı moleküller arasında yer almaktadır (Rice-Evans vd. 1996; Rice-Evans vd. 1997; Lodovici vd., 2001). Vejeteryan temelli bir diyetle sahip olan insanların günlük tahmini fenolik asit tüketimi 25 miligram - 1 gram (meyve, sebze, tahıl, çay, kahve, baharatlar) arasındadır (Clifford 1999). Fenolik asit grubuna ait olan ferulik asit (FA / IUPAC: (E)-3-(4-hidroksi-3-metoksi-fenil) prop-2-enoik asit) üzerine geçtiğimiz yıllarda yapılmış bir çok bilimsel çalışma, serbest radikalleri temizleyerek, hücre stresinin dengelenmesinde görev aldığını ve aynı zamanda güçlü bir antioksidan işlevi olduğunu göstermiştir (Mancuso ve Santangelo 2014). Hücrelerde yaratmış olduğu düşük toksisitesi nedeniyle, ferulik asit gıda ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ham madde olarak vanilin ve çeşitli koruyucu maddelerin üretiminde, sporcuların kullandığı özel gıdaların üretiminde ve cilt koruyucu ürünlerin bileşiminde ferulik asit bulunmaktadır (Ou ve Kwok 2004). Bununla birlikte ferulik asitin, indüklenbilir nitrik oksit sentaz, kaspasların ve siklooksijenaz-2 gibi sitotoksik enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Mancuso ve Santangelo 2014). Bütün bu kanıtlara dayanarak ferulik asidin alzheimer, cilt kanseri, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıklara karşı potansiyel bir tedavi maddesi olarak kullanılması önerilmiştir (Mancuso ve Santangelo 2014).

Ön klinik araştırmaların çoğunluğuna rağmen, ferulik asidin insanlar üzerinde yeterli düzeyde çalışılmamış olması, klinik etkinliğinin daha fazla belirlenmesi gerektiğine ve daha fazla çalışma yapılmasına itmektedir (Mancuso ve Santangelo 2014).

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 İkincil Metabolitler

Bitki bileşikleri birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Organik asitler, amino asitler ve lipitler birincil metabolit grubuna ait olup doğrudan büyüme ve gelişmede rol almaktadır. Bunun tersine ikincil metabolitlerin birincil fonksiyonları yoktur (Croteau 2000; Kaufman 2006). İkincil metabolitler ise biyolojik çevre ile bitkilerin etkileşimi sonucu oluşan ve üretici organizmanın yaşamı için zorunlu olmayan küçük biyomoleküllerdir (Agostini-Costa 2012). İkincil metabolitler ilaç bileşeni olarak tıpta yaygın biçimde kullanılmaktadır. Birçok antibiyotik, antitümör ajanları ve antiviraller ikincil metabolitlerden türetilmiştir. Aspirin gibi antipiretikler, LSD (liserjik asit dietilamid) gibi halüsinojenler ve lovastatin gibi kolesterol düşürücü ilaçlar ikincil metabolitlerden elde edilmiştir (Mousa ve Raizada 2013; Khazir vd. 2013). Aynı zamanda ikincil metabolitler tarımda herbisitler veya fitotoksinler olarak (Duke vd. 2000), gıda katkı maddeleri olarak (renk, aromalar ve tatlandırıcılar) ve ayrıca koku maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Ramachandra ve Ravishankar 2002). İkincil metabolitler olmak üzere üç ana sınıf altında incelenmektedir: Terpenoidler (% 55), alkaloidler (% 27) ve fenolik bileşikler (% 18) (Şekil 2.1).



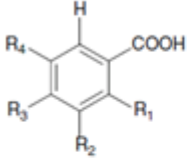
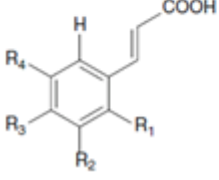
Şekil 2.1 Bitki ikincil metabolitlerinin ana grupları (Croteau vd. 2000)

Fenolik bileşikler sahip oldukları iskelet yapılarına göre sınıflandırılmışlardır: C₆ (basit fenoller, benzokinonlar), C₆-C₁ (fenolik asitler ve aldehitler), C₆-C₂ (asetofenonlar, fenilasetik asitler), C₆-C₃ (hidroksisinnamik asitler, kumarinler, fenilpropanlar, kromonlar), C₆-C₄ (naftokinonlar), C₆-C₁-C₆ (ksantonlar), C₆-C₂-C₆ (Stilbenler, antrakinonlar), C₆-C₃-C₆ (flavonoidler, izoflavonoidler, neoflavonoidler), (C₆-C₃-C₆)_{2,3} (bi-triflavonoidler, proantosiyanidin dimerleri, trimerleri), (C₆-C₃)₂ (lignanlar, neolignanlar), (C₆-C₃)_n (ligninler), (C₆)_n (katekol melaninler, florotanninler), (C₆-C₃-C₆)_n (kondanse edilmiş tanenler) (Harborne 1980, Ishimaru vd. 1987, Quideau vd. 2009). Bu bileşiklerin büyük çoğunluğu bitki hücre duvarında görev yapmaktadır. Antosiyaninler bitki organlarında kırmızı ve mavi rengi veren fenolik bileşik grubudur. Çiçek ve meyvelerde oluşan bu renk değişiklikleri tozlaşma ve tohum yayılımında önemli bir yere sahiptir. Flavonoidler ise bitki organlarını UV ışınlarına karşı korumaktadır (Winkel-Shirley 2002). Bitkiler aleminde fenolik bileşik çeşitliliği oldukça zengindir ancak özel bitki ailelerine özgü olan ve bitkinin belirli organlarında yoğunlaşmış şekilde bulunan fenolikler de bulunmaktadır. Bu nedenle bitki fenolikleri terimi son derece önemli yapısal çeşitliliğe sahip bir grubu kapsamaktadır (Quideau vd. 2011, Harborne vd. 1989).

Polifenoller ise ilk olarak Bate Smith ve Swan tarafından 1962 yılında '500 ile 3000 Dalton moleküler ağırlığa sahip suda çözünebilir fenolik bileşikler olarak tanımlanmıştır. Geniş kapsamlı tanımı ile polifenol teriminin fenolik bir bileşiğin eşanlamlısı olarak kullanılmasına rağmen iskelet yapısında en az iki fenolik halka içeren ve kimyasal yapılarında azot grubu bulundurmayan moleküller olarak tanımlanmaktadır (Quideau vd. 2011). Bu bileşikler bitki kaynaklı gıdaların ortak bileşenleridir. Polifenoller sahip oldukları fenol halkası ve halkaya bağlı hidrojen atom sayısına bağlı olarak, fenolik asitler (hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler), flavonoidler, stilbenler, lignanlar olarak çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır (D'Archivio vd. 2007). Flavonoidler ve fenolik asitler toplam polifenollerinin sırasıyla % 60 ve % 30' unu oluşturmaktadır (Nichenametla vd. 2006). Beslenme ile günde alınan polifenol miktarı yaklaşık olarak 1 gramdır. Bu miktar karotenoidler için 5mg/gün, vitamin E için 12mg/gün, vitamin C için 90mg/gün olup, günlük tüketim miktarı ile karşılaştırıldığı zaman önemli bir değerdir (Wallace 2011).

Gaz kromatografisi (GC-MS), sıvı kromatografisi (LC-MS) ve kütle spektrometresi (MS) gibi yüksek çözünürlüklü ayırma teknikleri ile kombine edilmiş yeni yöntemler, fenolik bileşiklerin kimyasal analizlerine yeni bir yön vermiştir (Corradini vd, 2011; Vukics ve Guttman, 2010; Van Beek vd, 1959; Andersen, 2008; Daayf ve Lattanzio, 2008; Eisenreich ve Bacher, 2007; Hartmann, 2007; Cuyckens ve Claeys, 2004). Doğal olarak oluşan bu fenolik asitler hidrosisinnamik ve hidroksibenzoik yapılar olarak ayırt edici iki farklı yapısal karbon çerçevesi taşımaktadırlar. Biyokimyasal yapıları itibarı ile temel iskeletin aynı kalmasına karşın, aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayıları ve konumlarının farklılaşması çeşitliliğinin oluşmasında en önemli faktördür (Robbins 2003).

Hidroksibenzoik asitler doğrudan benzoik asitten türetilmiş olup C₆-C₁ karbon iskeletine sahip bileşiklerdir. Hidroksibenzoik asitler ve hidrosisinnamik asitlerin konformasyonel yapılarındaki değişiklikler, aromatik halkanın hidroksilasyon ve metilasyonu sonucu oluşmaktadır (Macheix vd. 1990). Hidroksibenzoik asitlere örnek olarak; p-hidroksibenzoik asit (p-HBA); salisilik asit (SA); 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA); 2,5-dihidroksibenzoik asit (2,5-DHBA); 3,4-dihidroksibenzoik asit (3,4-DHBA); 3,5-dihidroksibenzoik asit (3,5 DHBA); galik asit (GA); ve vanilik asit (VA) gösterilebilir (Goleniowski vd. 2013) (Şekil 2.2).

Hidroksibenzoik Asitler					
	Name	R1	R2	R3	R4
	Benzoik asit	H	H	H	H
	p-Hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
	Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H
	Gallik asit	H	OH	OH	OH
	Protokateşik asit	H	OH	OH	H
	Siringik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Gentisik asit	OH	H	H	OH
	Veratrik asit	H	OCH ₃	OCH ₃	H
	Salisilik asit	OH	H	H	H
	Hidroksisinnamik Asitler				
	Sinnamik Asit	H	H	H	H
	o-kumarik asit	OH	H	H	H
	m-kumarik asit	H	OH	H	H
	p-kumarik asit	H	H	OH	H
	Ferulik Asit	H	OCH ₃	OH	H
	Sinapik Asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	Kafeik Asit	H	OH	OH	H

Şekil 2.2 Fenolik asit grubuna ait hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit grup üyeleri (Goleniowski vd. 2013).

Hidroksisinnamik asitler (HCAs), bitkiler aleminde geniş bir dağılım göstermektedir. Basit kimyasal iskeletleri fenilpropanoitten türetilmiş olup C₆-C₃ karbon yapısına sahiplerdir. Çay yaprağı, kahve, kırmızı şarap, sebzelerde, tahıllarda ve özellikle kırmızı meyvelerde bolca bulunurlar. Hidroksisinnamik asitler içerisinde, p-kumarik asit, sinapik asit ve ferulik asit doğada önemli rol oynadığı bilinen elemanlarıdır. Hidroksisinnamik asitler doğada yüksek konsantrasyon ve geniş dağılım göstermelerinden dolayı daha karmaşık fenolik sistemlerin biyosentezinde rol oynamaktadırlar (Teixeira vd. 2013)

2.2 Ferulik Asit

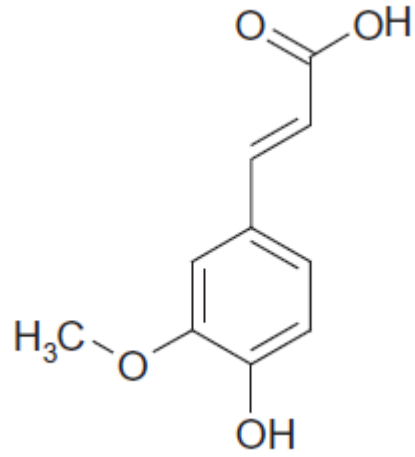
Ferulik asit [IUPAC; (E) -3- (4-hidroksi-3-metoksi-fenil) prop-2-enoik asit], yaygın olarak meyve, sebze gibi besinlerde, kahve, bira gibi bazı içeceklerde bulunan, Çin'de şifalı bitkiler arasında yer alan *Angelica sinensis*, *Cimicifuga racemosa* ve *Ligusticum chuangxiong* (Sakai vd. 1999) bitkilerin ana bileşeni olan bir kafeik asit türevidir (D'Archivio vd. 2007; Rechner vd. 2001). Ferulik asit fenilalanin ve tirozin metabolizması sonucu ortaya çıkan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bir fenolik bileşiktir. Bitki yapısında öncelikle tohumlarda ve yapraklarda serbest formda bulunur.

Ayrıca lignin ve diğer biyopolimerlere kovalent bağlı şekilde bulunmaktadır. Ferulik asitin düşük toksisiteye sahip olması ve kolaylıkla metabolize edilebilmesi nedeniyle önemli bir fenolik madde olarak değerlendirilebilir (Goleniowski vd, 2013).

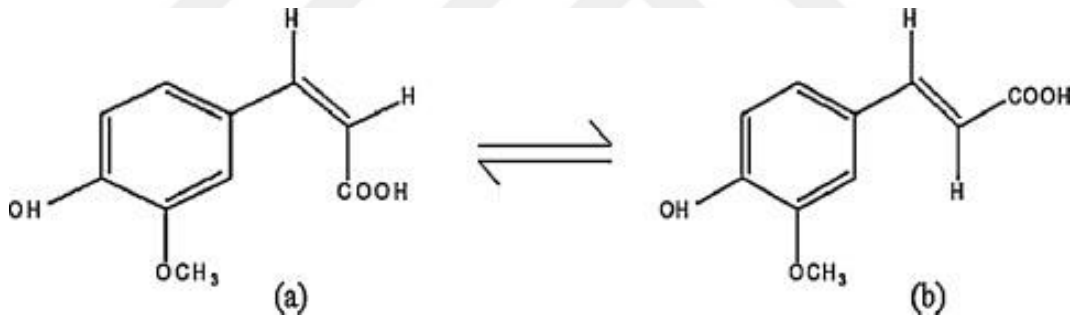
Ferulik asidin antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-tromboz ve antikanser aktiviteleri de dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu bildirilmiştir (Fujisawa vd, 2002; Hosoda vd. 2002). Ferulik asidin koroner hastalıklara karşı koruyucu olması, kolesterol düşürücü etkisi ve sperm kalitesini artırıcı etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (Fujisawa 2002; Hosoda vd. 2002). Buna ek olarak ferulik asidin sağlık açısından faydaları arasında, menapoz dönemindeki kadınlarda kemik dejenerasyonunu önleyici etkisi, cildi UV (Ultraviyole) ışınlarına karşı koruyucu olması, kanda LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolü düşürücü etkisinin olması, kan glukoz seviyesini düşürerek diyabet hastalığını tedavi edici olması gibi özellikleri de bulunmaktadır (Lee vd., 2011). Ferulik asit (FA, 4-hidroksi-3-metoksisinamik asit), ilk kez *Ferula foetida* (Apiaceae) bitkisinden 19. yüzyılın ortalarında izole edilmiş bir fenolik asittir (Hlasiwetz ve Barth 1866). Ferulik asit 2 izomere sahiptir: *cis* (sarı ve yağlı-sıvı yapıda) ve *trans* (beyaz kristal). *Trans* formu % 90 oranında doğal formunu içerir (Fulcher 1983). 1925 yılında, ferulik asit ilk kez kimyasal olarak sentezlenmiş ve spektroskopik tekniklerle kimyasal yapısı doğrulanmıştır. Ferulik asidin yan zincirinde bulunan çift bağ *cis-trans* izomerasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.4). Buna ek olarak yapısında bulunan fenoksi radikallerinin rezonans dengesi ferulik asidin antioksidan etkinliği ile açıklanmıştır. Ferulik asit, kovalent olarak bağlı bulunduğu bitki hücresi duvar bileşenlerinde, sinamik asitin muazzam derecede bol ve geniş bir yayılım gösteren fitokimyasal bir fenolik türevidir (Rosazza vd, 1995). Ferulik asit ve öncülleri, p- kumarik asit (p-hidroksisinamik asit) ve kafeik asit (3,4-dihidroksisinamik asit), ligninlerin biyosentezinde görev alan metabolitlerdir. Bu bileşikler fenilalanin veya tirozinden şikimat yolu ile üretilirler ve ara ürünleri p-kumaril alkol, klorojenik asit, kurkumin, diferulik asitler, sinapik asit, sinapil alkol, koniferil alkol ve vanilin gibi etken maddelerdir (Zhao ve Moghadasian 2008; Dewick 2009) (Şekil 2.7).

Bütün bu özelliklerinin yanısıra ferulik asit, bitkiler aleminde en yaygın bulunan hidroksisinamik asit üyesidir.

Mısır kepeğinde % 3.1 (w/w) oranında bulunarak ümit verici bir antioksidan kaynağı olarak yer almaktadır (Mathew ve Abraham, 2004). Ferulik asitin serebral iskemik hasarla indüklenen hastalıklara karşı nöroprotektif bir etki gösterdiği ortaya çıkmıştır (Koh 2012; Sung vd. 2012). Aynı zamanda iskemi/reperfüzyon sonucu oluşan hücre apoptozunu önlediği çalışmalarla ortaya konmuştur (Cheng vd. 2010; Kim ve Lee, 2012). Yapılan bir çalışmada sıçanlara, güçlü bir organa özgü laboratuvar karsinojeni ve immunosupresor olarak görev alan ve kanser araştırmalarında sıklıkla tümör oluşumunun başlama yani ilk evresinde yer alan 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) ile indüklenen karsinogeneze ferulik asidin kemopreventif etkisinin olduğu bulunmuştur (Balakrishnan vd. 2010; Prabhakar vd. 2012). Bu bilgiler ışığında ferulik asidin kanser tedavilerinde umut verici bir ajan olarak kullanılması öngörülmektedir. Geçtiğimiz yıllarda yapılan çalışmalar, ferulik asidin ve dimerlerinin, bitki hücresi duvar yapısının gelişiminde ve korunmasındaki rolünü kanıtlamıştır. Polisakkaritlerin yapısal karakterizasyonundan kaynaklı bağlar oluşturabilen, hidroksisinnamik asit ailesinin bir üyesi olarak karşımıza çıkan ferulik asit ve türevlerinin, bitki hücre duvarında yeralan ferulat polisakkarit komplekslerinin anlaşılmasında kilit rol oynamaktadır (Mathew ve Abraham 2004). Ferulik asidin bitki hücre duvar yapısının gelişiminde yer alması ve bu alandaki ilerlemeler ferulik asidin ve türevlerinin, enzimolojik aktivitelerini, katalitik mekanizmalarını, aktif saha modifikasyonlarını, ilişkili olduğu protein yapılarının belirlenmesi ve daha sonrasında üç boyutlu yapı tahminlerinin ortaya çıkartılması ile devam ettirilmelidir. Gelecekteki araştırmalar, ferulik asidin vanilin gibi tarımsal kökenli yan ürünlere dönüştürülmesi için endüstriyel ölçekli süreçler geliştirme sorununu ele almalıdır (Mathew ve Abraham 2004).



Şekil 2.3 Ferulik asidin kimyasal yapısı (Mancuso ve Santangelo 2013)



Şekil 2.4 Ferulik asidin *cis*(a) ve *trans*(b) formları (Kumar ve Pruthi 2014)



Şekil 2.5 Ferulik asidin ilk olarak 1866 yılında izole edildiği bitki: *Ferula foetida*
(Amalraj ve Gopi 2016)

2.2.2 Ferulik asidin doğal kaynaklardan üretimi ve kimyasal sentezi

Ferulik asit sentetik olarak vanilinin, piperidin ile katalize edilen malonik asit ile kondensasyon reaksiyonu ile hazırlanmaktadır (Şekil 2.6). Bu yöntem *trans* ve *cis*-izomerlerini beraber içeren ferulik asit üretimine dayanmaktadır ve elde edilen ferulik asidin verimi yüksektir. Ancak tepkimenin tamamlanması üç hafta sürmektedir (Adams ve Bockstahler 1952). Da ve Xu' in 1997'de katalitik ajan olarak benzilamin, solvent olarak metilbenzen kullanarak modifiye ettikleri reaksiyonda 85-95 °C sıcaklıkta tepkime gerçekleştirilerek reaksiyon verimi arttırılmış ve reaksiyon süresi iki saate düşürülmüştür. Ferulik asidi doğal kaynaklardan ürettirmek için 3 temel yol bulunmaktadır; (1) Düşük molekül ağırlıklı ferulik konjüгатlardan, (2) bitki hücre duvarlarından, (3) doku kültürü veya mikrobial fermantasyon yolu Taniguchi ve arkadaşlarının 1999 yılında yapmış olduğu çalışmada büyük bir alanda yetişen pirinç kepeği tarlasından pirinç kepeği yağı üretimi sürecinde oluşan siyah-kahverengi bir atık yağdan yüksek miktarda ferulik asit elde etmişlerdir (Taniguchi 1999).

Bu kimyasal süreçte pirinç kepeğinin atık ürününün sodyum hidroksit veya potasyum hidroksit ile 90-100 °C derecede 8 saat süreyle atmosferik basınç altında hidrolize edilmesi sonucu % 70-80 oranında saflığa sahip ferulik asit üretilmiştir. Bu kimyasal süreç içerisinde çözeltiden ferulik asiti çöktürmek için ferulik asitin alkali tuzu seyreltilmiş sülfirik asit ile asidifiye edilmiştir (Taniguchi 1999).

