



**LİPOKSİGENAZ ENZİMİNİN KİNOA  
(*Chenopodium Quinoa Willd.*)`DAN  
SAFLAŞTIRILMASI,YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI  
SCHİFF BAZLARININ ENZİM ÜZERİNE  
İNİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ergün EREMİNSOY**

**Danışman: Prof. Dr.Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU**

**İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR**

**Doktora Tezi**

**Kimya Ana Bilim Dalı**

**2023**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI

**LİPOKSİGENAZ ENZİMİNİN KİNOA (*Chenopodium quinoa* Willd.)`DAN  
SAFLAŞTIRILMASI, YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI SCHİFF BAZLARININ ENZİM  
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Purification of Lipoxygenase Enzym From *Quinoa*, Investigation of The Inhibition Effects of  
Some New Synthetic Schiff Bases on The Enzyme)

DOKTORA TEZİ

Ergün EREMİNSOY

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU  
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr.Yeliz DEMİR

Erzurum  
Haziran, 2023



## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Graduate School of Natural and  
Applied Sciences

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü  
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Lipoksigenaz Enziminin Kinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.)'Dan Saflaştırılması, Yeni Sentezlenmiş Bazı Schiff Bazlarının Enzim Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYİOĞLU danışmanlığında, Ergün EREMİNSOY tarafından hazırlanan bu çalışma, 23/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** / **oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

|                          |                                                                        |                       |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Jüri Başkanı:            | Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>              | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Danışman:                | Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYİOĞLU<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>        | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Jüri Üyesi:              | Prof. Dr. Veysel ÇOMAKLI<br><i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>     | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Jüri Üyesi:              | Doç. Dr. Mine AKSOY<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                     | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Jüri Üyesi:              | Doç. Dr. Pınar GÜLLER<br><i>Atatürk Üniversitesi</i>                   | Aslı Islak İmzalıdır. |
| Jüri Üyesi:              | Doç. Dr. Cüneyt TÜRKES<br><i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i> | Aslı Islak İmzalıdır. |
| İkinci Tez<br>Danışmanı: | Doç. Dr. Yeliz DEMİR<br><i>Ardahan Üniversitesi</i>                    | Aslı Islak İmzalıdır. |

Enstitü Yönetim Kurulunun  
.../.../... tarih ve ..... sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN  
Enstitü Müdürü  
Aslı Islak İmzalıdır.

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

## ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak **Prof.Dr .Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU** danışmanlığında sunulan “Lipoksigenaz enziminin Kinoa(chenopodium quinoa willd.)’dan saflaştırılması, yeni sentezlenmiş bazı schiff bazlarının enzim üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

| Tez Bölümleri              | Tezin Benzerlik Oranı (%) | Maksimum Oran (%) |
|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| Giriş                      | 8                         | 30                |
| Kuramsal Temeller          | 22                        | 30                |
| Materyal ve Yöntem         | 35                        | 35                |
| Araştırma Bulguları        | 18                        | 20                |
| Tartışma,Sonuç ve Öneriler | 17                        | 20                |
| Tezin Geneli               | 18                        | 25                |

**Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

| Tez Yazarı (Öğrenci)        | Tez Danışmanı               |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Ergün EREMİNSOY             | Prof.Dr.Ö.İrfan Küfrelioğlu |
| 7.6.2023                    | 7.6.2023                    |
| İmza: Aslı Islak İmzalıdır. | İmza: Aslı Islak İmzalıdır. |

\* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun ....../....../.... tarih ve ..... sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

## TEŞEKKÜR

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

Öncelikle çalışmalarında her türlü desteği sağlayan danışmanım, lisans eğitimimden beri öğrencisi olmaktan iftihar duyduğum, hayatımın her noktasında örnek alacağım, her alanda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı muhterem hocam Sayın Prof. Dr.Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na,

Çalışmalarımın bütün safhalarında fakültemizin bütün imkânlarını esirgemeyen Fen Fakültesi Dekanlığına, Kimya Bölümüne ve Biyokimya Anabilim Dalına,

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na,

Doktora öğrenimim boyunca her türlü yardımlarını gördüğüm minnettarlığımı tarif etmekte kelimelerin yetersiz kaldığı, Ardahan Üniversitesinde görev yapan öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e,

Çalışmalarım sırasında her türlü desteğini esirgemeyen kadim dostum Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'de görev yapan Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ'e ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'de görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Sümeysa TUNA YILDIRIM'a

Biyokimya anabilim dalı lisansüstü arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Adem ERTÜRK'e, Dr. Serpil GERNİ 'ye, Dr. Öğr. Üyesi Arzu ÖZTÜRK KESEBİR'e Yüksek Kimyager Nurgül ABUL ve tüm Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma,

Her zaman ve her koşulda yanımda olan başta eşime ve çocuklarıma teşekkür ediyorum.