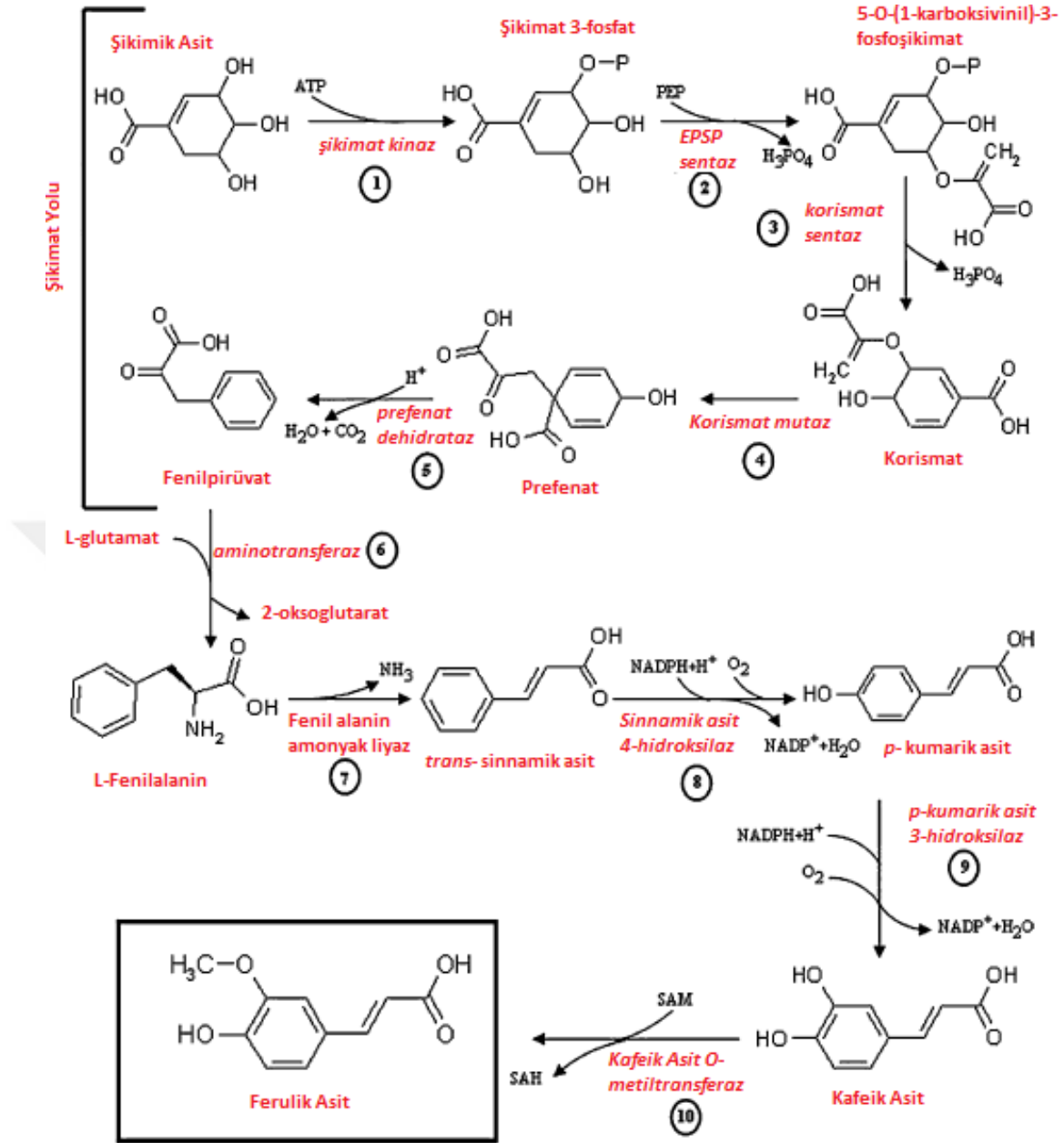
Mikroorganizmalar tarafından üretilen feruloil esterazların bitki hücre duvarlarından ferulik asit salınımı yaptığına dair birçok çalışma bulunmaktadır. Feruloil esterazlar, karboksil esterazların bir alt sınıfı olup ferulik asidin bir dizi esterlenmiş ürünlerinden (feruloillenmiş oligosakaritler ve polisakaritler gibi) salınımında görev almaktadırlar (Kroon 1999). Bu enzimler *Aspergillus niger*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Streptomyces avermitilis*, *Clostridium thermocellum*, *Bacillus spp*, *Lactobacilli*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Brettanomyces anomalus* gibi çeşitli mantar, bakteri ve mayalar tarafından salgılanırlar (Kroon 1999).

Feruloil esterazlar ticari olarak henüz ferulik asit üretiminde doğrudan kullanılmamaktadır ancak bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. Bunun üzerine başlatılan araştırmaların ilk aşaması olarak, feruloil esterazları üretebilen mikroorganizmaların belirlenmesi yer almaktadır (Bonnin vd. 2001; Bartolome vd., 1997). İkinci aşama olarak ferulik asit üretiminde kullanılması düşünülen enzimlerin; kimyasal yapıları, optimal çalışma sıcaklıkları, pH, stabilitelelerini etkileyen faktörler, kullanılacak substratın etkinliği ve polisakaritleri degrades eden enzimlerin yapıları araştırılmıştır (Prates vd. 2001; Faulds vd. 1997). Üçüncü olarak feruloil esterazların üretiminde önemli olan faktörler arasında karbon kaynakları, nitrojen kaynakları ve ferulik asidin kimyasal yapısı hakkında çalışmalar yapılmıştır (Faulds vd., 1997) (Şekil 2.3). Son olarak ferulik asitin fermentasyon sıvılarından saflaştırılabilmesi için arıtma yöntemleri geliştirilmiştir (Edlin vd. 1998; Couteau ve Mathaly 1998). Bunun yanı sıra *Beta vulgaris*, *Zea mays* ve *Chenopodium rubrumun* bitkisel kaynaklı hücre kültürlerinde ferulik asit birikimi gözlemlenmiştir (Bokern vd. 1991).

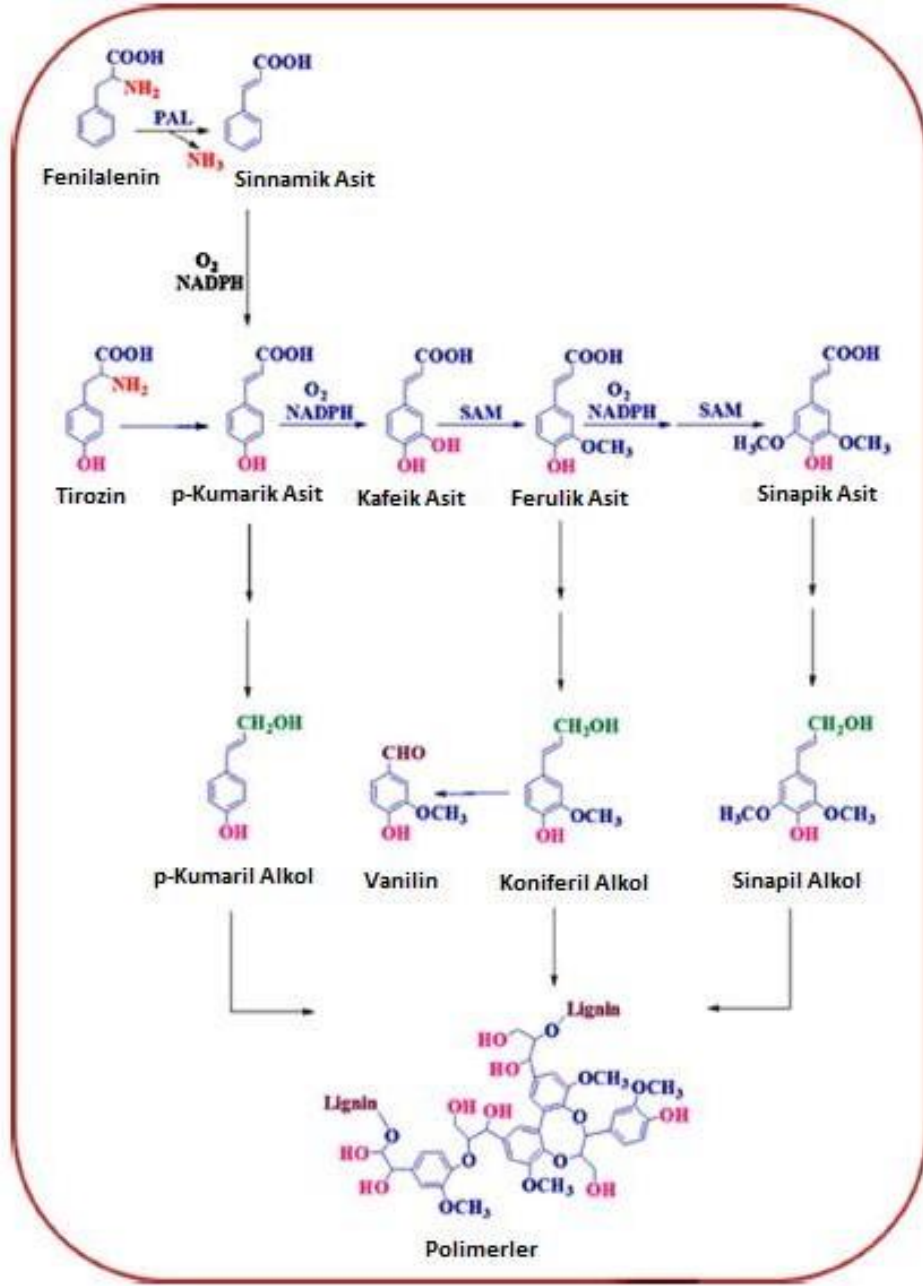
Doğal içerikli ürünlere artan talepler doğrultusunda, bitki hücre kültürü ile ferulik asit üretimi, gelecek çalışmalar için farklı bir bakış açısı ortaya koymuştur.

Aynı zamanda gelecekte yapılması planlanan çalışmalar arasında feruloil esterazların optimize edilmiş bir fermentasyon sisteminden eldesi ve genetik mühendisliği çalışmaları ön plana çıkmaktadır.





Şekil 2.6 Ferulik asidin sentetik üretimi (Rechner vd. 2001)



Şekil 2.7 Ferulik asit ve diğer aromatik bileşiklerin şikimat yolu ile sentezi (PAL: fenilalanin amonyak liyaz; TAL: tirozin amonyak liyaz; SAM: S-adenosil metiyonin) (Kumar vd. 2014).

2.2.3 Antioksidan madde olarak ferulik asit

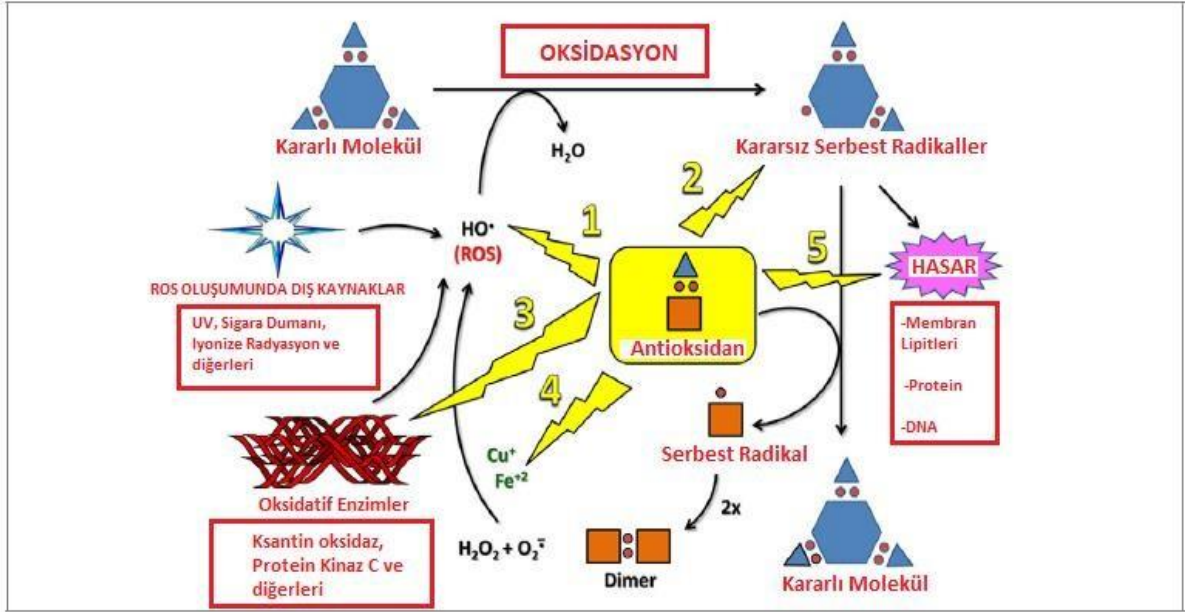
Günümüzde "antioksidan aktivite" terimi, modern toplumlarda yıllar içerisinde kitle iletişim araçlarının yardımı ile popüler hale gelmiştir. Antioksidan maddenin geleneksel ve genel olarak tanımı, "herhangi bir bileşik veya materyalin oksijen veya peroksit varlığında, oksidasyona veya inhibe edici reaksiyonlara karşı koruyucu etki gösteren çeşitli ürünler" olarak belirtilmiştir (Huang 2005). Teknik olarak, antioksidan aktivite bir molekülün veya bileşimin serbest radikal oluşum kapasitesini azaltma ve ROS' u süpürme, bunun yanısıra diğer moleküllerin ve biyomoleküllerin oksidasyon ve bozunmasından kaynaklanan yaralanmaları inhibe etme ve/veya tamir etme kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır (Fridovich 1989; Roginsky ve Lissi 2005).

Araştırmacılar reaktif ara maddeleri 2 ana gruba ayırmaktadır (Wiseman ve Halliwell 1996, Huang 2005). Birinci olarak tanımlanan "Reaktif oksijen türü" (ROS); süperoksit ($O_2 \cdot^-$), hidroksil ($OH \cdot$), peroksil ($RO_2 \cdot$) ve alkoksil ($RO \cdot$) gibi oksijen radikalleri ve ozon (O_3), peroksinitrit ($ONOO^-$), singlet (tek) oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksitleyici ajanlar ya da kolayca radikal haline dönüştürülen bazı radikal olmayan maddeleri içermektedir (Silva ve Batista, 2017). "Reaktif azot türü" (RNS) olarak bilinen 2. grupta ise, nitrik oksit radikali (NO), $ONOO^-$, azot dioksit radikali (NO_2), diğer azot oksitleri ve NO . ortamda bulunan $O_2 \cdot^-$, $RO \cdot$ ve $RO_2 \cdot$ ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan ara ürünleri içerir (Silva ve Batista 2017) (Şekil 2.8).

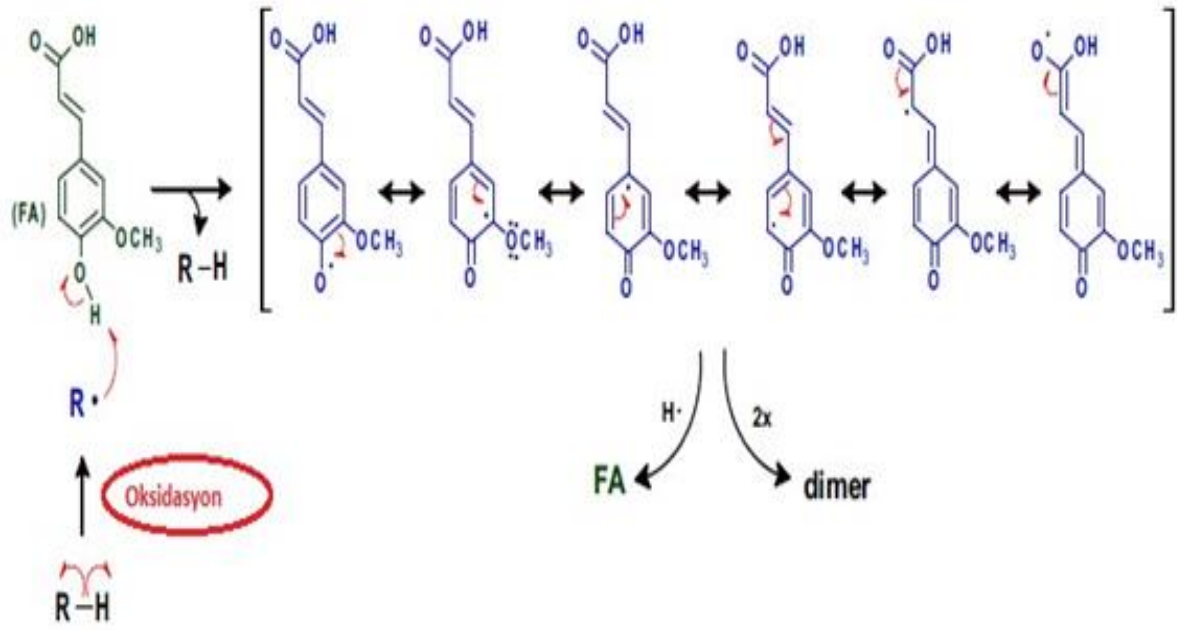
Farklı patolojik koşullar altında, normal hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde serbest radikallerin rolü geçtiğimiz yıllarda farmakolojik çalışmaların odak noktası haline gelmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve genel olarak serbest radikaller, hücre sinyalizasyonu ve bir takım yaşamsal fizyolojik fonksiyonlar için önemli olmakla beraber, ölçsüz oranda alınması hücre seviyesinde redüksiyon/oksidasyon (redoks) dengesini değiştirerek biyolojik fonksiyonları bozabilmektedir. Bunun sonucu olarakta, ROS ve antioksidan/süpürücü savunma sistemlerinin faaliyetleri arasında bir dengesizlik olduğunda oksidatif stres meydana gelmektedir (Aprioku 2013).

Oksidasyon, belirli bir maddenin enzimatik, kimyasal veya fiziksel faktörler tarafından desteklenen bir takım reaksiyonlar sonucu elektron kaybına neden olan reaksiyonlar dizisidir (Fridovich 1989; Battino vd. 2002). Oksidasyon reaksiyonları yaşamsal öneme sahiptir. Reaktif oksijen türleri malign hücrelerin ve enfekte olmuş hücrelerin yok edildiği fagositozun en önemli elemanları arasındadır. Ayrıca yüksek reaktiviteleri nedeniyle ROS hücre içi araçlar olarak görev almaktadır (Ivanova vd. 2015). Bununla birlikte, bazı negatif faktörler ROS birikimine neden olup, oksidatif strese neden olmaktadır. Bütün bu etmenler göz önüne alındığında, organizmada makromoleküllerin oksidatif modifikasyonu maruz kalması ile hücresel düzeyde; DNA, proteinler, lipidler ve diğer önemli kompozisyonlar üzerinde yapısal hasar oluşturmaktadır (Silva ve Batista 2017).

Sonuç olarak oksidasyon reaksiyonları, zincir reaksiyonlarını başlatan ve lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyokimyasal açıdan önemli moleküllerin oksidatif bozunmasını hızlandırıcı etki gösteren serbest radikalleri üretebilmektedir. Antioksidanlar ortamda bulunduğu anda, bu tip zincir reaksiyonlarının önünü keserek oksidize bileşiklerin neden olduğu hasarı önler veya tamir ederler (Villa Caballero, 2000). Şimdiye kadar yayınlanmış birçok çalışma da ferulik asidin ve kimyasal yapısında yer alan hidroksil gruplarının varlığı, diğer ilgili bileşiklere kıyasla daha yüksek antioksidan kabiliyetine sahip olduğu ve güçlü antioksidan aktivitesi sayesinde radikal temizleme mekanizması yoluyla radikal zincir reaksiyonlarını durduran önemli bir bileşik olduğu vurgulanmaktadır (Toda vd, 1991, Graf 1992, Kikuzaki 2002, Nenadis vd, 2003, Kadoma ve Fujisawa 2008, Itagaki vd, 2009, Shahidi ve Chandrasekara 2010) (Şekil 2.9).



Şekil 2.8 Antioksidan mekanizmasının etki ettiği 5 temel basamak (Silva ve Batista 2017).



Şekil 2.9 Ferulik asidin radikal temizleme etkisi (Silva ve Batista 2017).

2.2.4 Ferulik asidin antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar etkisi

Ferulik asidin bir takım virus tiplerinde (grip, solunum sinsisyal virüsü ve AIDS gibi) inhibitör aktiviteye sahip olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Edeas ve arkadaşları 1995 yılında yapmış oldukları çalışmada ferulik asidin ve türevlerinin AIDS virüsünü inhibe edici özellik gösterdiği ve potansiyel bir kemopreventif ajan olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Edeas vd. 1995). Ferulik asit ve izoferulik asit Japonya'nın bölgesel ilaçlarının üretiminde kullanılan *Cimicifuga* türlerinde spesifik olarak bulunan rizomun aktif bileşeni olup, bu bileşikler sıklıkla anti-enflamatuvar ilaçlarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ferulik asit, gram pozitif ve gram negatif bakterilerde ve mayalarda geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Jeong vd. 2000). İnsan gastrointestinal sisteminde yer alan bir takım önemli mikrobiyota elemanlarından olan; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* ve *Shigella sonnei* (Tsou 2000; Lo ve Chung 1999) gibi bakterilerin üreme süreçlerini inhibe edici özellik gösteren ferulik asidin antimikrobiyal mekanizması bakterilerde, arilamin N-asetiltransferaz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Lo ve Chung 1999).

2.2.5 Ferulik asidin anti-kanser etkisi

“Malign tümör” terimi ile bağlantılı olarak kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir biçimde büyümesi, kan ve lenf sistemlerinin vasıtasıyla diğer doku ve hücrelere yayılma potansiyeli göstermesi ile tanımlanan bir terimdir. Malignant tümör fenotipinin yayılma ve ifadesinde kimyasal, fiziksel, metabolik, genetik faktörler, yaş ve çevrenin doğrudan veya dolaylı olarak etkisi görülmektedir (Kampa vd. 2007; Orlikova vd. 2014). Özellikle metastaz geçiren kanser hücreleri tarafından, yüksek konsantrasyonlu olarak ROS'un ve H₂O₂'in üretilmesi, proliferasyon (çoğalma) ve apoptoz arasındaki dengenin sağlanması için belirli bir düzeyde oksidatif stresin gerekli olduğu hipotezini doğrulamaktadır (Loo 2003). Ferulik asit sahip olduğu güçlü antioksidan ve prooksidan (oksidasyonu hızlandırıcı) (Maurya ve Devasagayam, 2010) özelliklerinden dolayı önemli anti-kanser ve apoptoz mekanizmalarında doğrudan dikkate alınan bir bileşik olmuştur (Loo 2003; Kampa vd. 2004; Azmi vd. 2006; Fresco vd. 2006). Ağırlıklı olarak ferulik asit içerikli meyve ve sebze tüketimine dayanan bir diyet, düzenli uygulandığında bir çok kanser riskini azalttığı literatürde bulunan çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bourne ve Rice-Evans 1998; Kampa vd. 2007). Daha önce çalışılmış önemli kanser hücre hatları arasında; insan meme hücresi (Kampa vd. 2004; Indap vd. 2006; Serafim vd. 2011), Caco-2 kolon (Janicke vd. 2011), histiyositik lenfoma U937 (Chiang vd. 2003), osteosarkom (Wang vd. 2016), insan servikal ME-180 (Panwar vd. 2015) ve melanom (Yang vd. 2015) gelmektedir.

2.3 Antioksidan ve Metabolik Enzimler

2.3.2 Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.19) enzim aktivitesi için gerekli, 80kDa ağırlığında, benzer 4 alt ünitesinin her birinde bir adet selenosistein (Sec) içeren tetramerik yapıda bir peroksidaz enzimidir (Tappel 1978). GPx enzimi, redüklenmiş glutasyon tripeptidi (GSH) ile çeşitli hidro peroksit (ROOH ve H₂O₂) moleküllerinin reaksiyonunu katalize ederek, peroksit moleküllerinin suya dönüştürülmesini sağlamaktadır. Böylece glutasyon peroksidaz enzimi, oksidatif hasara karşı memeli hücre membranını ve hücre organellerini korur (Drevet 2006). Glutasyon (GSH); glutamat, sistein ve glisinden oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Glutasyon metabolizması en önemli antioksidan savunma mekanizmalarından birisidir (Esterbauer vd 1992, Rikans ve Hornbrook 1997, Grazioli vd. 1998, Sigalov ve Stern 1998).