Ergün EREMİNSOY

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### LOX ENZİMİNİN KİNOA (*Chenopodium quinoa* Willd.)’DAN SAFLAŞTIRILMASI, YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI SCHIFF BAZLARININ ENZİM ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ergün EREMİNSOY

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR

**Amaç:** Bu doktora tez çalışmasında Kinoa'dan (*Chenopodium quinoa* Willd.) lipoksigenaz (LOX) enzimi saflaştırılarak, yeni sentezlenen (E)-4-(((2-hidroksifenil)imino)metil)benzen-1-3-diol ligandı Cd(II) , Ni(II) kompleksleri ve (E)-2-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-4-nitrophenol ligand Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), UO<sub>2</sub> komplekslerinin *in vitro* inhibisyon etkilerinin araştırılması hedeflenildi.

**Yöntem:** Bu çalışmada LOX enzimi Kinoa'dan (*Chenopodium quinoa* Willd.) homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi (%20-40) ve Q-sepharoz iyon değişim kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan LOX enzimi üzerine yeni sentezlenen Schiff bazlarının inhibisyon etkileri incelendi.

**Bulgular:** Yapılan bu çalışmada LOX enzimi, 1,48 EU/mg proteine özgül aktivite ile %7,24 verimle 77,89 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığının ölçüsü olarak SDS-PAGE sonucunda tek bant elde edildi ve enziminin moleküler kütlesi yaklaşık olarak 97 kDa olarak belirlendi. Sentezlenen (E)-4-(((2-hidroksifenil)imino)metil)benzen-1-3-diol ligandı ve bu ligandın kompleksleri ile (E)-2-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-4-nitrophenol ligandı ve bazı metal komplekslerinin LOX aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelendi. IC<sub>50</sub> değerleri 0,032-0,930 µM K<sub>i</sub> değerleri ise 0,014 ± 0,002-0,858 ± 0,194 µM aralığında bulundu. Bu tez kapsamında çalışılan bütün bileşikler LOX enzimine karşı yarışmalı inhibisyon sergiledi. Bu komplekslerin LOX enzimine karşı inhibisyon profillerini değerlendirmek için moleküler kenetleme analizleri yapıldı ve veriler *in vitro* profilleri destekledi.

**Sonuç:** Sonuçlara bakıldığında LOX enzimi üzerine en iyi inhibitör olma özelliğini NiL<sup>2+</sup> bileşiği göstermiştir. Detaylı mekanizma çalışmaları, ilaç keşfi için yeni farmasötik ürünlerin keşfini sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Kinoa, Saflaştırma, Lipoksigenaz, Schiff bazı, İnhibisyon

**Haziran 2023, 76 sayfa**

## ABSTRACT

### DOCTORAL DISSERTATION

#### PURIFICATION OF LIPOXYGENASE ENZYME FROM QUİNOA (*Chenopodium quinoa* Willd.), INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECTS OF SOME NEW SYNTHETIC SCHIFF BASES ON THE ENZYME

Ergün EREMİNSOY

Supervisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFEVİOĞLU

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yeliz DEMİR

**Purpose:** In this doctoral thesis study, the LOX enzyme from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) was purified and the newly synthesized(E)-4-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)benzene-1-3-diolligandCd(II),Ni(II)complexes and (E)-2-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-4-nitrophenol ligand Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), and UO<sub>2</sub> In this study, it was aimed to investigate the in vitro inhibition effects of the complexes.

**Method:** In this study, LOX enzyme was purified from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) by using homogenate preparation, ammonium sulfate precipitation (20-40%) and Q-sepharose ion exchange column chromatography. The inhibition effects of newly synthesized Schiff bases on the purified LOX enzyme were investigated.

**Findings:** In this study, the LOX enzyme was purified 77.89 times with a yield of 7.24% with a protein specific activity of 1.48 EU/mg. As a measure of the purity of the enzyme, a single band was obtained as a result of SDS-PAGE and the molecular mass of the enzyme was determined as approx. 97 kDa. Synthesized (E)-4-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)benzene-1-3-diol ligand and its complexes with (E)-2-(((2-hydroxyphenyl)imino)methyl)-4 In vitro effects of -nitrophenol ligand and some metal complexes on LOX activity were determined. IC<sub>50</sub> values were found in the range of 0.032-0.930  $\mu$ M and K<sub>i</sub> values in the range of 0.014  $\pm$  0.002-0.858  $\pm$  0.194  $\mu$ M. All compounds studied within the scope of this thesis showed competitive inhibition against LOX enzyme. Molecular docking assays were performed to evaluate the inhibition profiles of these complexes against LOX enzyme and the data supported the *in vitro* profiles.

**Results:** The results showed that NiL<sub>2</sub> compound was the best inhibitor of LOX enzyme. Detailed mechanism studies will enable the discovery of new pharmaceutical products for drug discovery.

**Keywords:** Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), Purification, Lipoxygenase, Schiff base, Inhibition

June 2023, 76 pages

## İÇİNDEKİLER

|                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....                                      | i    |
| ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....                       | ii   |
| TEŞEKKÜR .....                                                   | iii  |
| ÖZET .....                                                       | iv   |
| ABSTRACT .....                                                   | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                 | vi   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                             | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                            | ix   |
| KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ .....                             | xii  |
| GİRİŞ.....                                                       | 1    |
| Enzimler .....                                                   | 1    |
| Lipoksigenaz (LOX) enzimi .....                                  | 2    |
| LOX Fonksiyonları .....                                          | 5    |
| Biyolojik mediyatörlerin oluşumu /sinyal molekülleri .....       | 5    |
| Peroksidasyon reaksiyonlar (membran yapı modifikasyonu) .....    | 5    |
| Metabolizma için lipidlerin mobilizasyonu .....                  | 5    |
| LOX'un Kullanıldığı Yerler.....                                  | 7    |
| Kinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) .....                  | 8    |
| Enzim inhibisyonu .....                                          | 9    |
| Yarışmalı inhibisyon .....                                       | 9    |
| Yarışmasız inhibisyon.....                                       | 10   |
| Yarı yarışmalı inhibisyon.....                                   | 11   |
| Schiff bazı .....                                                | 12   |
| Araştırmanın Amacı ve Önemi .....                                | 12   |
| KURAMSAL TEMELLER.....                                           | 15   |
| MATERYAL VE METOD .....                                          | 20   |
| Materyal .....                                                   | 20   |
| Kullanılan alet ve cihazlar.....                                 | 20   |
| Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....                       | 21   |
| Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan çözelti ..... | 21   |
| Elektroforezde kullanılan çözeltiler .....                       | 22   |