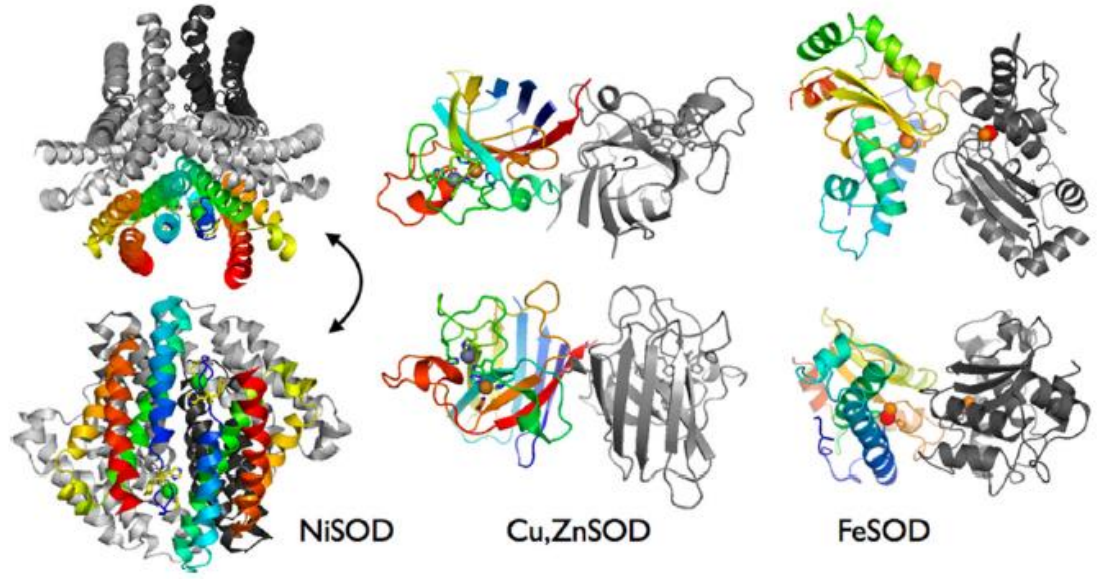
Glutasyon peroksidazlar (GPxs) filogenetik acidan ilişkili enzimler ailesine dahildir. Memelilerde şimdiye kadar 8 tip glutasyon peroksidaz tanımlanmıştır (Brigelius-Flohé ve Maiorino 2013). GPx-1 ve GPx-4 katalitik merkezlerinde selenosistein (Sec) içeren selenoproteinlerdir. GPx-6 sadece insanlarda bulunan bir selenoprotein türüdür. Filogenetik olarak glutasyon peroksidaz enzim ailesi evrimsel süreçte sistein (Cyn) içeren üç ana gruptan oluşmaktadır: GPx-1,GPx-2; GPx-3,GPx-5,GPx6 ve GPx-4-GPx-7,GPx-8 (Herbette vd. 2007, Toppo vd. 2008). Glutasyon peroksidazlar, hücrenin farklı lokasyonlarında antioksidan fonksiyonlarını yerine getirirler. GPx-1, sitozol ve mitokondride, GPx-2 intestinal epitelde, GPx-3, hücre plazmasında, GPx-4 ise hücre zarını oksidatif hasardan korumakla görevli hücre bölgelerinde bulunur (Ghyselinck ve Dufaure 1990).

2.3.3 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar (SOD) (EC 1.15.1.1) son derece reaktif olan süperoksit anyonunun, hidrojen peroksit ve moleküler oksijen molekülüne dönüştürülmesi işlemi katalize etmektedir ve böylece hücreyi aerobik solunumun toksik ürünlerine karşı kritik koruma görevini üstlenir (McCord ve Fridovich 1969; Fridovich 1997). Süperoksit dismutaz enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda görevli, hücrede reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma sisteminde rol alan antioksidan özellik gösteren en güçlü antioksidan enzimlerden biridir (Ighodaro ve Akinloy 2017). SOD, $O_2^{\cdot -}$ 'nin metabolize edilmesinde önemli rol oynayan bir enzimdir. Bununla birlikte süperoksit dismutaz enzimleri, hipoklorit (OCl^-), peroksinitrat (ONO_2^-), hidroksil radikali (HO^{\cdot}) ve hidrojen peroksit de (H_2O_2) dahil olmak üzere zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve hücrede geniş çapta hasara neden olabilecek oksitleyici zincir reaksiyonlarını önlemede önemli bir rolü vardır (Miller 2012).



SOD enzim ailesi, enzimin iskelet yapısında bulundurduğu iyon farklılığı sonucu olarak üç gruba ayrılır: SOD' ın kimyasal yapısına bağlı Ni (Nikel) iyonu, Cu-Zn (Bakır-Çinko) iyonlar ile oluşturulan kompleksler ve sonuncu olarak enzimin yapısına bağlı olarak Fe (Demir) veya Mn (Manganez) içeren kompleksler (Şekil 2.10). SOD' nin bu üç grubunun farklılığı sadece enzimin aktivitesini belirleyen metal iyonlarına bağlı olmamakla beraber proteinin katlanma yapısı ile de ilişkilendirilir (Miller 2012).

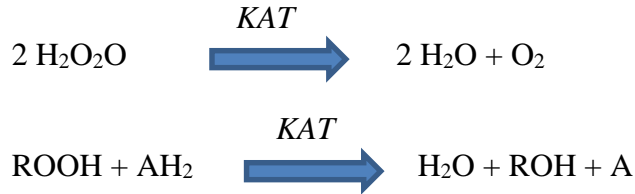


Şekil 2.10 Süperoksit dismutaz ailesine ait üç enzimi karakterize eden üç boyutlu yapıları (Miller 2012).

Cu-ZnSOD ve FeSOD komplekslerinde tek, NiSOD kompleksinde iki monomer renklendirilmiştir (Şekil 2.10). İkinci sırada yer alan yapılar, üst sıradaki eş yapılarının sayfa düzlemi üzerinde yaklaşık 90 derece döndürülmesi ile elde edilmiştir. NiSOD ailesi toplam ağırlığı yaklaşık 80kDa olan dört adet homoeksomer sarmal demet içerir (Barondeau vd. 2004). Her bir sarmal, N-terminal (Amin) ucunda (yeşil renkli sarmallar) Ni (Nikel) iyonları içerir. Cu-ZnSOD ise yaklaşık 32kDa ağırlığında olup homodimer yapısındadır. Üç boyutlu iskeletinde bulunan her bir monomer sekiz adet beta plakası içerir. Cu ve Zn iyonları (sırasıyla altın ve gümüş renkli) iki ilmek (loop) ile birbirine bağlı beta plakalarının dışından kısa bir alfa sarmalı ile iskelete bağlanırlar. Fe veya MnSOD'lar yaklaşık 45kDa ağırlığında olup homodimer yapısındadır. Her monomer, N-terminal ucuna bağlı bir alfa sarmalı ve C-terminal ucuna bağlı alfa-sarmalları ile çevrili üçlü bir beta plakası içerir (DeLano 2002; Wuerges vd. 2004; Strange vd. 2003; Lah vd. 1995; Ramirez vd. 2009).

2.3.4 Katalaz (KAT)

Katalaz (KAT) (EC 1.11.1.6) enzimi, 4 benzer alt üniteye sahip, 240 kDa ağırlığında olup 11. kromozomda CTT1 geni tarafından kodlanan tetramerik bir proteindir (Radi vd. 1991). Katalaz enziminin her bir polipeptit alt ünitesi 60 kDa ağırlığındadır ve merkezinde bir adet ferriprotoporfin içermektedir (Surai, 2006). Katalaz enzimi oksijeni kullanan tüm canlı dokularında yeralan antioksidan bir enzimdir. Katalaz enzimi kofaktör olarak demir veya manganez kullanmaktadır. Hidrojen peroksidazın (H_2O_2) su ve oksijen molekülüne indirgenmesi reaksiyonunu gerçekleştirir ve bu sayede süperoksit dismutaz enzimi gibi detoksifikasyon sürecini tamamlamış olur (Marklund 1984; Chelikani vd. 2004). Katalaz enzimi saniyeler içerisinde milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü parçalayabilir. Enzim esas olarak peroksizomlarda bulunmaktadır ancak memeli hücre mitokondrilerinde de yer almaktadır. Tek istisna sıçan kalbinde bulunan mitokondrilerde katalaz enzimine rastlanılmamıştır (Radi vd. 1991). Bu istisnanın sonucu olarak memeli hücre mitokondrilerinde hidrojen peroksit su ve oksijene glutatyon peroksidaz enzimi ile parçaladığını göstermektedir.



Peroksidaz aktivitesi sayesinde katalaz, çeşitli hidrojen donörleri ile (metanol, etanol, formik asit ve fenoller gibi) reaksiyona girer. Katalaz enzim aktivitesi iki şekilde gerçekleşir. Hidrojen peroksidaz molekülü demir grubunu oksiferil türlerine okside eder. Bir oksidasyon ürünü demirden ve bir porfirin halkasından uzaklaştırıldığında porfirin katyon radikali oluşur. İkinci hidrojen peroksidaz molekülü indirgeyici ajan olarak su ve oksijen molekülü üreterek, enzimi yeniden oluşturmak için harekete geçer (Chelikani vd. 2004).

Hidrojen peroksit düşük miktarda da olsa hücre proliferasyonu, hücre ölümü, karbonhidrat metabolizması, mitokondriyal fonksiyon ve trombosit aktivasyonu, normal tiyol redoks dengesinin korunması gibi bazı fizyolojik süreçleri düzenlemede önemlidir (Dröge 2002). Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda hücreler için çok zararlı olduğu rapor edilmiştir (Ercal vd. 2001). Katalazın hücrelerdeki hidrojen peroksit konsantrasyonunu etkili bir şekilde sınırlayabilme yeteneği yukarıda bahsedilen fizyolojik süreçlerin yanı sıra antioksidan savunma sisteminin önemli bir elemanı olmasından da kaynaklanmaktadır (Góth vd. 2004).

2.3.5 Glutatyon S-transferaz (GST)

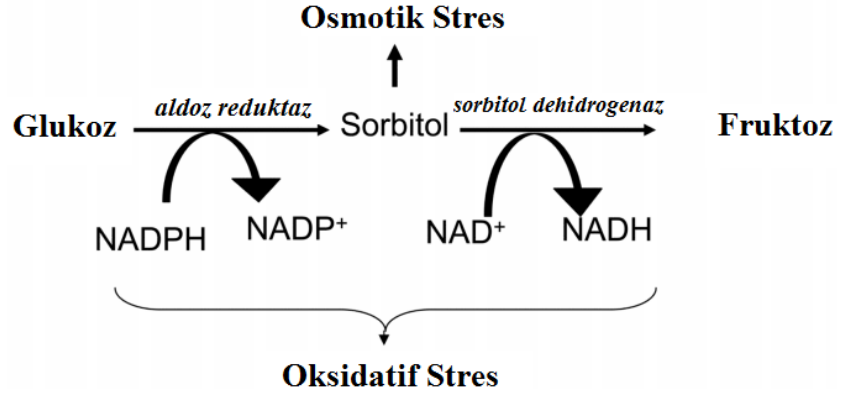
Glutatyon S-transferazlar (GST'ler) (GST; EC 2.5.1.18), ksenobiyotik bileşiklerin faz-II detoksifikasyonunda ve önemli metabolitlerin biyosentezinde rol oynarlar (Angelucci vd. 2005). GST dimerik (heterodimerik) enzimlerdir. Genel olarak, GST'ler, GSH'nun aktive tiolatının elektrofilik substratlara nükleofilik atağını katalize eder ve katalitik döngünün önemli bir adımı olarak GSH'nun GS-'a aktivasyonunu sağlar (Angelucci vd. 2005). Enzim çoğu aerobik mikroorganizma, bitki ve hayvanlarda bulunur (Armstrong 1990). Ökaryotlarda GST'ler hücreSEL lokalizasyonlarına göre, sitosolik GST'ler, mitokondriyal GST'ler ve mikrozomal GST'ler olmak üzere en az üç ana protein ailesine bölünürler. Mitokondriyal GST'ler ayrıca kappa sınıfı GST'ler olarak bilinir ve sitosolik GST'lerle yapısal benzerlik taşıyan çözünebilir enzimlerdir. Diğer taraftan, MAPEG olarak da bilinen mikrozomal GST'ler (eikozanoid ve glutatyon metabolizmasında rol alan membrana bağlı proteinler) diğer ana gruplarla evrimsel olarak ilişkisi bulunmayan integral zar proteinleridir (Allocati vd. 2009). İndüklenmiş ekspresyona bağlı olarak Glutatyon S-transferaz enziminin çeşitli formları evrimsel süreçte hücrelerin oksidatif strese ve toksisiteye bağlı olarak karşı koyma durumu olarak açıklanmıştır (Hayes vd. 2005; Zimniak ve Singh 2006). Glutatyon S-transferaz enzimi, hücreSEL detoksifikasyondan sorumlu endojen kaynaklı toksik metabolitlerin, süperoksit radikallerinin ve eksojen kaynaklı toksik kimyasalların temizlenmesinde görevli çok yönlü bir enzimdir (Allocati vd. 2009; Zimniak ve Singh 2006).

Bunun yanı sıra glutatyon S-transferaz, oksidatif stresle ilişkili dejeneratif bozukluklar ve kanser terapilerinde sıklıkla rastlanan ilaç direncinde önemli rol oynamaktadır. Glutatyon S-transferazların izoenzimleri kanser sürecinde görev almaktadır (Hayes vd 2005; Zimniak 2006). Mitojenle aktive edilmiş protein (MAP) kinazların aktivasyonunda ve çeşitli transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunda, apoptoz ve hücrelerin hayatta kalmasında rol oynayan glutatyon S-transferaz enzimi (Zimniak vd. 2006, Yang ve Awasthi 2006) hücrel antioksidanın korunmasında, farklı hücrel kompartmanlardaki bakımı gibi bir takım mekanizmaları düzenlenmektedir. Mikroplar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak dağılımı ve çoklu gen ailesine sahip olması glutatyon S-transferaz' ların fizyolojik olarak önemini artırmaktadır (Raza 2011).

2.3.6 Aldoz redüktaz (AR)

Aldoz redüktaz (AR, EC 1.1.1.21) enzimi poliol yolağında yer alan, diyabetik komplikasyonların önlenmesinde ve tedavisi için üretilen ilaçların tasarlanmasında önemli bir yeri olan aldo-keto redüktaz ailesine ait bir enzimdir. Ligandlar ve alan hedefli mutajenez ile kristalize edilmiş komplekslerin yapısı aldoz redüktaz enziminin iskelet yapısının tanımlanmasını sağlamıştır. Enzim 315 aminoasit residüsünü kapsayan tek polipeptit kümesinden oluşmaktadır (Schade vd. 1990). Sorbitol dehidrogenaz (SDH) formları ile birlikte aldoz redüktaz, poliol yolağında rol oynamaktadırlar. Poliol yolağında, aldoz redüktaz ilk olarak sorbitolu oluşturmak için NADPH' e bağlı olarak glukozun aldehit formlarının redüksiyonunu katalize eder. Sorbitol dehidrogenaz NAD' ların varlığında ara sorbitolü fruktoza okside eder. Aldoz redüktaz varlığında glukozun sorbitole katalize edilmesi ilk olarak 1956 yılında Hers tarafından tanımlanmıştır (Hers 1956).

Kısa bir süre sonra poliol yolağında sorbitolün rolü diyabetik sıçan lenslerinde Van Heyningen tarafından 1959 yılında kanıtlanmıştır (Van Heyningen vd. 1959). 1965 yılında, aldoz redüktazın patojenik etkisi ve poliol yolağı ile olan ilişkisi ilk olarak Kinoshita tarafından lenslerde tanımlanmıştır (Kinoshita 1965).



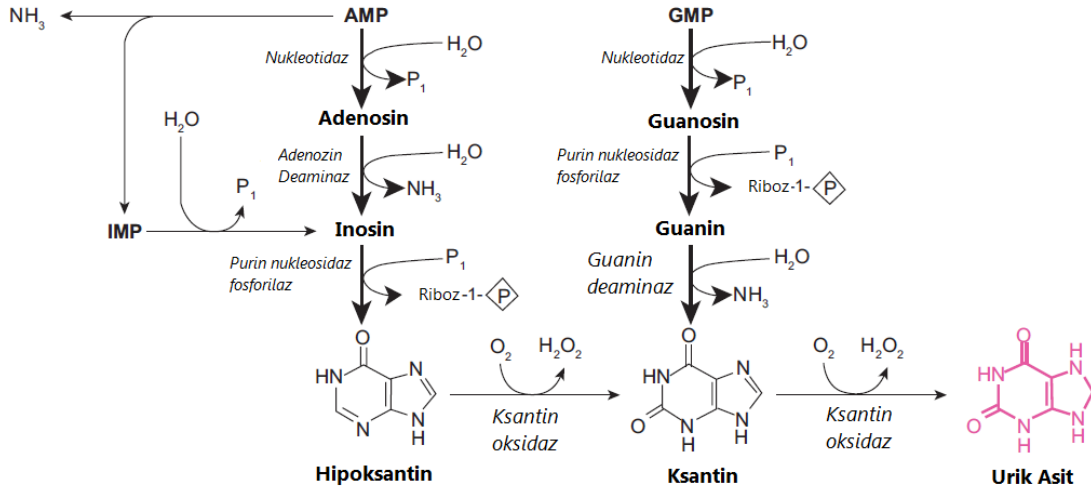
Sekil 2.11 Poliöl yolağı ve glikoz metabolizması (Ramana ve Srivastava 2011).

Poliöl yolunda glikoz, NADPH bağımlı bir enzim olan aldoz redüktaz ile sorbitole dönüştürülür. Daha sonra sorbitol, NAD⁺ bağımlı bir enzim olan sorbitol dehidrogenaz varlığında fruktoza dönüştürülür. Hiperglisemi sırasında meydana gelen sorbitol fazlalığı zar yapısını geçirimsiz bir hale sokarak hücre içerisinde osmotik strese neden olmaktadır. Hiperglisemi sırasında osmotik stresin artışı ikincil diyabetik komplikasyonların ana nedenini oluşturmaktadır. Ayrıca bu süreç içerisinde NADPH/NAD⁺ oranında meydana gelen düşüş inflamatuvar sinyallemlerinde değişiklikler yaratarak oksidatif strese neden olmaktadır (şekil 2.11).

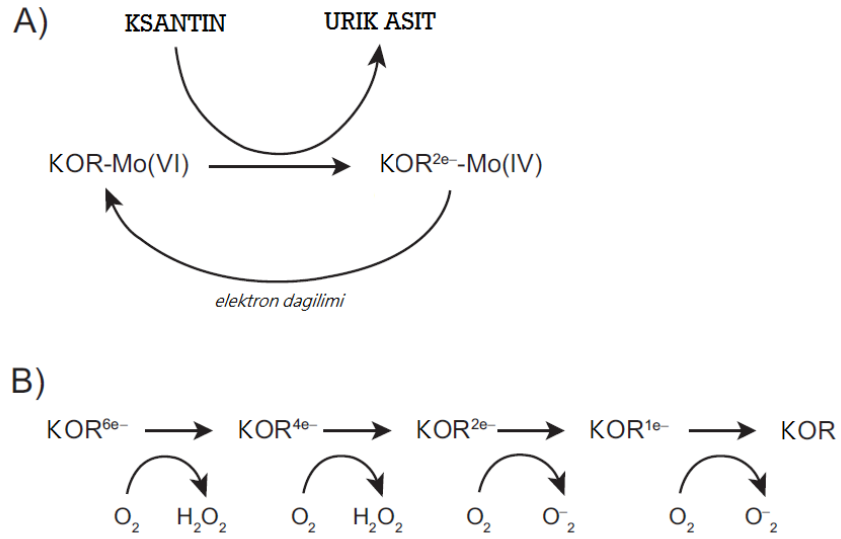
2.3.7 Ksantin oksidaz (KO)

Ksantin oksidaz (KO; EC 1.17.3.2); süt, böbrek, akciğer, kalp ve vasküler endotelyumda yaygın olarak bulunan çok yönlü bir molibdoflavoproteindir. İnsanlarda ksantin oksidaz aktivitesi en yüksek karaciğer ve bağırsakta bulunmaktadır (Harrison 2002). Ksantin oksidaz enzimi, ksantin ve hipoksantin ürik aside dönüşümünü katalize etmektedir (şekil 2.12). Bununla birlikte pürin metabolizmasında, hiperurisemi ve gut hastalığında önemli rol oynamaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında, ortamda bulunan ksantin dehidrogenazın (KDH) varlığında sülfhidril residülerinin oksidasyonu veya proteoliz sonucu ksantin oksidaz oluşmaktadır (Nishino vd. 2008, Pacher vd. 2006). Pürin

substratlarının katalitik oksidatif hidroksilasyonu sürecinde, ksantin oksidaz enzimi superoksit anyonları ve hidrojen peroksit üretimine başlar ve bunun sonucu olarak demir varlığında yüksek reaktif özelliğe sahip hidroksil radikallerine dönüşür (Stockert vd. 2002; Hille vd. 2006) (Şekil 2.13). Bu reaktif oksijen türleri (ROS) metabolik bozukluklar, enflamasyon, hücresel yaşlanma, reperfüzyon hasarı, ateroskleroz ve karsinogenez gibi patolojik olaylarla ilişkilidir. ROS, programlanmış hücre oluşumunu veya nekrozu uyararak birçok genin ekspresyonu indükler veya başlatır. DNA üzerinde oksidatif hasarın oluşumu, çeşitli kanser türlerinin gelişimi, lipid oksidatif hasarının oluşumu ve bu süreçte damar hastalıklarının oluşumu reaktif oksijen türlerinin yoğunluğu ile ilişkilendirilmiştir (Pacher vd. 2006). Ksantin oksidazın ürik asit ve reaktif oksijen türleri gibi bir takım metabolitlerin fazla düzeyde üretimi, gut gibi çeşitli hastalıklara sebebiyet verebildiği gibi dokularda oksidatif hasarada neden olmaktadır (Borges vd. 2006).



Şekil 2.12 Pürin bozulma yolu (Cristine vd. 2004)



Şekil 2.13 Ksantin oksidoredüktaz (KOR)' ın ksantin ile reaksiyon mekanizması; A) indirgeyici yarı reaksiyon; B) oksidatif yarı reaksiyon (Cristine vd. 2004)

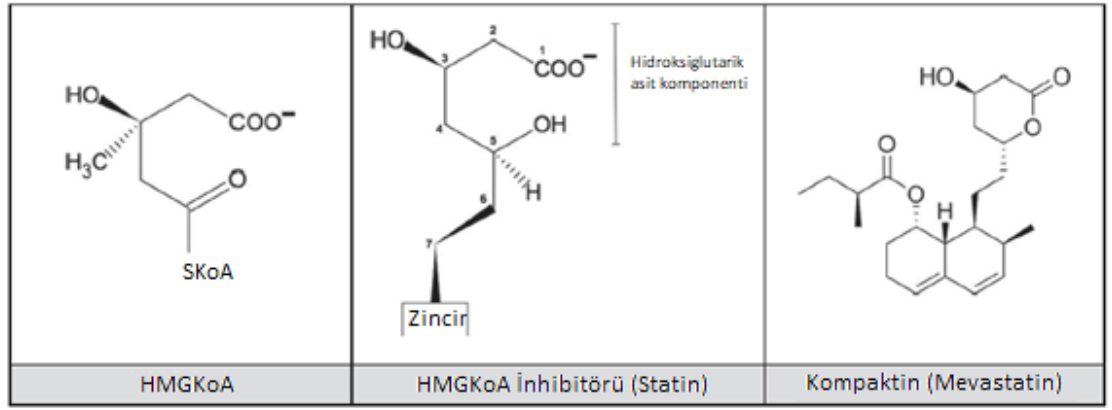
2.3.8 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A (HMG-KoA) redüktaz

HMGR (3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A redüktaz) (EC 1.1.1.88) iki adet dimer oluşturan dört özdeş monomer alt birimlerinden oluşan karmaşık bir zar geçiş proteindir. Her dimer iki adet aktif bölge içermektedir. Her aktif bölge monomerlerin iç bölgesinde yer almaktadır. Bir monomer nikotinamid dinükleotid kofaktörünün bağlanmasından sorumlu iken diğer monomer HMG-KoA (3-hidroksi-3-metilglutaril KoenzimA)'nın bağlanmasından sorumludur. HMGR'ı hedef alan klinik inhibitörler statinler olarak adlandırılır. Statinler kolesterol düşürücü tedavilerde yaygın olarak kullanılan etkili ve güçlü ilaçlardır (Endo vd. 1976). Kolesterol düşürücü etkilerinin yanısıra statinler, nitrik oksit varlığında kan damarı genişlemesinde (Kureishi vd, 2000), kemik oluşumunun uyarılmasında (Mundy vd. 1999), düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonuna karşı korumada, anti-inflamatuar etkileri ile birlikte, C-reaktif protein düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır (Davignon ve Laaksonen 1999). Tüm statinler, izoprenoidler ve sterollerin biyosentezini inhibe ederek çalışır (Corsini vd. 1995). Tepkimesel olarak 4 elektronun redüktif deasilasyona uğraması sonucu HMG-KoA (3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A) molekülünün koenzim A ve mevalonata dönüşmesi ile meydana gelmektedir. Tepkime şu şekilde gerçekleşir:



NADP-1 (Nikotinamid adenin dinükleotit-1), nikotinamid adenin dinükleotidin okside formudur. NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ise NADP-1'in indirgenmiş formudur. KoASH (Koenzim A sülfhidril fonksiyonel grup) ise koenzim A'nın indirgenmiş formudur. Statinler ilk olarak 1970 yılında Akira Endo tarafından *Penicillium citrinum* bakterisinin fermentasyon ürünlerinden elde edilen, HMGR üzerinde güçlü inhibitör etki gösteren bileşikler olarak keşfedilmiştir (Endo vd. 1976) (Şekil 2.14). Ticari olarak üretilen ilk statinler, doğal bir bileşik olan ve aynı zamanda kompaktin bileşiğine yakın kimyasal benzerliği ile lovastatinlerdir (Alberts vd. 1980).

1988 ve 1991 yıllarında piyasaya sürülen diğer iki statin (fluvastatin ve pravastatin) ile beraber bu üç statin inhibitörleri HMGR'ı hedef alan ilk nesil bileşikleridir temsil etmektedir (Tobert 2003). Kısa süre sonra ikinci nesil statinler geliştirilmeye başlanmıştır. Sentetik olarak üretilen bu statinler (simvastatin, atorvastatin, serivastatin, rosuvastatin ve pitavastatin) ilk nesilden daha iyi etki sunmaktadır (Tobert 2003).



Şekil 2.14 HMG-KoA, HMGR' ın doğal substratı ve ilk statin olarak kullanılan kompaktinin kimyasal yapısı (Oliveira vd. 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan; nikotinamidadenin dinükleotit fosfat (NADPH), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS), 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH), ksantin, ksantin oksidaz (XOD), kuersetin dihidrat, etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), HMGR kiti ve glutatyon (GSH) Sigma firmasından, 4-aminoantipirin (4-AP), hidrojen peroksit (H_2O_2), tert-butil hidroperoksit (t-BOOH) ve sodyum azit (NaN_3) Acros firmasından, sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), sodyum nitrat ($NaNO_2$) Carlo Erba firmasından, etil alkol (EtOH), sodyum karbonat (Na_2CO_3), potasyum mono fosfat (K_2HPO_4) ve potasyum di fosfat (KH_2PO_4), tris hidroklorid, tris baz, sodyum asetat ve glutatyon redüktaz (GR) Fisher Scientific firmasından, nitro blue tetrazolyum (NBT) ve horseraddish peroksidaz (HRP) Thermo Scientific firmasından, sodyum hidroksit (NaOH) alüminyum klorür ($AlCl_3$), gallik asit (GA) ve sodyum klorür (NaCl) Merck firmasından, ferulik asit TRC (Canada) firmasından analitik kalitede temin edilmiştir.

Çalışmada; ferulik asidin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve enzim aktivitelerinin hesaplanması amacıyla yapılan spektrofotometrik ölçümler için spektrofotometre (Biochrom Libra, UK) kullanılmıştır. Bunların dışında çalışmamızda kullanılan cihazlar; otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya), buzdolabı (Profilo, İtalya), Vorteks (Labnet, Türkiye), hassas terazi (Mettler Toledo, İspanya), pH metre (Hanna, Almanya), saf su cihazı (Millipore, Fransa), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Termal, Türkiye) firmalarından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Ferulik asidin antioksidan aktivite analizi

Bu çalışmada hazırlanan ferulik asidin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır (Blois 1958). DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından giderilmesi ile karakteristik mor rengin şiddetine bağlı olarak spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Ferulik asidin çeşitli konsantrasyonlarında (0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 mg/mL) saf DMSO içinde hazırlanmış 100 µL'lik çözeltileri, 400 µL etanol ve 500 µL'lik DPPH metanol çözeltisi ile karıştırılmıştır. 30 dakika, oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılıp, inkübasyon sonrasında 517 nm'de (OD517) ferulik asidin DPPH absorbansı okunmuştur. Örneklerin absorbans değeri köre karşı (100uL DMSO+400uL etanol+500uL DPPH) değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ferulik asidin % antioksidan aktivitesi aşağıda verilen formülden yararlanarak belirlenmiştir;

$$\% \text{ RSA} = [(\text{kontrol} - \text{örnek}) / \text{kontrol}] \times 100$$

3.2.2 Sığır karaciğerinden homojenat hazırlanması

Glutatyon-S-transferaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerinin tayini için sığır karaciğerinden elde edilen homojenat kullanılmıştır. Karaciğer dokusunun ağırlığının iki katı kadar, 0.15 M potasyum klorür, 1 mM EDTA ve 1 mM ditiyotritol içeren 10 mM'lık potasyum fosfat tamponu (pH=7.0) eklenmiştir. Sonra, doku homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C, 10,000 × g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan süpernatant alınıp temiz tüplere aktarılarak elde edilen süpernatant ikinci kez +4 °C, 30,000 × g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enzim aktivite tayinlerinde kullanılmak amacıyla mikro santrifüj tüpleri içerisinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Shomali Moghaddam vd. 2015).

3.2.3 Sığır karaciğerinden aldoz redüktaz enzim izolasyonu

Deneylede kullanılan AR enzimi normal şartlarda yetiştirilen sığırın karaciğer dokusundan izole edilmiştir. Mezbahadan alınan sığır karaciğer dokusu, bekletilmeden sıvı azot içerisine konulmuş ve enzim izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. İzolasyon işlemi daha önce optimize edilmiş yöntem (Yıldırım vd. 2014) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta, -80°C'de saklanmış karaciğer dokusu makas yardımıyla küçük parçalara kesilip 1 mM EDTA ile yıkanmış ve karaciğer dokusunun üç katı 1 mM EDTA, 50 µM PMSF çözeltisi kullanılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat +4°C'de, 10,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. % 40 doyumluk için, elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 22.6 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra, +4°C'de, 10,000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. % 40 doyumluktaki süpernatantı %50 doyumluğa ulaştırmak için, elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 5.8 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra tekrar +4°C'de, 10,000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. %50 doyumluktaki süpernatantı % 75 doyumluğa ulaştırmak amacıyla elde edilen her 100 mL süpernatant üzerine 15.9 gr katı amonyum sülfat eklenip 5 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve sonra tekrar +4°C'de, 10,000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen pellet, 50 mM sodyum klorür ile çözülerek enzim aktivite deneyleri yapılncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4 Ferulik asidin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Ferulik asidin glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirtmek amacıyla GPx enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren dolaylı ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutatyon ve hidrojen peroksidin su ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüşümü ile açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın ne kadar NADPH molekülünün NADP'ye oksitlediği 340 nm'de takip edilmiştir. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için triplike olarak gerçekleştirilmiştir. Ferulik asidin GPx enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için her örneğe karşılık kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. Kör (Tris-HCl-pH:8 Tamponu), enzim kontrolü (sadece DMSO) ve her konsantrasyondan 20uL ferulik asit içeren küvetlere sırayla 805µL 50 mM'lık Tris-HCl (pH=8.0) tamponu, 25µL glutatyon redüktaz (20 U/mL) enzimi, 100µL 20 mM'lık GSH, 25 uL 30mM'lık tert-bütül hidroperoksit, 25 µL 10 mM'lık NADPH ve 100 uL GPx enzimi (0,25U/mL) eklenerek karışımın toplam hacmi 1100uL'ye tamamlanıp karışım hazırlandıktan hemen sonra 340 nm'de optik dansitedeki (OD_{340}) düşüş, 5 dakika süresince takibe alınmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

$$EA \text{ (IU/mL)} = (OD_{340}/\text{dakika}) \times (1/e_{340}) \times (\text{seyreltme faktörü})$$

NADPH için 340 nm'deki sönmleme katsayısı (e_{340}) 0,00622 $\text{nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ olarak alınmıştır.

3.2.5 Ferulik asidin süperoksit dismütaz (SOD) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Ferulik asidin süperoksit dismütaz (SOD) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş metot, tarafımızdan kısmen değiştirilerek kullanılması planlanmıştır. SOD enzim aktivitesinin tayini amacıyla 0.3 mM ksantin, 12.5 mM nitro blue tetrazolyum (NBT) ve 10,4 u/mL ksantin oksidaz içeren ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşmuş süperoksit radikalleri, SOD enzim sisteminde kullanılmadığında ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve ortamda renk değişimine neden olmuştur. Ferulik asidin SOD enzim aktivitesine olan etkisini belirlemek için, her ferulik asit konsantrasyonuna karşılık kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. Kör, enzim kontrolü (sadece tampon) ve her konsantrasyondan 20 uL ferulik asit içeren küvetlerin üzerine sırayla 20 µL 1:2 oranında seyreltilmiş karaciğer homojenatı, 600 µL, sodyum karbonat (Na₂CO₃) tamponu (200 mM, pH=10.0), 300 µL ksantin (0.3 mM), 40 µL NBT (12,5 mM) ve XOD (0.28 U/mL) enziminden 20µL eklenmiştir. Örnek iyice karıştırıldıktan sonra küvetlerde oluşan reaksiyonların 550 nm dalga boyunda 5 dakika süresince absorbasları kaydedilmiştir. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda, elde edilen veriler aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ise Microsoft Excel programı yardımıyla analiz edilmiştir.

$$EA(U/mL) = (ODk\ddot{o}r - ODtest)/(ODk\ddot{o}r) \times (\text{seyreltme fakt\ddot{o}r\ddot{u}})$$

3.2.6 Ferulik asidin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Ferulik asidin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla katalaz aktivite tayini, bu enzimin hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyonun spektrofotometrik olarak 520 nm'de okunarak, peroksit miktarındaki düşmeye bağlı olarak görülecek absorpsiyondaki azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir (Aebi 1984).

Deney iki aşamalı olup, aktivite tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. İlk ferulik asit örneğinden 5µL oranında alınarak ve 1.5 mL'lik mikro santrifüj tüplerine konulmuştur. Ferulik asit 1 mg/mL – 0,03125 mg/mL aralığında DMSO ile 1:2 oranında seri seyreltmelerle hazırlanmıştır. Sonra, kör ve ferulik asit içeren mikro santrifüj tüplerine sırasıyla 100.1 U/mL katalaz enziminden 20µL, 50 mM'lık fosfat tamponundan 40 µL ve 10 mM'lık H₂O₂ çözeltisinden 100 µL eklenerek 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışıma 825 µL 15 mM'lık sodyum azit (NaN₃) ilave edilip ve 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra, her karışımdan 10'ar µL örnek alınarak ve yeni mikro santrifüj tüplerine konulup bunlara 1000 µL kromojen karışımı eklenerek, toplam hacim 1010 µL'ye tamamlanmıştır. Örnek iyice karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, ortamda kalan H₂O₂ ile kromojen arasında oluşan reaksiyonda ortaya çıkan pembe renk 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için triplike olarak gerçekleştirilmiştir.

Enzim aktivitesi aşağıda sunulan formüle yerleştirilerek hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL) = (\Delta H_2O_2/dakika) \times (\text{seyreltme faktörü}) / \text{deney hacimi}$$

Kromojen karışımı aynı günde kullanmak amacıyla 4-aminoantipirin (4-AP), sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS) ve horseraddish peroksidaz (HRP) enziminden (1mL:1mL:1µL) hazırlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar ise Microsoft Excel programı yardımıyla analiz edilmiştir.

3.2.7 Ferulik asidin glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Ferulik asidin glutatyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Habig tarafından geliştirilmiş yöntem (Habig vd. 1974) kullanılmıştır.

Deney düzeneğinde tampon ve kofaktör karışımı 20 mM'lık 10 mL fosfat tamponu (pH: 6,5), 50 mM'lık 400 uL GSH ile 7,6 mL ddH₂O şeklinde hazırlanmıştır. Reaksiyon, 10µL ferulik asit, 930µL fosfat tamponu (pH=6.5) kofaktör karışımı, 10 µL 1:3 oranında seyreltilmiş karaciğer homojenatı ve 20 mM'lık 50uL CDNB ile 1mL'lik toplam hacimde, 1mL küvette 120sn'de ve 340 nm dalga boyunda yürütülmüştür. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

$$EA(IU/mL)=(OD_{340}/dakika)\times(1/\epsilon_{340})\times(\text{seyreltme faktörü})$$

Sönümlenme Katsayısı CDNB için 9,60 nM⁻¹.cm⁻¹ dır.

3.2.8 Ferulik asidin aldoz redüztaz (AR) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enziminin aktivitesi daha önce yayınlanmış olan (Hayman ve Kinoshita 1965) spektrofotometrik metodun bazı modifikasyonlarla geliştirilmesi sonucu oluşturulan analiz metodu ile tayin edilmiştir. Bu yöntemde, substrat olarak kullanılan DL-Gliseraldehit, AR enzimi tarafından gliserole indirgenmiştir. Aynı zamanda, AR enziminin kofaktörü olan NADPH da NADP⁺ 'ya okside edilmiştir. Reaksiyon ortamı AR enzimi (4,54 u/mL) ve Li₂SO₄ (400mM), NADPH (1.5M) içeren fosfat tamponunun (50 mM, pH 6.2) eklenmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 5 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra 340 nm'de köre karşı okuma yapılmıştır ve üzerine DL-gliseraldehit (10mM) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımındaki absorbans azalması 6 dakika süresince takip edilmiştir. ΔOD'lerden ve NADPH'ın ekstinksiyon katsayısından yararlanarak AR enzim aktivitesi hesaplanarak enzim aktivitesi, her bir dakikada oksitlenen NADPH miktarına göre ifade edilmiştir. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için triplike olarak gerçekleştirilmiştir.

EA (IU/mL)=(OD₃₄₀/dakika)×(1/e₃₄₀)×(seyreltme faktörü) NADPH için 340 nm'deki sönümlenme katsayısı (e₃₄₀) 0,00622 nM⁻¹.cm⁻¹ olarak alınmıştır.

3.2.9 Ferulik asidin ksantin oksidaz (KO) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Deney karışımı 10µL ferulik asit, 300 µL fosfat tamponu (0.2 M, pH: 9.0) ve 100µL enzim solüsyonu (0,28 U/mL⁻¹) şeklinde hazırlanmıştır. Karışım oda sıcaklığında 2dk inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyon; 500µL ksantin solüsyonu (0.15 mM) eklenmesiyle başlatılmış ve absorbanstaki değişiklikler 2 dakika boyunca oda sıcaklığında 295nm’de okunarak kaydedilmiştir. Tüm deneyler 1mL küvetlerde ferulik asit için üçlü tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Ksantin oksidazın inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formülden hesaplanmıştır;

$$\% \text{inhibisyon ksantin oksidaz} = [(X-Y) \times 100] / X$$

X: örnek eklenmemiş tüpteki absorbanstaki değişiklik

Y: örnek eklenmiş tüpteki absorbanstaki değişiklik (Bangou 2011)

3.2.10 Ferulik asidin Hmg KoA redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

HMG-KoA redüktaz aktivitesi ve inhibisyon tahlili UV uyumlu bir 96 kuyulu mikro plakada HMG-KoA Redüktaz Test Kiti (Sigma) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 6ug enzim 37 ° C’de 400uM NADPH, 0.3 mg/ml HMG-KoA ve belirli bir HMG-KoA redüktaz inhibitörü olan farklı konsantrasyonda pravastatin ile inkübe edilmiştir.

$$\text{EA (IU/mL)} = \frac{(\text{OD}_{340} (\text{örnek}) / \text{dakika} - \text{OD}_{340} (\text{kör}) / \text{dakika}) \times (\text{seyreltme faktörü})}{12.44 \times 0.002 \times 0.6 \times 0.55}$$

Seyreltme faktörü deney sonuçlarınının 96’lık mikropakete ile okuması gerçekleştirildiği için 0.2mL alınmıştır.

3.2.11 İstatistiksel analiz

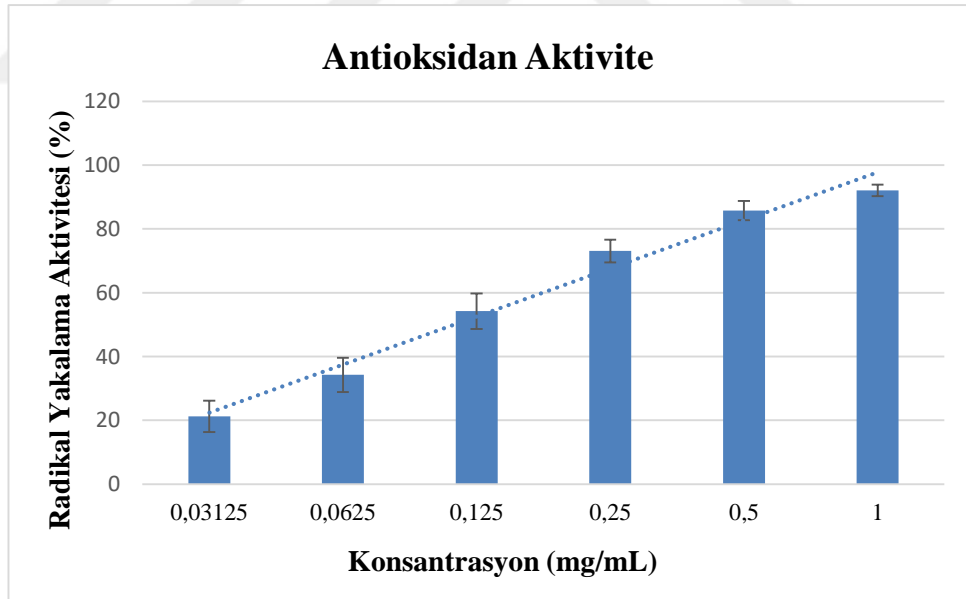
Tüm deneyler en az 3 bağımsız tekrar şeklinde ve 3 farklı günde analiz edilerek, değerler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Kontrol enzim aktiviteleri ile ferulik asitin altı farklı konsantrasyonları arasındaki değişiklik ve günler arasındaki anlamlı bir ilişki olup olmadığını karşılaştırmak için, Dunnett testi ve hesaplamalar için Excel kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



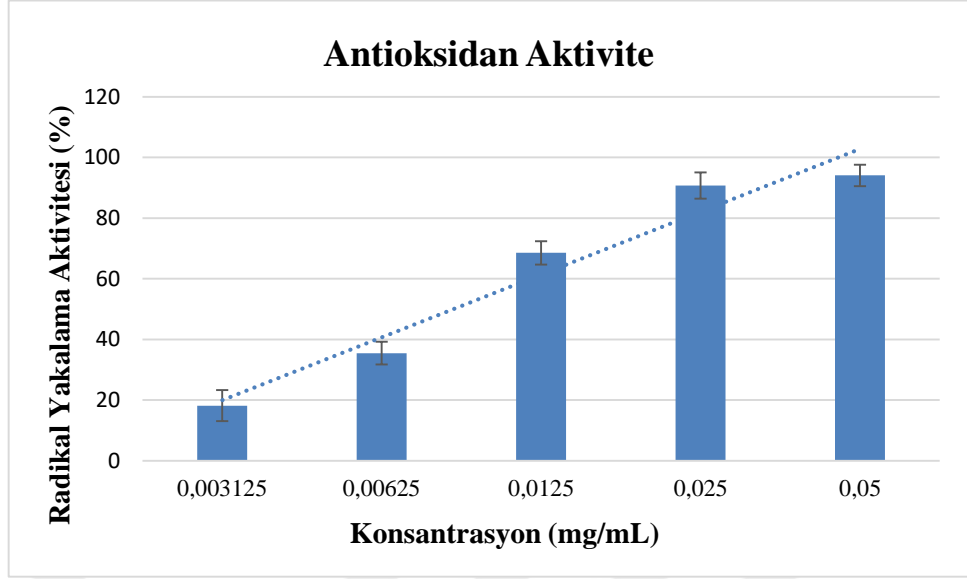
4. BULGULAR

4.1 Ferulik Asidin Total Antioksidan Aktivitesi

Bu çalışma ferulik asit bileşiğinin DPPH radikalini giderici etkisini saptamak amacıyla yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltileri standart olarak kullanılmıştır. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ferulik asit çözeltilerinin radikal giderici etkileri belirlenerek, total antioksidan aktivitesi hesaplanmıştır. Ferulik asidin DPPH radikalini temizleme yeteneği mg/mL cinsinden belirlenmiş ve IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir. Ferulik asidin farklı konsantrasyonlarda göstermiş olduğu antioksidan aktivite Şekil 4.1’de, standart olarak kullanılan gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivitesi ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Ferulik asit ve gallik asidin IC₅₀ değerleri ise Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Ferulik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiği