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çalışmada Kullanılan Schiff Bazlarının Temini .....                                                     | 23 |
| L <sup>1</sup> H Ligandının Sentezi.....                                                                | 23 |
| L <sup>1</sup> H ligandının komplekslerinin sentezi.....                                                | 23 |
| L <sup>2</sup> H Ligandının Sentezi.....                                                                | 24 |
| L <sup>2</sup> H Ligandının komplekslerinin sentezi .....                                               | 24 |
| Çalışmada Kullanılan Schiff bazları .....                                                               | 26 |
| Kinoa bitkisinin homojenizasyonu.....                                                                   | 27 |
| LOX Enzim aktivitesinin ölçülmesi.....                                                                  | 27 |
| Amonyum sülfat çöktürmesi katı amonyum sülfat .....                                                     | 28 |
| Q-Sepharoz anyon değişim kromatografisi.....                                                            | 28 |
| Protein tayini .....                                                                                    | 29 |
| Enzim Saflığının Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Belirlenmesi ..... | 29 |
| Optimum pH'nın belirlenmesi .....                                                                       | 29 |
| Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi.....                                                               | 30 |
| Moleküler Kenetlenme Çalışmaları .....                                                                  | 30 |
| ARAŞTIRMA BULGULAR.....                                                                                 | 32 |
| Kinoadan saflaştırılan LOX enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....                                  | 34 |
| Optimum pH çalışmasının sonuçları.....                                                                  | 35 |
| Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları .....                                      | 36 |
| Moleküler kenetleme sonuçları .....                                                                     | 45 |
| TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                                                                  | 47 |
| Öneriler .....                                                                                          | 54 |
| KAYNAKÇA .....                                                                                          | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                           | 63 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....                                                                                                            | 22 |
| <b>Tablo 2.</b> L <sup>1</sup> H Ligandı ve Komplekslerinin Analitik ve Fiziksel Verileri .....                                                                      | 24 |
| <b>Tablo 4.</b> Kinoa dan LOX enziminin saflaştırılma basamakları .....                                                                                              | 34 |
| <b>Tablo 5.</b> Fosfat Tamponu İçin Farklı pH 'larda Aktivite Değerleri .....                                                                                        | 35 |
| <b>Tablo 6.</b> Tris-HCl Tamponu İçin Farklı pH'larda Aktivite Değerleri .....                                                                                       | 36 |
| <b>Tablo 7.</b> Glisin Tamponu İçin Farklı pH larda Aktivite Değerleri .....                                                                                         | 36 |
| <b>Tablo 8.</b> Kinoa Tohumlarından Elde Edilen Homojenatta LOX Enzimi İçin En Uygun İyonik<br>Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Konsantrasyon-Aktivite Değerleri..... | 37 |
| <b>Tablo 9.</b> LOX Enzimi Aktivitesine karşı Etki Eden Yeni Sentezlenen Schiff Bazı<br>Türevlerinin IC <sub>50</sub> Değerleri ve K <sub>i</sub> Sabitleri .....    | 44 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. LOX enziminin üç boyutlu yapısı (Anonymous 2023).....                                                                                                                     | 3  |
| Şekil 2. Araşidonik asitin hücrelerdeki LOX ve COX etkili metabolizması .....                                                                                                      | 4  |
| Şekil 3. Lipoksijenaz fonksiyonları (Brash, 1986).....                                                                                                                             | 6  |
| Şekil 4. LOX'un, bitki yaşamı boyunca aktif rolleri (Porta, 2002) .....                                                                                                            | 7  |
| Şekil 5. Kinoa tohumları (Dağ <i>et al.</i> 2019). .....                                                                                                                           | 8  |
| Şekil 6. Yarışmalı inhibisyon reaksiyonu ve denge sabiti .....                                                                                                                     | 9  |
| Şekil 7. Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon.....                                                                                                                                    | 10 |
| Şekil 8. Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon .....                                                                                                                               | 11 |
| Şekil 9. Yarı Yarışmalı İnhibisyon.....                                                                                                                                            | 12 |
| Şekil 10. $L_2^1H$ ligandı Kullanılarak oluşturulan schiff bazlarının açık yapıları.....                                                                                           | 26 |
| Şekil 11. $L_2^2H$ ligandı Kullanılarak oluşturulan Schiff bazlarının açık yapıları .....                                                                                          | 27 |
| Şekil 12. Kinoa LOX enziminin Amonyum sülfat çöktürme aralığı .....                                                                                                                | 32 |
| Şekil 13. Protein standart eğrisi.....                                                                                                                                             | 33 |
| Şekil 14. Q-Sepharoz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....                                                                                         | 33 |
| Şekil 15. Coomassie blue boyama yöntemiyle elde edilen SDS-PAGE görüntüsü .....                                                                                                    | 34 |
| Şekil 16. Gümüş boyama yöntemiyle elde edilen SDS-PAGE görüntüsü .....                                                                                                             | 35 |
| Şekil 17. Kullanılan farklı pH tamponları için elde edilen Kinoa LOX aktivite değerleri .....                                                                                      | 36 |
| Şekil 18. Kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için en uygun iyonik<br>şiddetin belirlenmesi .....                                                               | 37 |
| Şekil 19. LOX enzimi aktivitesine karşı HL bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değeri tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği .....         | 38 |
| Şekil 20. LOX enzimi aktivitesine karşı $CdL_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği ..... | 38 |
| Şekil 21. LOX enzimi aktivitesine karşı $NiL_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği ..... | 38 |
| Şekil 22. LOX enzimi aktivitesine karşı $HL_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği .....  | 39 |
| Şekil 23. LOX enzimi aktivitesine karşı $CoL_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği ..... | 39 |
| Şekil 24. LOX enzimi aktivitesine karşı $NiL_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $IC_{50}$<br>değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği ..... | 39 |