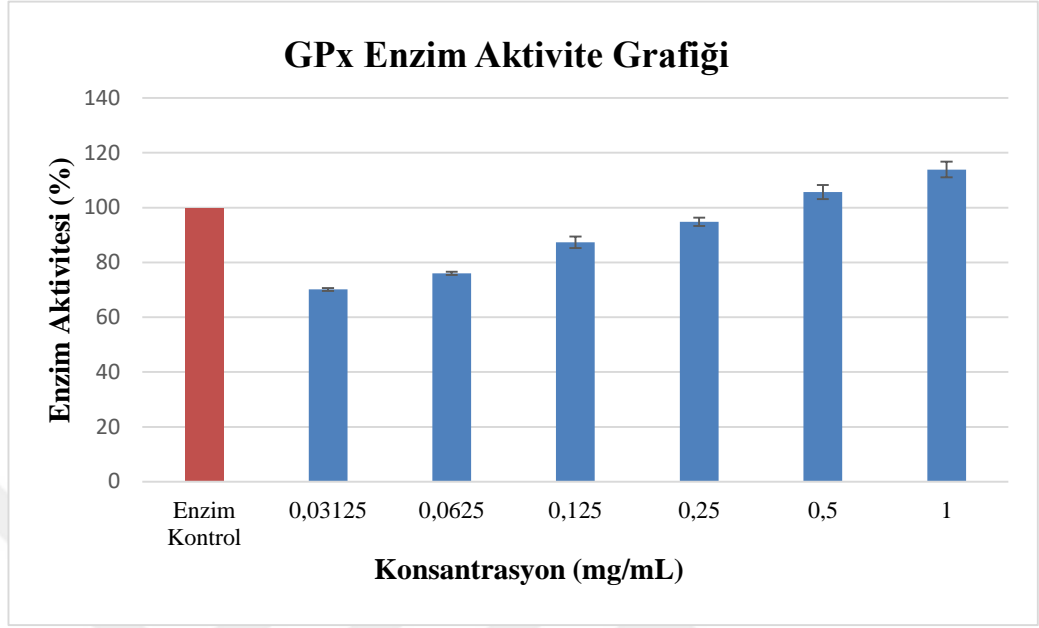
Sekil 4.2 Standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivite grafiği

Çizelge 4.1 Ferulik asit ve gallik asit çözeltilerinin IC₅₀ değerleri

Bileşik	IC ₅₀ değerleri (mg/mL)
Ferulik Asit	0,02164 ± 0,00477
Gallik Asit	0,003002 ± 0,00022

4.2 Ferulik Asidin Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini belirlemek için, glutasyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde GPx enzimi etkisiyle glutasyon (GSH) ve hidrojen peroksitin (H₂O₂), su ve yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüşümü sırasında açığa çıkan GSSG miktarına bağlı olarak, GR enziminin NADPH substratını NADP'ye dönüştürülmesi 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmiştir. Ferulik asit olmadan sadece GPx enziminin oluşturduğu aktivite değeri 3 mg/ml saf enzim için ölçülen 0.25 µmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kullanılmış ve ferulik asidin GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.3 Ferulik asit çözeltilisinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

DMSO içerisinde hazırlanmış ferulik asit çözeltilisinin sırasıyla 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında GPx enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

1 mg/mL konsantrasyonda, yani en yüksek dozda GPx enzim aktivitesinin kontrole göre % 13,89 arttığı görülmektedir. 0,5 mg/mL ferulik asit konsantrasyonunda ise GPx enzim aktivitesinin kontrole göre %5 olarak arttığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3).

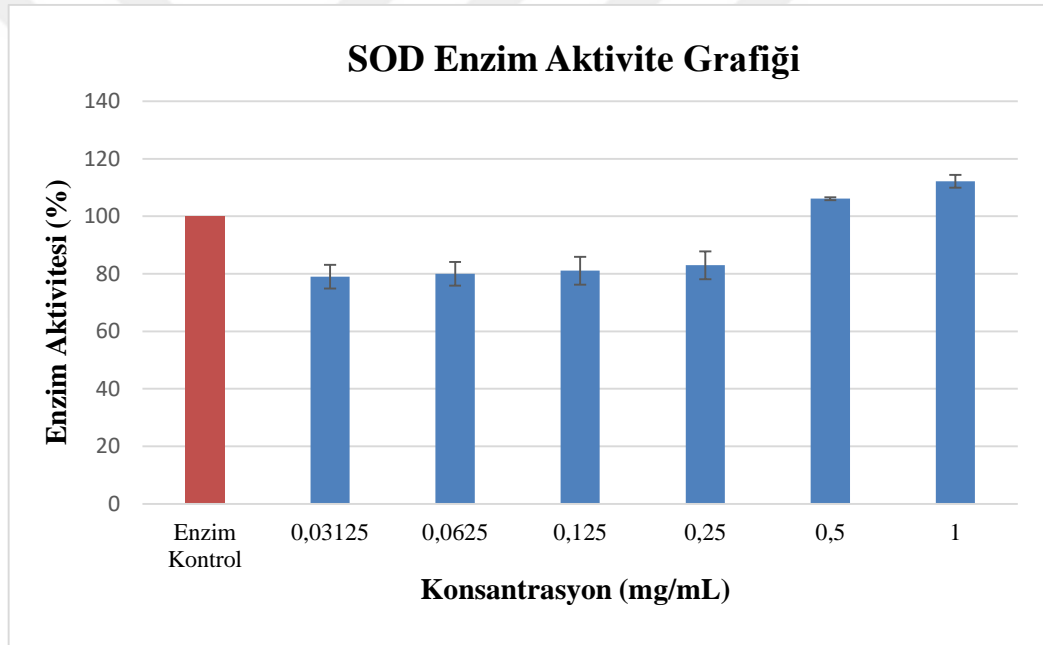
4.3 Ferulik Asidin Süperoksit Dismütaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

SOD enzim aktivitesini belirtmek amacıyla, Geller ve Wing (1984) tarafından geliştirilmiş yöntem kullanılmıştır. Sığır karaciğerinden elde edilen sitozol, SOD enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu metot dâhilinde, 30 mM, 25 mM NBT ve ksantin oksidaz içeren ksantin-ksantin oksidaz sisteminden meydana gelen süperoksit radikalleri

SOD enzim sisteminde kullanılmadığı takdirde ortamda bulunan NBT bileşiğinin redüksiyonuna ve dolayısıyla ortamdaki renk değişimine neden olmuştur.

Ortamdaki renk değişimi spektrofotometrik olarak 550 nm'de ortamda bulunan redüklenmiş NBT miktarına göre ölçülmüştür.

DMSO içerisinde hazırlanmış ferulik asit çözeltisinin sırasıyla 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında süperoksit dismutaz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır. 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL ferulik asit dozları için SOD enzim aktivitesindeki artış sırasıyla % 6,13 ve % 12,14 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).

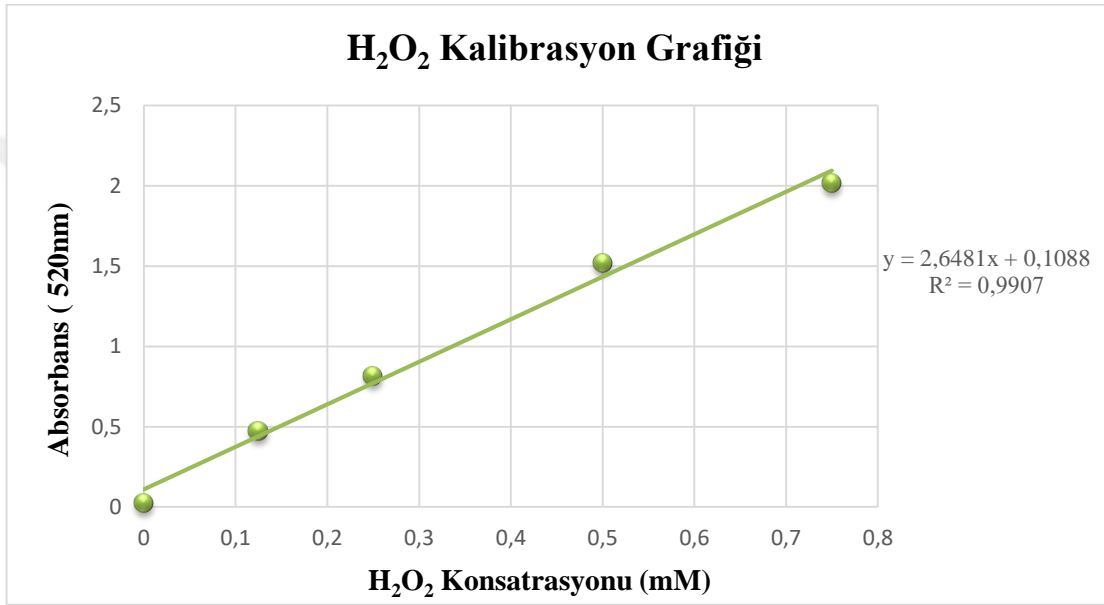


Şekil 4.4 Ferulik asit çözeltisinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

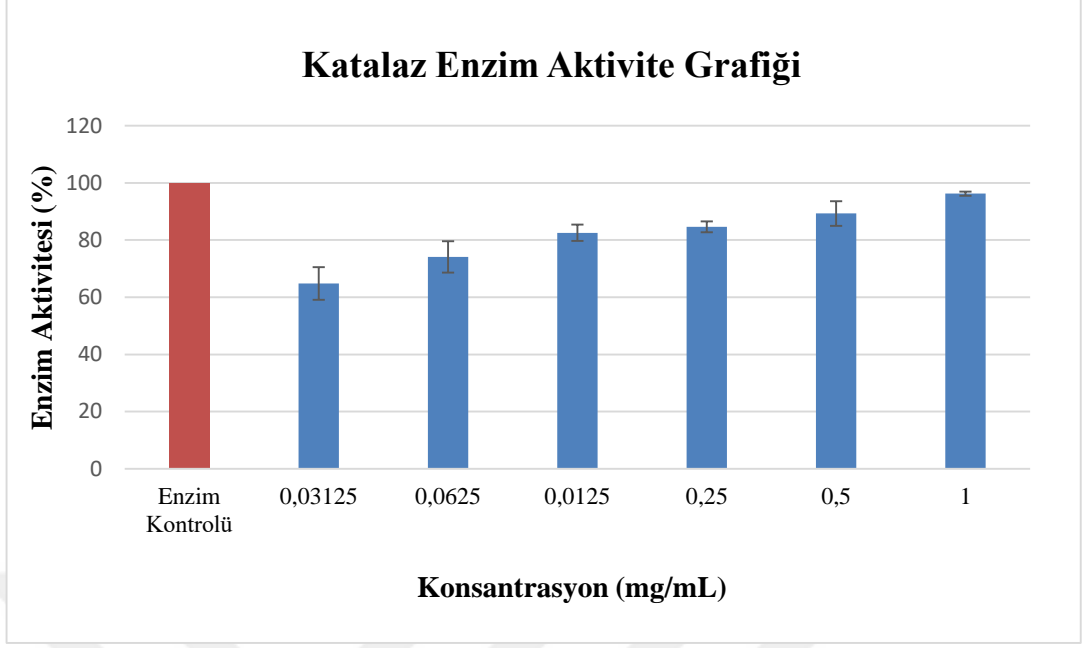
4.4 Ferulik Asidin Katalaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

Ferulik asidin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek için ortamdaki hidrojen peroksitin, kromojen reaktifi ile arasında oluşan reaksiyon spektrofotometrik olarak 520 nm dalga boyunda takip edilmiştir. Ferulik asit olmadan

sadece KAT enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4,53 mg/ml saf katalaz enzimi için 100,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve ferulik asit örneklerinin katalaz enzimi üzerine olan etkileri bu değerle kıyaslanarak elde edilmiştir. KAT enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan H_2O_2 çözeltileri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 H_2O_2 kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.6 Ferulik asit çözeltilisinin katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

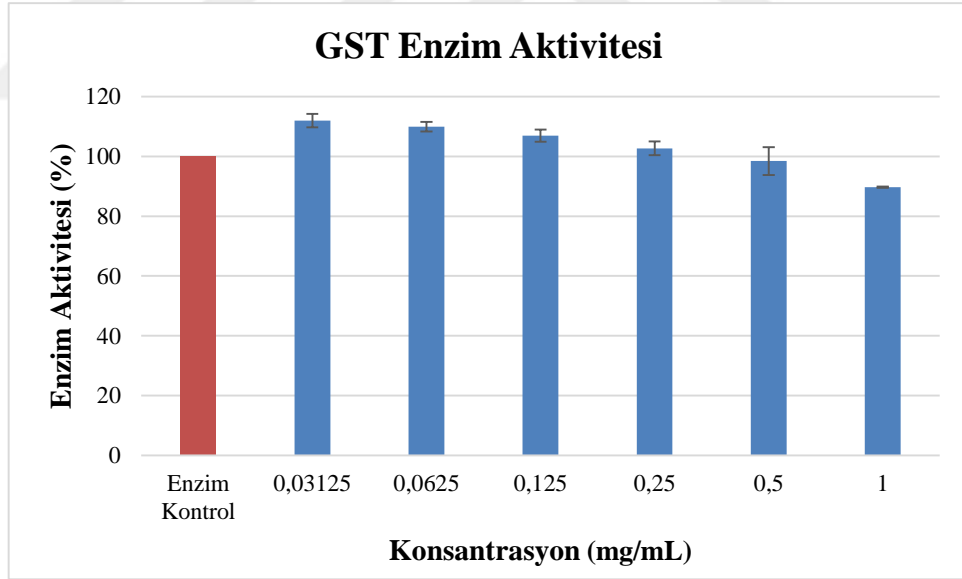
Ferulik asit çözeltilisinin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 mg/mL olmak üzere DMSO içerisinde hazırlanmış farklı konsantrasyonları kullanılmıştır.

Ferulik asidin tüm konsantrasyonları için hesaplanan KAT enzim aktivitesi % 100 enzim kontrolünün altında kalmıştır (Şekil 4.6).

4.5 Ferulik Asidin Glutatyon S-transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sığır karaciğer dokusundan elde edilen sitozol GST enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. GST enziminin aktivitesi, 340 nm’de CDNB-GSH konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ölçülmüştür. Ferulik asidin GST enzim aktivitesi üzerine etkisi içerisinde ferulik asit bulunmayan yani enzim kontrolü ile kıyaslanarak belirlenmiştir. GST enzim aktivite eğrisi Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

En yüksek ferulik asit konsantrasyonu olan 1 mg/mL için %11 oranında inhibisyon hesaplanmıştır. 0,5 mg/mL ferulik asit dozu için %2’lik bir inhibisyon değeri hesaplanmıştır. 0,03125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,125 mg/mL ve 0,25 mg/mL ferulik asit konsantrasyonları için ise sırasıyla % 11, % 9,9, % 6,95 ve % 2,7 oranlarında GST enzim aktivitesi olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).

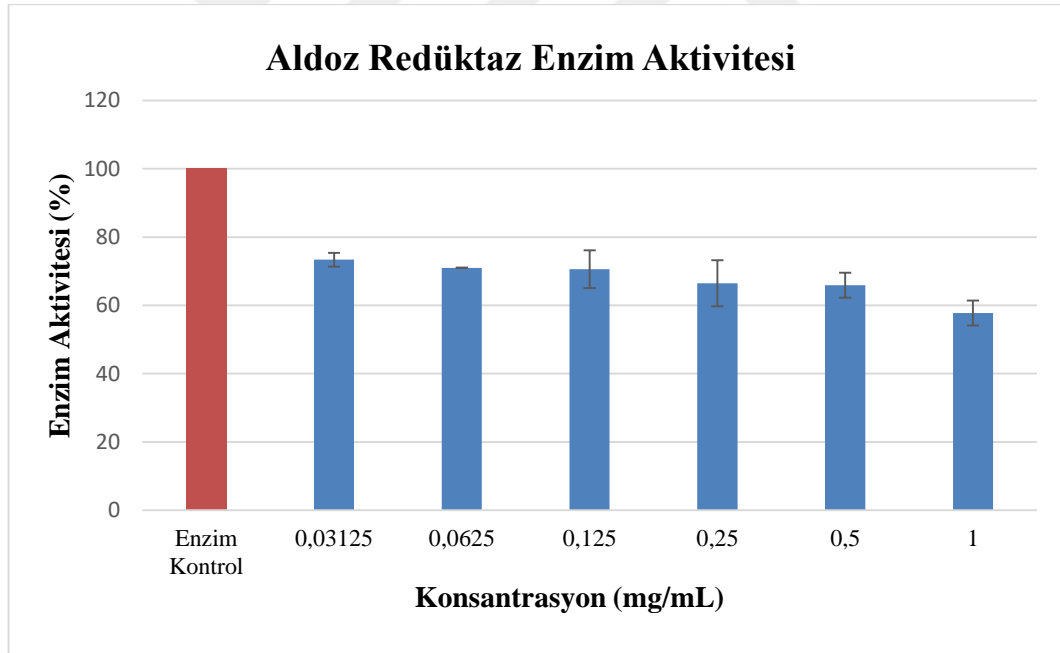


Şekil 4.7 Ferulik asit çözeltisinin glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.6 Ferulik Asidin Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan AR enzim aktivitesi 340 nm’de NADPH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ferulik asit çözeltileri olmadan, yani sadece AR enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4,54 mg/mL enzim için ölçülen 0,496 mg/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve ferulik asit çözeltilerinin AR enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değere kıyaslanarak belirlenmiştir. AR enzim aktivite eğrisi şekil 4.8’de sunulmuştur.

En yüksek ferulik asit konsantrasyonu olan 1 mg/mL için % 43 oranında inhibisyon hesaplanmıştır. En düşük ferulik asit konsantrasyon değeri olan 0,03125 mg/mL ise % 27 oranında bir inhibisyon gerçekleşmiştir.

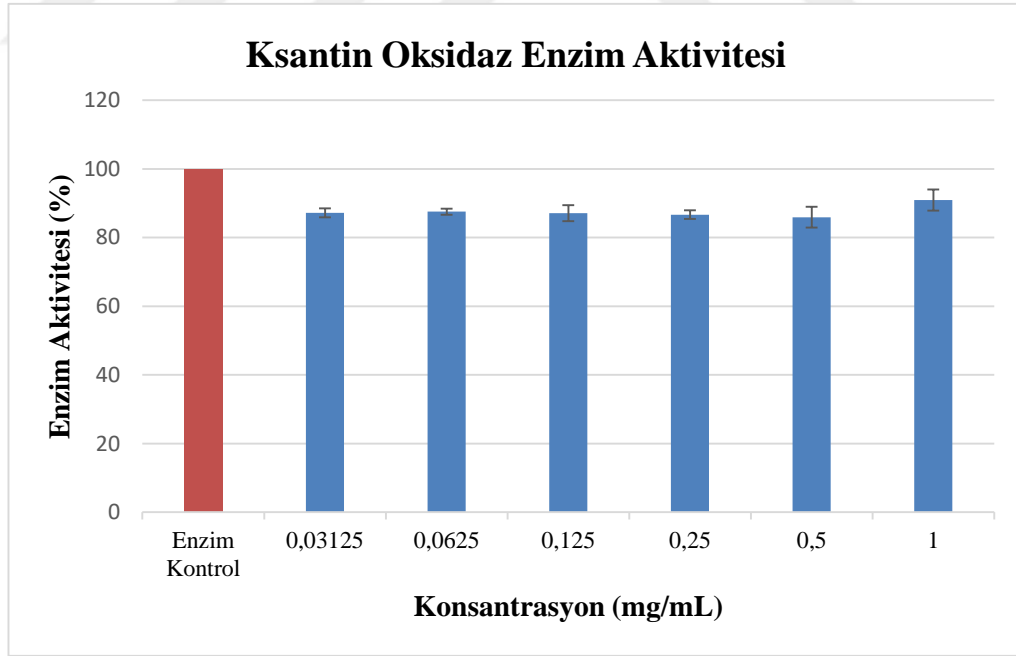


Şekil 4.8 Ferulik asit çözeltilisinin aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

4.7 Ferulik Asidin Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine Ekisi

Deney ortamında saf ksantin oksidaz enzim aktivitesi 295 nm’de ksantin konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür. 2:1 oranında seri dilüsyon ile DMSO içerisinde hazırlanan ferulik asidin çeşitli konsantrasyonları, köre karşı (ferulik asit içermeyen) okuması gerçekleştirilmiştir. Kör değeri %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve ferulik asit çözeltileri KO enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değeri ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Ksantin oksidaz enzim aktivite eğrisi Şekil 4.9’da gösterilmiştir.

Ferulik asidin tüm konsantrasyonlarında inhibisyon görüşmüştür. En yüksek ferulik asit konsantrasyonu olan 1 mg/mL için % 10 oranında inhibisyon hesaplanmıştır. En düşük ferulik asit konsantrasyon değeri olan 0,03125 mg/mL ise % 13 oranında bir inhibisyon gerçekleşmiştir.