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 25.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CuL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $\text{IC}_{50}$ değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği .....                                   | 40 |
| <b>Şekil 26.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{UOL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $\text{IC}_{50}$ değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği .....                                   | 40 |
| <b>Şekil 27.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CdL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $\text{IC}_{50}$ değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği .....                                   | 40 |
| <b>Şekil 28.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{ZnL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $\text{IC}_{50}$ değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği .....                                   | 41 |
| <b>Şekil 29.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı HL bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                         | 41 |
| <b>Şekil 30.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{NiL}_2$ bileşiğinin etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                | 41 |
| <b>Şekil 31.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CdL}_2$ bileşiğinin etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                                | 42 |
| <b>Şekil 32.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{HL}^2_2$ bileşiğinin etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                               | 42 |
| <b>Şekil 33.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{NiL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                           | 42 |
| <b>Şekil 34.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CoL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                           | 43 |
| <b>Şekil 35.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CdL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                           | 43 |
| <b>Şekil 36.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{UO}_2\text{L}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                  | 43 |
| <b>Şekil 37.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{ZnL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                           | 44 |
| <b>Şekil 38.</b> LOX enzimi aktivitesine karşı $\text{CuL}^2_2$ bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve $K_i$ sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği .....                                                           | 44 |
| <b>Şekil 39.</b> Kristal (PDB ID: 1N8Q) içindeki doğal ligand Protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'in ilk konformasyonu (yeşil) ile kenetlenme sonrası konformasyonunun (kırmızı) üst üste çakıştırılması (RMSD: 0,18 Å)..... | 45 |
| <b>Şekil 40.</b> Moleküler kenetlenme sonucunda $\text{NiL}^1_2$ - LOX (PDB ID: 1N8Q) etkileşim diyagramı (Hidrojen bağı sarı renkli ve $\pi$ -katyon etkileşimi yeşil renkli kesik çizgilerle gösterilmiştir). .....                    | 46 |

**Şekil 41.** Moleküler kenetlenme sonucunda elde edilen  $\text{NiL}_2$  - LOX (PDB ID: 1N8Q) etkileşim diyagramı (Hidrojen bağı sarı renkli ve  $\pi$ -katyon etkileşimi yeşil renkli kesik çizgilerle gösterilmiştir).....46



## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

|                 |                                                       |
|-----------------|-------------------------------------------------------|
| <b>µL</b>       | Mikrolitre                                            |
| <b>DCM</b>      | Diklorometan                                          |
| <b>ES</b>       | Enzim-subsrat kompleksi                               |
| <b>EtOAc</b>    | Etil asetat                                           |
| <b>ETYA</b>     | Eikosatetraenoik asit                                 |
| <b>HETE</b>     | Hidroksieikozatetraenoik asit                         |
| <b>L</b>        | Litre                                                 |
| <b>LDL</b>      | Düşük dansiteli lipoprotein                           |
| <b>LOX</b>      | Lipooksigenaz enzimi                                  |
| <b>mL</b>       | Mililitre                                             |
| <b>MtMBZIM</b>  | 5-metoksi-2-merkaptobenzimidazol                      |
| <b>NDGA</b>     | Nordihidroguaiaretik asit                             |
| <b>PAGE</b>     | Poliakrilamid jel elektroforezi                       |
| <b>PEG</b>      | Polietilenglikol                                      |
| <b>PER</b>      | Amonyum persülfat                                     |
| <b>PUFA</b>     | Çoklu doymamış yağ asitleri                           |
| <b>SDS-PAGE</b> | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| <b>TEMED</b>    | N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin                     |
| <b>Tris</b>     | Trihidroksimetil aminometan                           |

# GİRİŞ

## Enzimler

Organizmada yan ürün oluşturmada reaksiyon hızını artıran, RNA moleküllerinin küçük bölümü hariç, protein yapısındaki moleküller enzim olarak adlandırılmaktadır. Hücredeki kimyasal olayların tamamı enzimlerin aracılığıyla gerçekleşir. Enzimler, DNA'dan bilgilerin aktarılmasıyla bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine aracılık eden önemli moleküllerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2022).

Yeterli koşullar oluşturulursa, doğal ortamları dışında da etkilerini gösterebilirler. Dolayısıyla pekçok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Enzimlerin; bulundukları doku ya da hücrelerde tespit edilmesi, biyokimya reaksiyonlarına etkilerinin belirlenmesi, etki mekanizmaları ve kinetik özelliklerinin araştırılması; enzimlerin saflaştırılması açısından çok önemlidir (Demir and Beydemir, 2015). Her enzimin substratının bağlanacağı spesifik bir aktif bölgesi vardır. Aktif bölgede substratı bağlayan, üç boyutlu yapıda, aminoasit yan zincirleri mevcuttur. Enzim substrat kompleksini (ES), substratı bağlanarak meydana gelir. ES; parçalanarak enzim ve ürüne dönüşür (Vural 2007).

Enzimler, katalitik etkinlik olarak, kimyasal katalizörlerden  $10^6$  -  $10^{16}$  kat daha fazla etkinlik göstermektedirler. Sadece aynı fonksiyonlu bir substrata spesifik etki etmektedirler. Öyle spesifik enzimler de vardır ki; aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verir. En basit hücrede bile, bu yüksek seçicilik sayesinde çok sayıda biyokimyasal reaksiyon eş zamanlı olarak meydana gelir. Hücredeki reaksiyonlarda yan ürün oluşmaz, %100 verim elde edilir. Canlı vücut sıcaklığında, fizyolojik pH'da gerçekleşir. Laboratuvarında, yüksek sıcaklık ve fazla enerji gerektiren çoğu tepkime, enzimlerle düşük sıcaklık ve enerjide gerçekleştirilebilmektedir (Demir and Beydemir, 2015).

Reaksiyonlar katalize etme ve mekanizma çeşidine göre enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadır;

**1.Oksidoredüktazlar:** Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur. Redüktazlar, oksidazlar, dehidrojenazlar, monooksijenazlar ve peroksidazlar oksidoredüktazlar sınıfında enzimlerdir.

**2.Transferazlar:** Hidrojen dışındaki karbon, azot ve fosfor gruplarının transferini iki substrat arasında gerçekleştirirler. Transketolazlar, transaldolazlar, hekzokinaz, alanin transferazlar ve glukokinaz bu grupta bulunan enzimlerdir.

**3.Hidrolazlar:** Hidroliz reaksiyonlarını katalize ederler. Bağlara su katarlar. Lipazlar, esterazlar, fosfatazlar, nükleazlar, proteolitik enzimlerin tümü hidrolaz sınıfı enzimlerdendir.

**4.Liyazlar:** Karbonun, karbon, oksijen ve azot arasında çift bağ oluşumunu sağlayıp ATP kullanmayan enzimlerdir. Bu gruptaki enzimler hidrasyon ve dehidrasyon yoluyla katalizleme yaparlar.

**5.İzomerazlar:** Moleküllerin içinde geometrik, optik ve yapı izomerizasyonu yaparak katalizleme yapan enzimlerdir. Mutazlar, rasemazlar, epimerazlar bu sınıfta yer almaktadır.

**6.Ligazlar:** İki molekülün bağlanmasını yüksek enerjili ATP ve GTP gibi bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla sağlayan reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Karboksilazlar, sentetazlar bu grupta yer alan enzimlerdir.