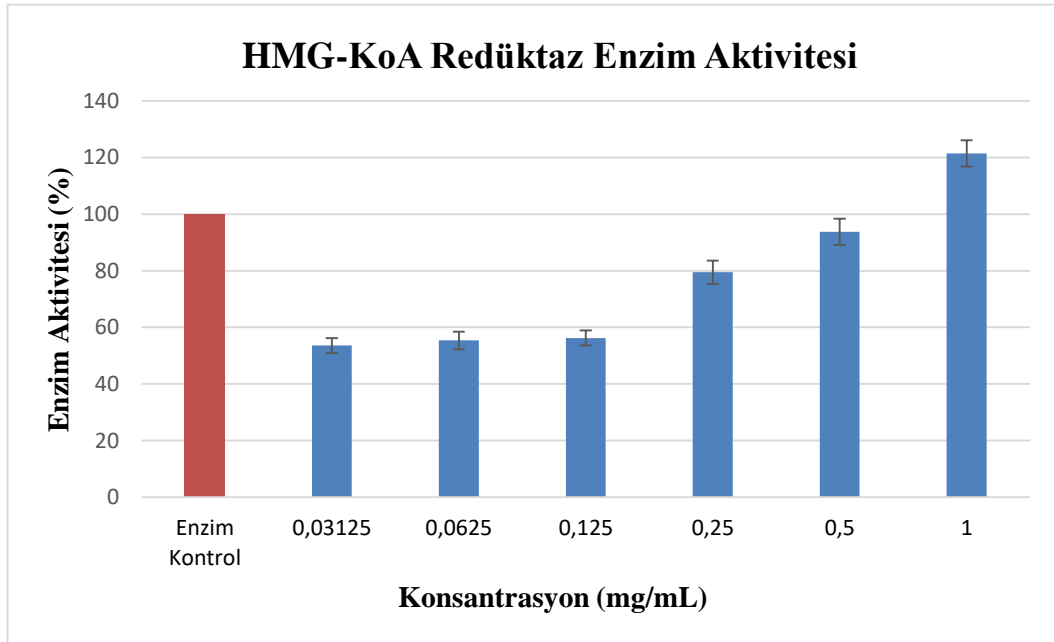


Şekil 4.9 Ferulik asit çözeltilisinin ksantin oksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

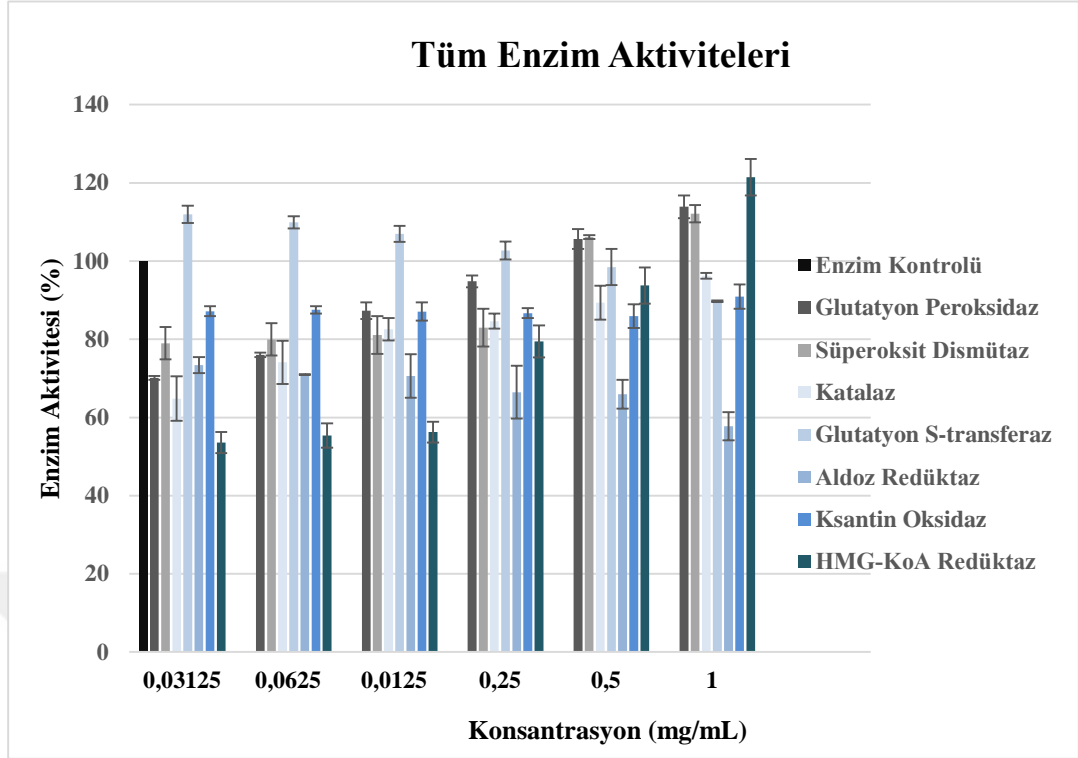
4.8 Ferulik Asidin HMG-KoA Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Ferulik asidin HMG-KoA redüktaz enzim aktivitesini belirlemek için Sigma'dan temin edilen HMG-KoA Redüktaz Assay Kit'i (Sigma) kullanılmıştır. Deney, substrat HMG-KoA'nın varlığında HMGR' in katalitik alt birimi tarafından NADPH' in oksidasyonunu temsil eden 340 nm' de absorbanstaki düşüşün spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Ferulik asidin aktivite tayini için; 179uL uygulama tamponu, 4uL NADPH, 12uL HMG-KoA, 2uL HMGR ve 3uL ferulik asit üç tekrarlı olarak 5 dakika boyunca 40sn'lik periyodlar halinde kinetik okuması yapılmıştır. Kör örnek için 184uL uygulama tampon, 4uL NADPH, 12uL HMG-KoA' nın yine 5 dakika boyunca kinetik olarak 40sn'lik periyodlar halinde okuması yapılmıştır.

En yüksek ferulik asit konsantrasyonu olan 1 mg/mL için % 21 oranında aktivasyon hesaplanmıştır. En düşük ferulik asit konsantrasyon değeri olan 0,03125 mg/mL ise % 47 oranında bir inhibisyon gerçekleşmiştir.



Şekil 4.10 Ferulik asit çözeltisinin HMG-KoA redüktaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi



Şekil 4.11 Ferulik asidin konsantrasyon aralığının çalışılmış tüm enzimlerin aktivitesi üzerine olan etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidasyon, hidrojen veya elektronları bir maddeden oksitleyici bir maddeye aktaran kimyasal bir reaksiyondur ve oksidasyon reaksiyonları serbest radikallere neden olabilir. Serbest radikaller ayrıca oksijen molekülünün kimyasal olarak indirgenmesinin bir sonucu olarak da üretilir (Kohen vd. 2002). Oluşan serbest radikaller biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Antioksidanlar, biyolojik sistemleri serbest radikallerin hasarlarına karşı korur. Yetersiz endojen ve eksojen antioksidan seviyeleri, oksidatif strese neden olabilir; oksidanlar ve antioksidanların bu dengesizliği dengesizliği, hücresel hasar veya ölümle sonuçlanabilir. Oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, enflamatuar hastalıklar ve erken yaşlanma (progeria) gibi çeşitli hastalıklarda önemli bir rol oynar (Valko vd. 2007, Uttara vd. 2009). Antioksidan kaynağı olarak bitki bileşenleri de birçok hastalığın önlenmesinde etkilidir (Krishnaiah vd. 2011). İkincil metabolitler, bir organizmanın büyümesine ve gelişmesine doğrudan dahil olmayan ve bitki savunmasında önemli bir rol oynayan organik bileşiklerdir. Örneğin birçok sektörde hammadde olarak kullanılırlar: besin antioksidanları, antimikrobiyaller ve farmasötikler gibi. Bitki sekonder metabolitlerinin en büyük sınıflarından biri fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, hücre içi moleküler hasarı ve diğer zararlı faktörleri önlemek için reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu temizleyerek veya önleyerek antioksidan savunmasında görev alırlar. Bitkiler, antioksidan vitaminler (A, C ve E), karotenoidler, koenzim-Q, likopenler ve fenolikler (fenolik asitler, flavonoidler, flavonoller, antosiyaninler, tanenler ve ligninler) gibi antioksidan aktiviteye sahip çeşitli tipte bileşikler içerir (Mollica vd. 2016).

DPPH yöntemi antioksidan analizler arasında en yaygın kullanılan yöntemdir. DPPH metodu basit, verimli ve kısmen diğer metodlara göre daha ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Diğer bir çok antioksidan methoda benzerlik göstererek, UV spektrofotometresi gerektirir. DPPH metodu 1958 yılında Blois tarafından geliştirilmiş ve 1995 yılında Williams's ve arkadaşları tarafından günümüzde kullanılan haline modifiye edilmiştir. DPPH molekülü sabit serbest radikallere sahip olup 517nm'de koyu mor renkte absorpsiyon vermektedir.

Antioksidan varlığında DPPH radikalleri ortama elektron veya hidrojen vererek daha kararlı DPPH molekülüne dönüşmektedir. Bu süreçte DPPH bileşiğinin orjinal rengi olan koyu mor, antioksidan aktivite ve konsantrasyon yoğunluğuna bağlı olarak sarımsı bir renge bürünür. Antioksidan molekülünün DPPH molekülünü %50 oranında süpürme yeteneği SC₅₀ (veya IC₅₀) olarak ifade edilmektedir (Molyneux 2004, Kedare vd. 2011).

Ferulik asit veya kimyasal olarak hidroksilatlanmış sinamik asit, fenolik bir fitokimyasal, güçlü bir antioksidan (Srinivasan vd. 2007, Ogiwara vd. 2002) olmasının yanısıra çeşitli terapötik etkileri olan önemli fito-molekülden biridir. Biyolojik sistemlerde hidroksil ve peroksil radikal oksidasyonuna karşı koruma sağlar (Kanski vd. 2002). Ferulik asit düşük toksisiteye sahiptir ve birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir (anti-enflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal aktivite, antikanser ve antidiyabetik etki). Ferulik asit bitki hücre duvarının önemli bir bileşeni olup ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ferulik asit serbest bir radikal temizleyicidir, aynı zamanda serbest radikal oluşumunu katalize eden bir enzim inhibitörüdür (Zdunska vd. 2018).

Fenolik asitlerin, özellikle de sinamik asit türevlerinin en önemli rollerinden biri, esas olarak fenil halkasına bağlı hidroksil ve metoksi gruplarının sayısına bağlı olarak değişiklik gösteren antioksidan aktiviteleridir (Bezerra vd. 2017, Aguilar-Hernandez vd. 2017). Ferulik asit vücutta daha kolay emilir ve diğer fenolik asitlere kıyasla daha uzun süre kanda kalır. Ferulik asit, üstün bir antioksidan olarak kabul edilir (Teengam vd. 2013). Ferulik asidin antioksidan etki mekanizması, esas olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya azotun oluşumunun inhibisyonuna istinaden eş zamanlı olarak serbest radikallerin nötrleştirilmesine (süpürme) dayanmaktadır. Buna ek olarak ferulik asit, protonlanmış metal iyonlarını (Cu(II), Fe(II) gibi) şelatlamaktan da sorumludur (Rice-Evans vd. 1996, Rice-Evans vd. 1997). Ferulik asit üç boyutlu kimyasal konfigürasyonu göz önüne alındığında serbest radikal temizleme özelliğinin yanısıra güçlü bir enzim inhibitörü olarak çalışır (Bezerra vd. 2017, Lodovici vd. 2011, Masella vd. 2004, Masella vd. 1999).

Ferulik asidin antioksidan aktivitesinin mekanizması, radikal molekülünün antioksidan molekülü ile tepkimesiyle stabil fenoksil radikalleri oluşturma kabiliyetine dayanmaktadır. Bu, serbest radikallerin oluşmasına yol açan karmaşık bir reaksiyon kademesinin başlatılmasını zorlaştırır. Ferulik asit aynı zamanda atomları doğrudan radikallere veren hidrojen vericisi olarak da işlev görebilir. İstenmeyen otoksidasyon işlemlerinden hücre zarı lipid asitlerini korunmak için ferulik asidin bu özelliği önemli bir noktada durmaktadır (Kiewlicz vd. 2015). Buna ek olarak bu koruma, hücre zarı peroksidasyonuna yol açan toksik hidroksil radikallerinin oluşumunda önler (Scharffetter-Kochanek vd. 2000).

Çalışmamızda ferulik asitin seri seyreltme yöntemiyle DMSO içerisinde çözerek hazırlanmış olduğumuz 1mg/mL – 0.03125mg/mL konsantrasyon aralığına sahip çözeltileri kullanılmıştır. Ferulik asidin altı farklı konsantrasyonu total antioksidan aktivite ölçümünde, antioksidan enzimlerin ve metabolik enzimlerin (GPx, GST, KAT, KO, AR, SOD ve HMG-KoA Redüktaz) aktivasyon/inhibisyon etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Antioksidan aktivite çalışmalarının ilk basamağı olarak, ferulik asidin radikal giderici etkileri DPPH yöntemiyle hesaplanmıştır. Çalışmalarımız sonucunda, ferulik asidin radikal temizleyici yeteneğinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Ferulik asidin hesaplanan radikal temizleyici etkisi, en küçük konsantrasyon için % 21,26 iken, maksimum konsantrasyona çıkıldığında bu oran % 92,05 olarak elde edilmiştir. Ferulik asit için hesaplanan IC₅₀ değeri ise 0,021647 mg/mL olarak bulunmuştur. Radikal giderici etki çalışmasında standart olarak kullandığımız gallik asit için hesaplanan IC₅₀ değeri 0.003002 mg/mL'dir. Gallik asit için hesaplanan radikal indirgeme gücü ise R = 0.974 olarak hesaplanmıştır. Xican Li ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada ferulik asit için hesaplanan indirgeme gücü R = 0.933 olarak belirlenmiştir. Çalışmalarımız sonucu ferulik asitin indirgeme gücü R = 0,98934 olarak hesaplanmıştır. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi elemanlarından süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), askorpiik asit (vitamin C), alfa-tokoferol (vitamin E), glutatyon (GSH), beta-karoten ve vitamin A'nın aktivasyon çalışmaları fotometrik analizler ile değerlendirilmektedir (Beaudeau vd. 1996, Hall vd. 1998, Jankowska vd. 1994, Stahl vd. 1998, Stait vd. 1996). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın ikinci basamağında güçlü bir antioksidan olarak

literatürde yer alan ferulik asidin altı farklı konsantrasyonu, antioksidan savunma sisteminin önemli üyeleri olan; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, aldoz redüktaz, glutatyon S-transferaz, ksantin oksidaz ve HMG-KoA redüktaz enzimleri üzerindeki aktivasyon ve inhibisyon etkileri spektrofotometrik ölçümler ile araştırılmıştır.

Ferulik asitin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda; maksimum konsantrasyonda %13,89 enzim aktivitesi hesaplanmıştır. 1mg/ml'lik ve 0,5mg konsantrasyonlar hariç kalan 4 konsantrasyonda dikkate değer inhibisyonlar hesaplanmıştır. En düşük ferulik asit konsantrasyonu olan 0,03125 mg/mL için % 0 enzim inhibisyonu gözlemlenirken, bu rakam 0,5mg/mL ferulik asit konsantrasyonu için % 5'e yükselmiştir.

Ferulik asitin süperoksit dismutaz enziminin aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek için yapılan çalışmada da maksimum konsantrasyonda % 12 enzim aktivitesinde artış hesaplanmıştır. Bu oran 0,5mg/mL ferulik asit konsantrasyonu için % 6 değerinde enzim aktivitesi şeklinde görülmüştür. 0,03125mg/mL olan en düşük konsantrasyona sahip ferulik asit çözeltisinin süperoksit dismutaz enzimi üzerine olan etkisi % 22 inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Bu oran 0,25mg/mL ferulik asit konsantrasyonu için % 18 enzim inhibisyonu olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz enzimi için yapılan çalışmalar sonucunda diğer iki enzim ile kıyaslandığında glutatyon peroksidaz enzim aktivitesine benzer bir grafik ortaya konulmuştur. Hesaplanan inhibisyon değeri 0,03125mg/mL ve 1mg/mL için sırasıyla % 36 ve % 4 iken diğer konsantrasyonlarında aktivite gözlenmemiştir. Hesaplanan tüm ferulik asit konsantrasyon değerleri genel itibariyle kontrolün altında kalmıştır.

Ferulik asitin glutatyon S-transferaz enzimi aktivitesine etkisi de benzer şekilde 0,03125 - 1 mg/mL konsantrasyon aralığında araştırılmıştır. Glutatyon S-transferaz enziminin aktivite/inhibite etkisinin değerlendirilmesi sonucu hesaplanan aktivite değeri 0,03125mg/mL ferulik asit konsantrasyonu için % 11 iken 1mg/mL için enzim inhibisyon değeri % 11 olarak hesaplanmıştır.

Aldoz redüktaz enzim aktivitesinin ferulik asit varlığında spektrofotometrik incelemesinde maksimum konsantrasyon olan 1mg/mL ferulik asit varlığında % 43 oranında inhibisyon görüldüğü hesaplanmıştır. İnhibisyon değeri en düşük konsantrasyon olan 0,03125mg/mL ferulik asit varlığında ise % 27 değerine gerilemiştir.

Ksantin oksidaz enzim aktivasyonu için yapılan deney için hesaplanan tüm ferulik asit konsantrasyon değerleri genel itibariyle kontrolün altında kalmıştır. Ksantin oksidaz enziminin inhibisyon değeri tüm ferulik asit konsantrasyonları için % 10-13 arasında değişmektedir.

Son olarak ferulik asitin HMG-KoA redüktaz enzim aktivitesine etkisi de benzer şekilde 0,03125 - 1 mg/mL konsantrasyon aralığında araştırılmıştır. HMG-KoA redüktaz enziminin aktivite/inhibite etkisinin değerlendirilmesi sonucu hesaplanan aktivite değeri 1mg/mL ferulik asit konsantrasyonu için % 21 iken 0,03125mg/mL için enzim inhibisyon değeri % 47 olarak hesaplanmıştır.

Ferulik asit, serbest bir radikal temizleyici olmasının yanısıra serbest radikal oluşumunu katalize eden bir enzim inhibitörüdür ve enzim aktivitesini arttırıcı etkileri direkt olarak kimyasal yapısı ile ilgilidir (Bezerra vd. 2017; Lodovici vd. 2001; Masella vd. 2004, Masella 1999). Ayrıca yara iyileşimi sırasında ferulik asit içerikli merhem kullanımının lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği buna bağlı olarak katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon enzim aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu bağlamda ferulik asit, yaranın iyileşme sürecinde, yaranın büzülmesini önemli ölçüde hızlandırdığını öne sürülmektedir (Ghaisas vd. 2014). Literatür verileri, ferulik asit ve türevlerinin, ksantin oksidaz ve siklooksijenaz aktivitesinin azaltılmasındaki yüksek etkinliğini rapor etmektedir (Nile vd. 2016). Ferulik asidin, enzim katalizli dönüşüm mekanizmasının ürettiği ROS miktarını azalttığına inanılmaktadır (Nile vd. 2016).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan aktiviteye sahip enzimler, saf etanol, saf ayçiçek yağı varlığında sıçan karaciğerlerinde önemli ölçüde aktiviteyi düşürücü etki göstermiştir (de Paiva, 2013). Bizim elde ettiğimiz veriler

doğrultusunda ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan GST ve KAT enzimleri için sırasıyla en düşük ferulik asit konsantrasyonunda (0,003125mg/mL) yaklaşık % 35 enzim inhibisyonu ve % 11 enzim aktivasyonu görülmüştür. En düşük konsantrasyonda GST üzerinde ferulik asidin yaklaşık % 11 enzim aktivasyonu göstermesi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu açısından anlamlı bulunmuştur.

Aldoz redüktaz enzim aktivitesi hiperglisemi (yüksek şeker) ile ilişkili olarak kabul edilen lense ve siyatik sinirlerde yüksek orandan bulunmaktadır. Sonuç olarak, dokularda katarakt, diyabetik nefropati, diyabetik nöropati, diyabetik retinopati oluşumuna yol açmaktadır. Aldoz redüktaz inhibitörleri bu tip doku hasarı durumlarında etkili ajanlar olarak kullanılmaktadır. Poliöl yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktazı ve sorbitol dehidrogenaz, glikozu sırasıyla sorbitole ve fruktoza çevirmektedir. Oluşan sorbitol hücre zarından kolayca diffüze olamaz. Bu nedenle hücre içinde birikerek osmotik strese neden olmaktadır. Son basamak olarak osmotik stres, oksidatif stresi takip ederek epitel dokularda hasara yol açacaktır. Ferulik asit gibi antioksidan özelliği kanıtlanmış bir molekül, çalışmalarımız sonucu en yüksek konsantrasyonda (1mg/mL) yaklaşık % 40 oranında aldoz redüktaz enzimini inhibe edebilmiştir.

Pürin metabolizmasının insanlarda son ürünü ürik asittir. Pürin metabolizmasında ise DNA ve RNA sentezi büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda kullanılan ferulik asidin en yüksek ve en düşük konsantrasyonlarında ksantin oksidaz enzimi yaklaşık % 15 oranında inhibe edilebilmiştir. Antioksidan moleküllerin DNA hasarı üzerindeki etkisi göz önüne alındığında bu oran gelecek vaad etmektedir.

Çalışmamızda kullanılan HMG-KoA enzimi yüksek şeker hastalarında kolesterolün inhibe edilmesi mekanizmasında görev almaktadır. Statinler adı altında satılan HMG-KoA inhibitörleri bu enzimin inhibisyonunda görev almaktadır. Hiperglisemi hastaları için önemli bir kaynak olan bu inhibitörler enzimin insanlarda endoplazmik retikulum üzerinden üretimi ile ilişkilidir. Bu nedenle çalışmamızda, güçlü bir antioksidan molekül olan ferulik asidin en yüksek konsantrasyonda yaklaşık % 20 oranında enzim aktivasyonu göstermesi ileri ki çalışmalar için önemli bir kaynak olarak yerini alacaktır. Bununla birlikte, FA'nın çeşitli dozları verilen sıçanların karaciğerinde ise bu enzimlerin

aktiviteleri arttırılmış ve oksidatif stresin azaltılması en düşük dozda (20 mg FA / kg vücut ağırlığı) bile sağlanabilmiştir (de Paiva, 2013). Bu pozitif sonuçlar, FA' nın diyetle yaygın olarak alınan toksinlere karşı hepatoprotektif bir ajan olduğunu ve hiçbir yan etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Bu nedenle FA, karaciğer hasarının alternatif tedavileri için potansiyel bir molekül olarak kabul edilebilir. Bizim çalışmamızda ise, 1mg/mL ferulik asit konsantrasyonunda karaciğerin en önemli enzimlerinden olan katalaz enzimi için kontrol altında bir değer alınmıştır. İleri ki çalışmalar için daha yüksek bir ferulik asit konsantrasyonu belirlenmesi enzim aktivitesi üzerindeki etkiyi etkileyeceği yorumlanmıştır. FA ayrıca, Srinivasan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, karbon tetraklorür tarafından *in vivo* olarak indüklenen toksisiteye karşı hepatoprotektif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Paiva vd. 2013).