Enzimler, spesifiklikleri ve reaksiyonları düşük konsantrasyonda gerçekleştirebilmelerinden (katalizleme) dolayı sanayi, gıda, kimya endüstrisi, tıp (teşhis ve tedavi), eczacılık, ziraat ve biyolojik savaş gibi alanlarda kullanılmaktadır (Yıldız 2010). Enzim teknolojisinin gelişmesi, ürünlerin kullanıldığı alan zenginliği, ekonomik değer yüksekliği, biyoteknolojik endüstriyel enzimlerle olan alanlarda çeşitli araştırmaların önemi artmıştır. Son yıllarda enzim üretimine endüstriyel ölçekte başlanmıştır. Bu bağlamda büyük ölçekli enzim üretim tesislerinin kurulması ve en uygun hale getirme çalışmaları gündemdedir. Ülkemizde biyoteknolojik yöntemlerle üretilen ürünler önemli pazar alanlarından birisidir. Enzimler, milyar dolarlar seviyesinde işlem hacmine sahip olarak bu pay içerisinde yer almaktadır. Endüstriyel enzim pazarında yaklaşık 2/3'lük yer ile deterjan katkısı olan enzimler, yaklaşık 980 milyon dolarlık payı vardır (Altaş 2013). Enzim miktarı doku ve hücrelerde az olduğundan tayini oldukça zordur. Enzim miktarı, ürün miktarı ile doğru orantılı olduğundan, ürün miktarının hesaplanması, dolaylı yoldan enzimin katalitik aktivitesine karşılık gelir. Enzim aktivitesinin birimi "enzim ünitesi" şeklinde ifade edilmektedir. Söz konusu enzim için en uygun şartlarda 1µmol substratı 1dakikada ürüne çeviren enzim miktarı enzim ünitesi diye tarif edilmektedir.

### **Lipoksigenaz (LOX) enzimi**

LOX (LOX, linoleat: oksijen oksidoredüktaz, EC: 1.13.12.11) doymamış iki ya da fazla bağı bulunan yağ asidine, oksijen eklenmesi suretiyle hidroperoksitler oluşturan, hem

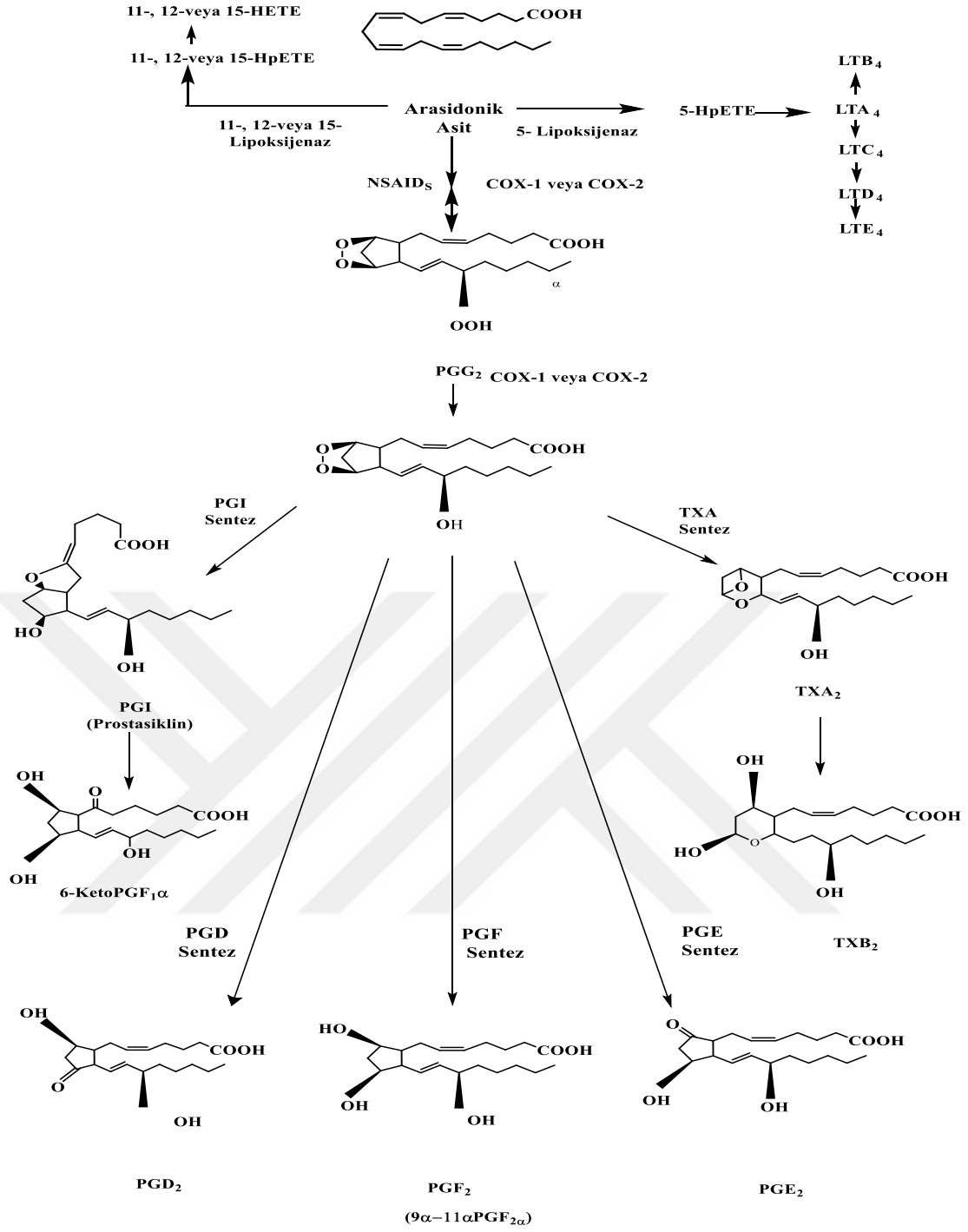
olmayan demir içeren dioksigenazlardır (Şekil 1). Yağ asitlerini doymamış bağların konumuna göre spesifik katalizler. Katalizlediği genel reaksiyon moleküler oksijeni eklemektir. Yağ asitleri cis,cis- 1,4-pentadien sistemine sahip doymamıştır.