Yeh ve Yen (2006), *in vivo* sistemde FA'nin modölatör etkilerini araştırmış, çalışmalarında fareler 14 gün boyunca 100 mg FA / kg vücut ağırlığında doz almışlardır. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviteleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında FA uygulamasından sonra yükselmiş ($p < 0.05$) ve FA ile muamele edilen sıçanların karaciğer homojenatları kontrol grubundan daha fazla oksijen radikal emme kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri, tedavi edilmemiş diyabetik gruba kıyasla FA dozları alan diyabetik sıçanların karaciğerinde daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Akciğerlerin ana enzimatik antioksidanları SOD (EC 1.15.1.11), katalaz (EC 1.11.1.6) ve GSH-Px (GPx) enzimleridir (EC 1.11.1.9) (Birben vd. 2012). H₂O₂ ve lipid hidroperoksitlerin (membran lipid peroksidasyonunun bir sonucu olarak üretilir) azalmasından sorumlu olan redoks döngüsündeki enzimler arasında GSH-Px' ler (Flohé L. 1998) bulunur. GSH-Px' ler, aktif merkezlerinde özel bir aminoasit olan selenosistein içeren tetrametik enzim ailesi üyesidir. Selenosisteinler aktif merkezlerinde düşük moleküler ağırlıklı tiyoller barındırır. Buna örnek olarak, GSH, H₂O₂' i ve lipid peroksidazlarına karşılık gelen alkollerine indirgeme görevi vardır. GSH-Px-3 (hücre dışı GSH-Px), hücre dışı bölümde bulunan ve memelilerdeki en önemli hücre dışı antioksidan enzimden biri olduğuna inanılan GSH-Px ailesinin tek üyesidir. Bu aile içerisinde, hücre

dışı GSH-Px' ler, insan akciğerinde en yaygın şekilde araştırılan grubu kapsamaktadır (Comhair vd. 2001). Süperoksit, çeşitli kaynaklardan üretilen birincil ROS olmasında dolayı, SOD ile dismutasyonu tüm hücreler için birincil öneme sahiptir. 3 farklı SOD formunun hepsi, yani CuZn-SOD, Mn-SOD ve EC-SOD, insan akciğerinde yaygın olarak eksprese edilir. Mn-SOD, mitokondri matrisinde lokalizedir. EC-SOD temel olarak hücre dışı matrikste, özellikle de yüksek miktarda tip I kollajen lifleri içeren bölgelerde ve pulmoner ve sistemik damarların çevresinde lokalizedir. Ayrıca bronşiyal epitel, alveolar epitel ve alveolar makrofajlarda da tespit edilmiştir (Kinnula ve Crapo 2003, Kinnula 2005). Genel olarak, CuZn-SOD ve Mn-SOD' ın, genellikle süperoksit radikallerinin temizleyicileri olarak hareket ettiği düşünülmektedir (Birben vd. 2012). Katalaz, her biri aktif bölgede bir heme grubu içeren 4 eş monomerden oluşan bir tetramer olarak bulunur. H₂O₂' ın degradasyonu, katalaz-ferrikatalaz'ın (suya koordine edilmiş demir) 2 konformasyonunun ve bileşik I (bir oksijen atomuyla komplekslenmiş demir) arasındaki dönüşüm yoluyla gerçekleştirilir. Başka bir antioksidan enzim ailesi olan GST'ler (EC 2.5.1.18), doymamış aldehytler, epoksitler ve hidroperoksitler gibi ikincil metabolitleri etkisiz hale getirir. GST aynı zamanda eikosanoid ve GSH metabolizmasında rol oynamaktadır (Jakobsson vd. 1999).

Aldoz redüktaz inhibitörleri, biyotransformasyon enzim indüksiyonunda türlere bağlı farklılıklara sahip oldukları bilinmektedir. Antioksidan potansiyeli olan aldoz redüktaz inhibitörlerinin oksidatif stres yolunu değiştirip değiştirmediği bilinmemektedir (Spycher vd. 1997). Buna örnek olarak, aldoz redüktaz mRNA'sı, birkaç farklı oksidatif stres etkeni tarafından uyarılması sebebiyle aldoz redüktazın kendisinin hücrel antioksidan savunma mekanizmalarına dahil olabileceğini düşünülmektedir (Spycher vd. 1997). Fenolikler ve flavonoidler, siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve lipooksijenaz gibi metabolik enzimlere karşı güçlü inhibitörler olarak görev yapabilir (Hoorn vd. 2002). Statinlerin antioksidan özellikleri arasında, bu ajanların lipit düşürücü etkilerinden bağımsız olarak koruyucu kardiyovasküler etkilerine karşı katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, statinlerin glukoz homeostazı üzerindeki olası olumsuz etkileri redoks sistemi ile ilgili olabilir. Bu nedenle redoks sinyallerinin statinlerle modülasyonunu araştıran çalışmalara ihtiyaç vardır (Lim ve Barter 2014).

Ferulik asidin çeşitli antioksidan özellik gösteren enzimler ve metabolik yollarda görevli enzimler üzerindeki etkisinin belirlenmesi ile ilgili mevcut çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalar içerisinde spektrofotometrik yöntemlerle direkt etkisi bizim çalışmamızda kullandığımız enzimler üzerinde çalışılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız literatürde önemli bir noktada yer alacaktır. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar ferulik asidin HMG-KoA redüktaz enzimini inhibe etme ve glukokinazı aktive etme, sırasıyla hiperkolesterolemi ve hiperglisemiye azaltmak için katkıda bulunan güçlü antioksidan aktivitesinin yanısıra farmakolojik özelliklerinin de bulunduğu belirtilmiştir (de Paiva vd. 2013).

Shivraj Hariram Nile ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada 10-100ug/mL konsantrasyon aralığında DMSO içerisinde hazırlanmış ferulik asit çözeltilerinin ksantin oksidaz inhibitor aktivitesi spektrofotometrik yöntemler ile değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak allopurinol çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen inhibisyon yüzdeleri çalışmamıza çok yakın benzerlik göstermektedir. Aynı çalışma içerisinde ferulik asidin sitotoksitesini belirlemek için CCK-8 (Hücre Sayım Kiti-8) kullanılmıştır. Ferulik asidin farklı çözenlerde hazırlanmış çözeltileri T24 (Chiung-Chi vd. 2013), MDA-MB-231 (Eunmi 2016) gibi çeşitli hücre hatlarında araştırılmıştır.

Srinivasan ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada, ferulik asidin gama radyasyonuna maruz kalan sıçanların karaciğerinden izole edilen hepatositlerdeki koruyucu etkilerini değerlendirmiştir. Hücrelerin 1, 5 ve 10 mg/mL ferulik asit çözeltileri ile ön muamele edilmesi sonucu ferulik asidin DNA hasarını, ROS oluşumunu ve antioksidan enzimlerin seviyelerini arttırdığı belirtilmiştir. Bu nedenle ferulik asidin radyoterapide, radyoprotektif bir ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Aditya Ganeshpurkar ve arkadaşlarının 2014 yılında tamamladıkları çalışma dâhilinde, ferulik asidin potansiyel immünomodülatör bileşik olarak kabul edilebileceğini göstermişlerdir.

Terapötik öneminin yanı sıra, çeşitli deneysel koşullar altında ferulik asidin *in vivo* davranışının incelenmesi gelecek araştırmalar için önemli bir pozisyonda yer alacaktır.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar ve ferulik asit ile hali hazırda yayınlanmış makaleler göz önüne alındığında, ferulik asidin, kimyasal formülünde yer alan metoksi ve hidroksi gruplarının aktivite gücü sebebiyle önemli bir konumda olduğu bilinmekteydi. Ferulik asidin üç boyutlu kimyasal yapısından kaynaklı olarak belirtilen bir avantaj içerisinde olduğu, aynı zamanda araştırmamızın temelini oluşturan ferulik asidin sığır karaciğer homojenatından aynı gün içerisinde saflaştırılan sitozolün, aldoz redüktaz, glutatyon S-transferaz ve ksantin oksidaz enzimleri için kaynak olarak kullanılması ile ferulik asidin altı konsantrasyonun etkisi incelenmiştir. Glutatyon peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz ve HMG-KoA redüktaz enzimleri için saf ticari enzim kullanılmıştır. En düşük konsantrasyon olan 0,03125mg/mL ferulik asit, sadece glutatyon S-transferaz enzimi üzerinde % 11,1 oranında bir aktivite göstermiştir. En yüksek konsantrasyon olan 1mg/mL ferulik asit çözeltisi varlığında, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve HMG-KoA redüktaz enzimleri üzerinde % 12-21 oranında aktivite artışı göstermişlerdir.

Ferulik asidin inhibitör etkisi glutatyon S-transferaz enzimi dışında 0,03125mg/mL/0,25mg/mL aralığında çok belirgin bir şekilde sonuçlarda görülmektedir. Buna paralel olarak veri analiz yöntemi olarak kullandığımız Dunnett testinden elde ettiğimiz veriler doğrultusunda SOD, GST, KO, HMG-KoA, KAT ve GPx için hesaplanan aktivite/inhibite değerleri anlamlı olarak sonuçlanmıştır. Buna ek olarak ferulik asidin 3 farklı gün içerisinde tekrarlanması sig. faktörünün $p < 0,05$ değerinden büyük olması sebebiyle anlamlı bulunmamıştır. Antioksidan ve metabolik enzim aktivite/inhibite etkisinin direkt olarak kinetik okumalar ile belirlenmesi literatürde bu konu hakkında olan boşluğu doldurmuştur. Gelecek çalışmalar için aydınlatılması düşünülen farklı parametrelerin ferulik asit üzerinde incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Adams R. ve Bockstahler TE. 1952. Preparation and reaction of hydroxycinnamic acids and esters. *Journal of the American Chemical Society* Soc 74:5346–5348
- Aebi, H. 1984. "Catalase in vitro." *Methods in Enzymology* 105; 121-6.
- Agostini-Costa T, Vieira RV, Bizzo HR, Silveira D. ve Gimenes MA. 2012. Secondary Metabolites. In *Chromatography and Its Applications*; Dhanarasu, S., Ed.; InTech.
- Aguilar-Hernandez, Afsethb NK, López-Lukec T. Contreras-Torresa FF., Woldb JB, - Sotoa NO. 2017. Surface enhanced Raman spectroscopy of phenolic antioxidants: a systematic evaluation of ferulic acid, p-coumaric acid, caffeic acid and sinapic acid. *Vibrational Spectroscopy* 2017; 89: 113–122.
- Akar Z. Küçük M, Doğan H. 2017. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2017 Vol 32, No. 1, 640-647
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* S A.; 77(7):3957–3961.

Allocati N¹, Federici L, Masulli M, Di Ilio C. 2009. Glutathione transferases in bacteria. FEBS Journal. 2009; 276:58–75.

Amalraj R. ve Gopi S., 2016. Biological activities and medicinal properties of Asafoetida: A review Journal of Traditional and Complementary Medicine.

Andersen OM. 2008 Recent Advances in the Field of Anthocyanins—Main Focus on Structure Recent Advances in Polyphenol Research; Daayf, F; Lattanzio, V., Eds.; Blackell Publishing: Chichester, UK, Vol. 1; pp 167–201.

Andersen ve Markham 2006. Flavonoids e Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA.

Angelucci F¹, Baiocco P, Brunori M, Gourlay L, Morea V, Bellelli A. 2005. Insights into the catalytic mechanism of glutathione S-transferase: the lesson from *Schistosoma haematobium*. Structure. 2005 Sep;13(9):1241-6.

Aprioku JS. 2013. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis, The Journal of Reproduction & Infertility. 2013; 14(4):158-172

Azmi AS¹, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. FEBS Letters 580:533–8.

Balakrishnan S¹, Manoharan S, Alias LM, Nirmal MR.2010. Effect of curcumin and ferulic acid on modulation of expression pattern of p53 and bcl-2 proteins in 7,12 -dimethylbenz[a]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Indian Journal of Biochemistry Biophysics 2010; 47: 7-12.

- Bangou MJ¹, Kiendrebeogo M, Meda NT, Coulibaly AY, Compaoré M, Zeba B, Millogo-Rasolodimby J, Nacoulma OG. 2011. Evalotion of Enzymes Inhibition Activities of Medicinal Plant From Burkina Faso.
- Barondeau DP¹, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED. 2004. Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry*. 2004; 43:8038–8047.
- Bartolomé B¹, Faulds CB, Kroon PA, Waldron K, Gilbert HJ, Hazlewood G, Williamson G. 1997. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp *cellulosa* esterase (XylD) release a 5-5'- ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *App Environ Microbiol* 63:208–212 (1997).
- Bate-Smith ve Swain 1962. Flavonoid compounds. In: Mason HS, Florkin AM (eds) *Comparative biochemistry*, vol III. Academic Press, New York, pp 755–809
- Battino M¹, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. 2002. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 29:189–94.
- Beaudeau JL¹, Gardes-Albert M, Delattre J, Legrand A, Rousselet F, Peynet J. 1996, Resistance of lipoprotein(a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low-density lipoprotein. *Biochem J* 1996; 314: 277–84.
- Bezerra G, Pereira M, Ostrosky E, Barbosa E, Moura M, Ferrari M, Aragão C, Gomes A: Compatibility study between ferulic acid and excipients used in cosmetic formulations by TG/DTG, DSC and FTIR. *J Therm Anal Calorim* 2017; 127: 1683–1691.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense, World Allergy Organization

- Blois 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*;181:1199–200.
- Bokern M, Heuer S, Victor W, Witte L, Macek T, Vanek T, Strack D. 1991. Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* 30:3261–3265.
- Bonnina E, Brunel M, Gouy Y, Lesage-Meessen L, Asther M, Thibault J. 2001. *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruloyl esterases. *Enzyme Microbial Technology* 28:70–80.
- Borges F, Fernandes E, Roleira F. 2002. Progress towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Curr Medicine Chemistry* 2002; 9:195-217
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi A., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (2001) 839–851
- Bourne ve Rice-Evans 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochemistry Biophysics Res Commun* 253:222–7.
- Brigelius-Flohé ve Maiorino 2013. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3289–3303
- Bueno JM, Kuskoski EM., Navas MJ. and Asuero AG. 2012. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42:102–125, 2012
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure Activity Relationships. *Free Radic. Biol.Med.* 1997, 22 (5), 749–760.

- Changjin Z. 2013. Aldose Reductase Inhibitors as Potential Therapeutic Drugs of Diabetic Complications, Diabetes Mellitus Chapter 2, 2013.
- Chelikani P¹, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.*; 61:192–208.
- Cheng C. Shan-yu Su, Nou-ying Tang, Tin-yun Ho, Wan-yu Lo. ve Ching-liang Hsieh2010. Ferulic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis by enhancing GABA (B1) receptor expression in transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31: 889-899.
- Chiang C. 2003. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am J Chin Med* 31:37–46.
- Chiung-Chi Peng, Charng-Cherng Chyau, Hui-Er Wang, Chi-Huang Chang, Kuan-Chou Chen, Kuang-Yu Chou, and Robert Y. Peng: Cytotoxicity of Ferulic Acid on T24 Cell Line Differentiated by Different Microenvironments, *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 579859, 7 pages
- Chun OK, Dae-Ok Kim, Nancy Smith, David Schroeder, Jae Taek Han and Chang Yong Lee 2005. Daily Consumption of Phenolics and Total Antioxidant Capacity from Fruits and Vegetables in the American Diet. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85 (10), 1715–1724.
- Clifford M. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 362-372.
- Comhair SA, Bhatena PR, Farver C, Thunnissen FB, Erzurum SC. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB J.* 2001;15:70–78.

Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Lagana A. 2011. A. Flavonoids: Chemical Properties and Analytical Methodologies of Identification and Quantitation in Foods and Plants. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25 (5), 469–495.

Corradinia E. ; Patrizia Fogliaa ; Piero Giansantia ; Riccardo Gubbiottia ; Roberto Samperia ; Aldo Laganàa 2011. Flavonoids: Chemical Properties and Analytical Methodologies of Identification and Quantitation in Foods and Plants. *Nat.Prod. Res*, 25 (5), 469–495.

Corsini ve Maggi 1995. *Catapano, Pharmacol. Res.* 31, 9

Cota-Arriola, M. Plascencia-Jatomea, J. Lizardi-Mendoza, R. M. RoblesSánchez, J. M. Ezquerra-Brauer, J. Ruíz-García, J. R. Vega-Acosta & M. O. Cortez-Rocha 2017. Preparation of chitosan matrices with ferulic acid: physicochemical characterization and relationship on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food* 2017; 15: 65–74.

Couteau D. ve Mathaly P. 1998. Fixed-bed purification of ferulic acid from sugar-beet pulp using activated carbon: optimization studies. *Bioresource Technol* 64:17–25 (1998).

Berry CE, Hare JM., 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanism and pathophysiological implications. *J Physiol* 555.3 (2004) pp 589-606

Croteau R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 1250–1318). Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists.

- Cuyckens F. ve Claeys M. 2004 Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39 (1), 1–15.
- Czapek F. 1921. *Spezielle Biochemie, Biochemie der Pflanzen*, vol. 3, G. Fischer Jena, 1921, p. 369.
- D'Archivio M¹, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Carmela Filesi, Roberta Di Benedetto, Raffaella Gargiulo, Claudio Giovannini and Roberta Masella, Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanità* 2007 | Vol. 43, No. 4: 348-361
- Daayf ve Lattanzio 2008. Eds. *Recent Advances in Polyphenol Research*; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2008.
- Davignon J. Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins, 1999. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 543 (1999).
- DeLano 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2002. <http://www.pymol.org>
DeLano Scientific
- Dewick PM. 2009. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: *Medicinal natural products abiosynthetic approach*. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. P 187–306. (2009)
- Donaghy J¹, Kelly PF, McKay AM.. 1998. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp and *Lactobacilli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:257–260 (1998).
- Drevet JR. 2006, The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 May 16;250(1-2):70-9. Epub

- Dringen R¹, Pawlowski PG, Hirrlinger J. 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 2005; 79:157–165.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47–95.
- Duncan A. N. Edlin, Arjan Narbad, Michael J. Gasson, J. Richard Dickinson and David Lloyd. 1998. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme Microb Technol* 22:232–239 (1998).
- Duke D. Dayan, Romangi, Rimando. 2000. Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. *Weed Res.* 2000, 40, 99–111.
- Edeas M¹, Khalfoun Y, Lazizi Y, Vergnes L, Labidalle S, Postaire E, Lindenbaum A. 1995. Effect of the liposolubility of free radical scavengers on the production of antigen P24 from a HIV infected monocytic cell line. *C R Seances Soc Biol Fil* 189:367–73 (1995).
- Eisenberg DA. 1998. Cholesterol Lowering in the Management of Coronary Artery Disease: The Clinical Implications of Recent Trials, *Am J Med.* 1998 Feb 23;104(2A):2S-5S.
- Eisenreich ve Bacher 2007. Advances of High Resolution NMR Techniques in the Structural and Metabolic Analysis of Plant Biochemistry. *Phytochemistry* 2007, 68 (22–24), 2799–2815.
- Eisenreich ve Bacher 2007. Advances of High Resolution NMR Techniques in the Structural and Metabolic Analysis of Plant Biochemistry. *Phytochemistry*, 68 (22–24), 2799–2815.

- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976; 29(12):1346–1348.
- Ercal N, Güreer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1:529–539.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Ju gens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341–90.
- Eunmi P. Data on cell cycle in breast cancer cell line, MDA-MB-231 with ferulic acid treatment, *Data in Brief* 7(2016)107–110
- Faulds CB, DeVries RP, Kroon PA, Visser J, Williamson G 1997. Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 15:7239–244 (1997).
- Flohé 1988. Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci*. 1988;49:663–668.
- Fresco P¹, Borges F, Diniz C, Marques MP. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev* 26:747–66.
- Fridovich 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264:7761–76.
- Fridovich 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem*.1995; 64:97–112.

Fridovich 1997. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272:18515–18517. (McCord JM, Fridovich I, 1969; Fridovich I. 1997)

Fujisawa Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. 2002 Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177:39

Fulcher F. 1983. Fluorescence microscopy of cereals in new frontiers in food microstructure. Ottawa: American Association of cereal chemists, 1983. P.167-175.

Gary M, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999 Dec 3;286(5446):1946-9.

Ganeshpurkar A., Divya Bansal, Nazneen Dubey 2014. Biological evaluation of ferulic acid as potent immunomodulator: An in vitro study, *International Journal of Green Pharmacy* 2014

Garcia B.L. A.S Ball J Rodriguez M.I Pérez-Leblic M.E AriasJ.L Copa-Patiño 1998. Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30. *FEMS Microbiol Lett* 158:95–99 (1998).

Ghaisas M, Kshirsagar S, Sahane R: Evaluation of wound healing activity of ferulic acid in diabetic rats. *Int Wound J* 2014; 11: 523–532.

Ghyselinck ve Dufaure 1990. A mouse cDNA sequence for epididymal androgenregulated proteins related to glutathione peroxidase, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 7144.

Gill ve Tuteja 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 2010; 48:909–930.

Geller, BL. ve Wing DR. 1984. *Methods Enzymology*, 105:105.

Goleniowski M. 2013. Mercedes Bonfill, Rosa Cusido, and Javier Palazo'n, *Natural Products, Phenolic Acids*, Chapter 2, 2013

Goleniowski M. 2013 *Phenolic Acids*, Chapter 4

Góth Rass P, Páy A. 2004. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn.* 2004; 8:141–149.

Gould KS. 2010. Wheldale Onslow and the rediscovery of anthocyanin function in plants. In: Santos-Buelga C, Escribano- Bailon MT, Lattanzio V (eds) *Recent advances in polyphenol research*, vol 2. Blackwell, London, pp 206–225. (2010)

Grabber Ronald D. Hatfield, John Ralph, Jerzy Zoń 1995. Cross-linking in cell walls from maize cell suspensions. *Phytochemistry* 40:1077–1082 (1995).

Graf E.1992. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* 13:435–48.

Grazioli V. Schiavo R, Casari E, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, Gaetani P. 1998. Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* 1998; 431: 149–53.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974 Nov 25;249(22):7130-9.

Hall L. K Williams, A C Perry, J Frayne, ve J A Jury. 1998. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J* 1998; 333: 5–9.

Harborne JB. 1980. Plant phenolics, in: E.A. Bell, B.V. Charlwood (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Secondary Plant Products*, vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1980, pp. 329-402.

Harborne JB. 1993. Classes and functions of secondary products, in: N.J. Walton, D.E. Brown (Eds.), *Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products*, Imperial College Press, 1999, pp. 1-25.

Harborne ve Williams 1992. *Advances in flavonoid research since 1992*

Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?
Free Radic Biol Med 2002; 21:774-97

Hartmann T. 2007. From Waste Products to Ecochemicals: Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism. *Phytochemistry*, 68 (22-24), 2831-2846.

Haslam E. 2007. Vegetable tannins lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68:2713-2721, (2007)

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. 2005. Glutathione S-transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicology*. 2005; 45:51-88.

Hayman S, Kinoshita JH., 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. *Journal of Biological Chemistry* 1965 feb;240:877-82.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13 (10), 572-584.

- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers, FEBS J. 274 (2007) 2163–2180.
- Herrmann K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1989, 28, 315–347.
- Hers HG. 1956. The Mechanism of the Transformation of Glucose in Fructose in the Seminal Vesicles. Biochimica et biophysica acta 1956; 22(1) 202-203.
- Hille R. 2006. Structure and function of xanthine oxidoreductase. Eur J Inorg Chem 2006; 1913-24
- Hlasiwetz and Barth 1866. Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck I, Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali], Liebig's Annalen der Chem. 138 (1866) 61–76.
- Hosoda A, Ozaki Y, Kashiwada A, Mutoh M, Wakabayashi K, Mizuno K, Nomura E, Taniguchi H. 2002. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. Bioorg Med Chem 10:1189
- Huang D, Huang Boxin Ou, Ronald L. Prior 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 53:1841–56.
- Ighodaro ve Akinloy 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine (2017).
- Indap MA, Radhika S, Motiwale L. ve Rao KVK. 2006. Anticancer activity of phenolic antioxidants against breast cancer cells and a spontaneous mammary tumor. Indian J Pharm Sci 68:470–4.

- Ishimaru R, Nonaka G, Nishioka I. 1987. Tannins and related compounds. LV. Isolation and characterization of acutissimins A and B, novel tannins from *Quercus* and *Castanea* species, *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 602e610.
- Itagaki S, Kurokawa T, Nakata C, Saito Y, Oikawa S, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K. 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem* 114:466–71.
- Ivanova AV, Gerasimova EL, Brainina KZ. 2015. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects. *Crit Rev Anal Chem.* 45:311–22.
- Jakobsson PJ¹, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Common structural features of MAPEGda widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 1999;8:689–692.
- Janicke B¹, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, Oredsson SM. 2011 The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 63:611–22.
- Jankowska R¹, Passowicz-Muszyńska E, Banaś T, Marcinkowska A, Medrala W. 1994. The influence of vitamin A on production of oxygen free radicals and activity of granulocyte catalase in patients with chronic bronchitis. *Pneumonol Alergol Pol* 1994; 62: 628–33.
- Jeong C, Moon JH, Seong KY, Park KH. 2000. Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4- - hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thumb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J Food Sci Technol* 32:1403–1408 (2000).

Jimenez, J. P.; Hubert, J.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systemic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010, 92, 801–809.

Kadoma ve Fujisawa 2008. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. *Molecules* 13:2488–99.

Kampa Marilena,¹ Vassilia-Ismini Alexaki,¹ George Notas,² Artemissia-Phoebe Nifli,¹ Anastassia Nistikaki,¹ Anastassia Hatzoglou,¹ Efstathia Bakogeorgou,¹ Elena Kouimtzoglou,³ George Blekas,⁴ Dimitrios Boskou,⁴ Achille Gravanis,³ and Elias Castanas. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6:R63–74.

Kampa M¹, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiology Biochemistry Pharmacology* 159:79–113.

Kanski J¹, Aksenova M, Stoyanova A, Butterfield DA. 2002. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: Structure-activity studies. *J Nutr Biochem* 2002;13:273-81.

Karuppanapandian T., Jun-Cheol Moon, Changsoo Kim², Kumariah Manoharan³, Wook Kim⁴ * 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 2011; 5:709.

- Kaufman P, S. Warber, J. Duke, & H. Brielmann 2006. Phytochemicals. In L. Cseke, A. Kirakosyan, (Eds.), *Natural Products from Plants* (2nd ed., pp. 1–49). FL USA: Taylor & Francis group.
- Kedare S. and R. P. Singh. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48:412–22.
- Khazir J, Bilal Ahmad Mir ,Shabir Ahmad Mir &Don Cowan 2013. Natural products as lead compounds in drug discovery. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2013, 15, 764–788.
- Kiewlicz J. Henryk Szymusiak, Ryszard Zieliński 2015. Synthesis. Thermal stability and antioxidant activity of long-chain alkyl esters of ferulic acid. *Zywn Nauk Technol* 2015; 4: 188–200.
- Kikuzaki H. Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 50:2161–8.
- Kim ve Lee 2012. Ferulic acid attenuates ischemia/reperfusion-induced hepatocyte apoptosis via inhibition of JNK activation. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45: 708-715.
- Kinnula VL. 2003. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1600–1619.
- Kinnula VL. 2005. Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4:465–470.
- Kinoshita JH. 1965. Cataracts in Galactosemia. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Investigative ophthalmology* 1965; 4(5) 786-799.

- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 1999;274:13908–13914.
- Koh PO. 2012. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decreases of astrocytic phosphoprotein PEA-15 and its two phosphorylated forms. *Neurosci Lett* 2012; 511: 101-105.
- Kohen R. ve Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Society Toxicol Pathol* 2002;30: 620–50.
- Kossel A. 1891. U ber die Chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv fur Physiologie* 181–186.
- Krishnaiah D, Rosalam Sarbatly, Rajesh Nithyanandam 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process* 2011;89:217–33.
- Kroon PA, MT Garcia-Conesa, IJ Fillingham, GP Hazlewood, G Williamson 1999. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J Sci Food Agric* 79:428–434 (1999).
- Kumar N. ve Pruthi P., 2014. Potential applications of ferulic acid from natural, sources, *Biotechnology Reports* 4. 86–93
- Kunnumakara Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25:2097–116.

- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. 2000. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Med.* 6, 1004.
- Lah MH, Dixon MM, Patridge KA, Stallings WC, Fee JA, Ludwig ML. 1995. Structure-Function in *E. coli* Iron Superoxide Dismutase: Comparisons with the Manganese Enzyme from *T. thermophilus*. *Biochemistry.* 1995; 34:1646–1660.
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M. 2011 The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chem.* 2011, 125 (2), 288–306.
- Li X. 1993. Amundson, R.L. Last, *Arabidopsis* mutants are hypersensitive to UV-B radiation, *Plant Cell* 5 (1993) 171–179.
- Li X, Wu X, Huang L. 2009. Correlation between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui), *Molecules* 2009, 14, 5349–5361
- Liu Y., Qi Y¹, Chen X², He H³, Liu Z¹, Zhang Z¹, Ren Y⁴, Ren X⁵. Phenolic compounds and antioxidant activity in red- and in green-fleshed kiwifruits. *Food Research International* Volume 116 February 2019, Pages 291-301
- Lim S, Barter P. Antioxidant effects of statins in the management of cardiometabolic disorders. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(10):997-1010. Epub 2014 Aug 15.
- Lo ve Chung 1999. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamineN-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer Res* 19:133–139 (1999).

- Lodovici M., Guglielmi F, Meoni M, Dolara P.2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 1205–1210.
- Loo G. 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* 14:64–73. 2003
- Macheix, J. J. Fleuriet, A. Billot, J. 1990. *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton pp.378 pp.
- Maga JA. 1978. Simple Phenol and Phenolic compounds in Food Flavor. *Crit. ReV. Food Sci. Nutr.* 1978, 10, 323-372.
- Mansueto ve Santangelo 2014. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem Toxicol* Mar;65:185-95.
- Marklund SL. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984; 222:649–655.
- Masella R¹, Cantafora A, Modesti D, Cardilli A, Gennaro L, Bocca A, Coni E. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. *Redox Rep* 1999; 4: 113– 121.
- Masella R., Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scanzocchio B, Giovannini C.2004. C: Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione- related enzymes. *J Nutr* 2004; 134: 785–791.
- Mates M. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry*, Vol. 32, No. 8, 595–603, 1999

- Mathew S. ve Abraham TE. 2004. Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2–3):59–83 (2004)
- Maurya DK. ve Devasagayam TP. 2010. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food Chem Toxicol* 48:3369–73.
- McCord ve Fridovich 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244:6049–6055.
- Miller AF. 2012. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012 March 09; 586(5): 585–595.
- Min DB. Boff JM. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2002, 1, 58–72.
- Moldovan M¹, Lahmar A¹, Bogdan C¹, Părauan S¹, Tomuța I², Crișan M³.2017. Formulation and evaluation of a water-in-oil cream containing herbal active ingredients and ferulic acid. *Clujul Med* 2017; 90: 212–219.
- Mollica A¹, Locatelli M¹, Macedonio G¹, Carradori S¹, Sobolev AP², De Salvador RF³, Monti SM⁴, Buonanno M^{4,5}, Zengin G⁶, Angeli A⁷, Supuran CT²⁰¹⁶. Microwaveassisted extraction, HPLC analysis, and inhibitory effects on carbonic anhydrase I, II, VA, and VII isoforms of 14 blueberry Italian cultivars. *J Enz Inhib Med Chem* 2016;31:1–6.
- Molyneux 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004;26:211–19.
- Mousa ve Raizada 2013. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 65.

- Nardini M¹, Cirillo E, Natella F, Scaccini C.. 2002. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5735–5741.
- Nardini M. Natella F, Scaccini C, Ghiselli A.. 2006. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J. Nutr. Biochem.* 2006, 17, 14–22.
- Nenadis N. Zhang HY, Tsimidou MZ 2003. Structure–antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. *J Agric Food Chem* 51:1874–9.
- Nethaji 1988. Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid), *Acta Cryst. C* 44 (1988) 275–277.
- Nichenametla SN. Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolic in Cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006, 46 (2), 161–183.
- Nile SH, Ko EY, Kim DH, Keum YS: Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. *Rev Bras Farmacogn* 2016; 26: 50–55.
- Nilsson CL. 1999. Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:1061–1071 (1999).
- Nishino T. Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase: mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J* 2008; 275:3278-89

- Ochiai 1999. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflammation* 8:173–175 (1999).
- Ogiwara T, Satoh K, Kadoma Y, Murakami Y, Unten S, Atsumi T, Sakagami H, Fujisawa S.. 2002. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. *Anticancer Res* 2002;22:2711-7.
- Oliveira ve Batista 2017. Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits, Institute of Food Technologists® Vol.16, 2017, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.
- Oliveira EF¹, Santos-Martins D¹, Ribeiro AM¹, Brás NF¹, Cerqueira NS¹, Sousa SF¹, Ramos MJ¹, Fernandes PA¹. 2016. HMG-CoA Reductase inhibitors: an updated review of patents of novel compounds and formulations (2011-2015), *Journal Expert Opinion on Therapeutic Patents* Volume 26, 2016 - Issue 11
- Orlikova B, Legrand N, Panning J, Dicato M, Diederich M. 2014. Anti-inflammatory and anticancer drugs from nature. *Cancer Treat Res.* 2014;159:123-43. doi: 10.1007/978-3-642-38007-5_8.
- Ou ve Kwok 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J Sci Food Agric* 84:1261–1269 (online: 2004)
- Ovaskainen ML¹, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. 2008. Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *J. Nutr.* 2008, 138 (3), 562–566.

- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. 2006. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58:87-114
- Paiva LB, Rosana Goldbeck^I; Wanderley Dantas dos Santos^{II}; Fabio Marcio Squina^I 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 49, n. 3, jul./sep., 2013
- Panwar R, Asvane K, Sharma, Mandeep Kaloti, Dharm Dutt, Vikas Pruthi. 2015. Characterization and anticancer potential of ferulic acid-loaded chitosan nanoparticles against ME-180 human cervical cancer cell lines. *Appl Nanosci* 5:1–11.
- Parr AJ, G Paul Bolwell. 2000. Phenols in the Plant and in Man. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of the Diet by Modifying the Phenol Content or Profile. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80 (7), 985–1012.
- Payne G. V, Bringi, C, Prince, Michael L, Shuler 1991. The quest for commercial production of chemicals from plant cell culture, in: G.F. Payne, V. Bringi, C. Prince, M.L. Shuler (Eds.), *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser, 1991, pp. 1–10.
- Peng CC, Charng-Cherng Chyau, Hui-Er Wang, Chi-Huang Chang, Kuan-Chou Chen, Kuang-Yu Chou, and Robert Y. Peng 2013. Cytotoxicity of Ferulic Acid on T24 Cell Line Differentiated by Different Microenvironments, *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 579859, 7 pages
- Pezzuto JM (1998) Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen* 1:1,

- Piazzon A, Vrhovsek U, Masuero D, Mattivi F, Mandoj F, Nardini M. 2012. Antioxidant Activity of Phenolic Acids and Their Metabolites: Synthesis and Antioxidant Properties of the Sulfate Derivatives of Ferulic and Caffeic Acids and of the Acyl Glucuronide of Ferulic Acid, | *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 12312–12323
- P Yu, Maenz DD, McKinnon JJ, Racz VJ, Christensen DA. 2002. Release of ferulic acid from oat hulls by *Aspergillus ferulic acid esterase* and *Trichoderma xylanase*. *J Agric Food Chem* 50:1625–1630 (2002).
- Prabhakar MM, Vasudevan K, Karthikeyan S, Baskaran N, Silvan S, Manoharan S. 2012. Anticell proliferative efficacy of ferulic acid against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 5207-5211.
- Prates JA, Tarbouriech N, Charnock SJ, Fontes CM, Ferreira LM, Davies GJ. 2001 The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9:1183–1190 (2001).
- Quideau S. 2009. *Chemistry and Biology of Ellagitannins, an Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols*, World Scientific, London, UK.
- Quideau S. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 586 – 621
- Radi R. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem.* 1991; 266:22028–22034.
- Ramachandra ve Ravishankar 2002. G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2002, 20, 101–153.

- Ramirez DC. Sandra E. Gomez-Mejiba, Jean T. Corbett, Leesa J. Deterding, Kenneth B. Tomer, ve Ronald P. Mason 2009. Cu, Zn-superoxide dismutase-driven free radical modifications: copper- and carbonate radical anion-initiated protein radical chemistry. *Biochem. J.* 2009; 417:341–353.
- Ramana ve Srivastava 2011. Aldose Reductase: A Novel Therapeutic Target for Inflammatory Pathologies *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 January ; 42(1): 17–20.
- Raza H. 2011, Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS J.* 2011 Nov;278(22):4243-51. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x. Epub 2011 Oct 12.
- Rechner AR. Pannala AS, Rice-Evans CA. 2001. Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo, *Free Radic Res*;35(2):195-202.
- Rice-Evans 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997, 2, 152-159.
- Rice-Evans 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. and Med.* 1996, 20, 933-956.
- Rikans ve Hornbrook 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 116–27.
- Robbins RJ. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (10), 2866-2887

- Roginsky V, Lissi EA. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 92:235–54.
- Rondini, L.; Peyrat-Maillard, M.-N.; Marsset-Baglieri, A.; Berset, C. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after shortterm ingestion of free ferulic acid in rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3037–3041.
- Rosazza 1995. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product, *J. Ind. Microbiol.* 15 (1995) 457–471.
- Sanchez M. Eva Queijeiro, Gloria Revilla, Ignacio Zarra Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine Hypocotyls. Effect on peroxidase activities associated with cell walls. *Physiol. Plant.*, v.101, n.4, p.815- 820, 1996.
- Santos WD, Ferrarese ML, Nakamura CV, Mourão KS, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O. 2008. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by Ferulic Acid. The possible mode of action. *J. Chem. Ecol.*, v.34, n.9, p.1230-1241, 2008.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2005. Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45 (4), 287–306.
- Schade SZ, Sherrell L. Early, T. Reginald William, Ferenc J. Kezdys, Robert L. Heinrikson Q, Charles E. GrimshawII, and Clyde C. Doughty. 1990. Sequence Analysis of Bovine Lens Aldose Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(7) 3628-3635.
- Scharffetter-Kochanek 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 2000; 35: 307–316.

- Serafim TL, Carvalho FS, Marques MP, Calheiros R, Silva T, Garrido J, Milhazes N, Borges F, Roleira F, Silva ET, Holy J, Oliveira PJ. 2011. Lipophilic caffeic and ferulic acid derivatives presenting cytotoxicity against human breast cancer cells. *Chem Res Toxicol* 24:763–74.
- Shahidi ve Chandrasekara 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem Rev* 9:147–70.
- Shahidi ve Wanasundara Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992, 32, 67.
- Shivraj HN, Eun Young Ko, Doo Hwan Kim, Young-Soo Keum, Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 26 (2016) 50–55
- Shomali Moghaddam. 2015. The evaluation of inhibitory effects of selected plant extracts on antioxidant enzymes. by PSP Volume 24 – No 1
- Sigalov ve Stern 1998. Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I. *FEBS Lett* 1998; 433: 196–200.
- Slanina J. 2004. Bioavailability, and Metabolism of Plant Polyphenols in Humans. *Chem. Listy* 2004, 98 (5), 239–245.
- Srinivasan M, Adluri R, Sudheer, and Venugopal P, Menon 2007. Ferulic Acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr* 2007;40:92-100.
- Stahl. 1998. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett* 1998; 427: 305–8.

- Stait ve Leake 1996. The effects of ascorbate and dehydroascorbate on the oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem J* 1996; 320: 373–81.
- Stalmach A, Mullen W, Barron D, Uchida K, Yokota T, Cavin C, Steiling H, Williamson G, Crozier A. 2009. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metab. Dispos.* 2009, 37, 1749–1758.
- Strange RW, Antonyuk S, Hough MA, Doucette PA, Rodriguez JA, Hart PJ, Hayward LJ, Valentine JS, Hasnain SS. The structure of holo and metal-deficient wild-type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Mol. Biol.* 2003; 328:877–891.
- Stockert AL, Shinde SS, Anderson RF, Hille R. 2002. The reaction mechanism of xanthine oxidase: evidence for two-electron chemistry rather than sequential one-electron steps. *J Am Chem Soc* 2002; 124:14554
- Surai 2006. *Selenium in Nutrition and Health*, Nottingham University Press
- Sung JH, Kim MO, Koh PO. 2012. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression. *Neurosci Lett* 2012; 516: 146-150.
- Spycher SE, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, Palomba L, Azzi A, Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells. *FASEB J.* 1997 Feb;11(2):181-8.
- Taniguchi H, Hosoda A, Tsuno T, Maruta Y, Nomura E. 1999. Preparation of ferulic acid and its application for the synthesis of cancer chemopreventive agents. *Anticancer Res* 19:3757–3761 (1999).

- Tappel 1978. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 1978; 52: 506–13.
- Tee-ngam P, Nunant N, Rattanarat P, Siangproh W, Chailapakul O. 2013. Simple and rapid determination of ferulic acid levels in food and cosmetic samples using paper-based platforms. *Sensors* 2013; 13: 13039–13053.
- Teixeira J. Alexandra Gaspar, E. Manuela Garrido, Jorge Garrido ve Fernanda Borges. 2013 *Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview*, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 251754.
- Tobert JA. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(7):517–526. • Historical overview on the development of statins.
- Toda S, Kumura M, Ohnishi M. 1991. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med* 57:8–10.
- Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily, *Antioxid. Redox Signal.* 10 (2008) 1501–1514.
- Tsou MF¹, Hung CF, Lu HF, Wu LT, Chang SH, Chang HL, Chen GW, Chung JG. 2000. Effects of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on growth and arylamine Nacetyltransferase activity in *Shigella sonnei* (group D). *Microbios* 101:37–46 (2000).
- Uttara B. Ajay V. Singh, Paolo Zamboni, and R.T Mahajan 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009;7:65–74.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 2007;39:44–84.
- Van Beek T, Kishore K. R. Tetala, Irina I. Koleva, Airidas Dapkevicius, Vassiliki Exarchou, Suzanne M. F. Jeurissen, Frank W. Claassen, Elbert J. C. van der Klift 2009. Recent Developments in the Rapid Analysis of Plants and Tracking Their Bioactive Constituents. *Phytochem. Rev*, 8 (2), 387–399.
- Van Heyningen R. 1959. Formation of Polyols by the Lens of the Rat with ¹⁴C-Sugar/³H-Cataract. *Nature* 1959; 184(4681) 194-195.
- Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K. 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol*. 2002 Sep 13;451(2):111-8.
- Ve´ronique C. 2012. Phenolic compounds: from plants to foods, *Phytochem Rev* (2012) 11:153–177
- Villa-Caballero L, Nava-Ocampo AA, Frati-Munari AC, Ponce-Monter H. 2000. Oxidative stress. Should it be measured in the diabetic patient *Gac Med Max*, 136, pp. 249-256
- Vukics ve Guttman 2010. A. Structural Characterization of Flavonoid Glycosides by Multi-Stage Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev*. 2010, 29 (1), 1–16.
- Wallace 2011. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Adv. Nutr.* 2011, 2, 1–7.
- Wang T, Gong X, Jiang R, Li H, Du W, Kuang G. 2016. Ferulic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis via blockage of PI3K/Akt pathway in osteosarcoma cell. *Am J Transl Res* 8:968–80.

- Williams WB, M.E.Cuvelier C, Berset , 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* Volume 28, Issue 1, 1995, Pages 25-30
- Winkel-Shirley 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* 5:218–223.
- Wiseman ve Halliwell 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313:17–29.
- Wuerges J, Lee JW, Yim Y, Yim HS, Kang SO ve Carugo KD. 2004. Crystal Structure of Nickel-Containing Superoxide Dismutase Reveals Another Type of Active Site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:8569–8574.
- XN ve PY 1997. An improved technology to extract γ -oryzanol from rice bran oil. *Cereal Feed Ind* 9:36–37 (1997).
- Yang ve Awasthi 2006. Glutathione S-transferases as modulators of signal transduction. In: Taylor, Awasthi YC., editor. *Toxicology of glutathione transferases*. Francis CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 2006. p. 205-230.
- Yang GW, Jiang JS, Lu WQ. 2015. Ferulic acid exerts anti-angiogenic and anti-tumor activity by targeting fibroblast growth factor receptor 1-mediated angiogenesis. *Intl J Mol Sci* 16:24011–31.
- Yeh, C.T ve Yen, G.C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance – associated protein 3 mRNA expression. *J. Nutr.*, v.136, n.1, p.11-15, 2006.
- Yıldırım Ö., Amirzadeh-Khiabani N., Ceylan Ünlüsoy M. , Daş Evcimen N., Sarıkaya M., Ertan r. Alterations of aldose reductase and superoxide dismutase activities by some chromonyl-2, 4-thiazolidinedione derivatives. *Ankara Üniv Vet Fak*

Derg, 61, 249-254, 2014

YF ve YP 1997. Synthesis of trans-ferulic acid. Chinese J Pharm 28:188–189 (1997).

Zdunska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H. 2018. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application, Skin Pharmacol Physiol 2018;31:332–336

Zhao ve Moghadasian 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. Food Chem 109:691–702.

Zimniak P. 2006. Substrate and reaction mechanism of GSTs. In: Taylor, Awasthi YC., editor. Toxicology of glutathione transferases. Francis CRC Press; Boca Raton, Fl, USA: 2006. p. 71-102.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ezgi GÜRLER

Doğum Yeri : Amasya

Doğum Tarihi : 21.01.1993

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Amasya Lisesi (2011)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2016 – Haziran 2019)