**Şekil 1.** LOX enziminin üç boyutlu yapısı (Anonymous 2023)

LOX enziminin birincil ürünleri hidroperoksitler olarak adlandırılmaktadır. Bitkilerde büyüme, gelişme, savunma, konakçı patojen etkileşimine yardımcı olmakla birlikte yaşlanma gibi olaylara dâhil olmaktadır.

LOX enziminin bezelye, fasulye, yer fıstığı, turp, patates gibi birçok bitkilerde var olduğu bilinmektedir (Viswanath *et al.* 2020). LOX için bitkilerde en iyi substratlar linoleik ve linolenik asitlerdir. 18 karbonlu doymamış iki çift bağı olan linoleik asit, doymamış üç çift bağı olan linolenik asitdir. Linoleik asitin dioksijenasyon pozisyon spesifikliğine göre bitki LOX'ları 13 LOX ve 9 LOX olarak sınıflandırılır (Feussner 2001). 13 LOX 'da çoklu doymamış yağ asidinin 13 nolu karbon atomuna, 9 LOX'da 9 nolu karbon atomuna oksijen eklenir. 9 ve 13 hidroperoksi karşılıklı olarak daha fazla metabolize olarak diğer enzimlerle farklı yollarla antifungal, antimikrobiyal fonksiyonlu sinyal molekülüne dönüşürler. LOX enzimleri, oksijenaz enzim ailesinin bir üyesidir. Araşidonik asitin yapısına O<sub>2</sub> molekülünün bağlanmasını ve parçalanmasını da katalizler (Şekil 2).



**Şekil 2.** Araşidonik asitin hücrelerdeki LOX ve COX etkili metabolizması

LOX yolunun son ürünleri biyotik ve abiyotik baskılara karşı bitkinin büyümesi, gelişmesi, savunmasında bitkilerde önemli bir role sahiptir. LOX'lar birincil yapısı ve artan zincir benzerliğine bağlı olarak iki alt gen ailesine ayrılmaktadır. Tip-1 LOX'lar 9 ve 13 LOX içeriği (>%75) büyük benzer zincirleri paylaşan plastidik peptid olmayanlardır. Tip-2 LOX'lar bitki türleri arasında daha (>%35) düşük benzer zincirleri paylaşan plastidik peptid olanlardır.

LOX'ların hücre içi lokasyonu sitozolik veya organellerle birleşiktir (Holková *et al.* 2016). LOX'lar bitki, hayvan ve mantarlarda yaygın olarak bulunur. En uygun substratı insanlarda esansiyel doymamış yağ asitleridir. Çoğu bakterilerde mevcut değildir.

## **LOX Fonksiyonları**

### **Biyolojik mediyatörlerin oluşumu /sinyal molekülleri**

Serbest yağ asitlerinden tek spesifik hidroperoksit sentezi ile karakterizedir. Metabolik yolakda LOX enzimi hem ara ürün hemde son ürün olarak iki alt kategori ile tanınır.

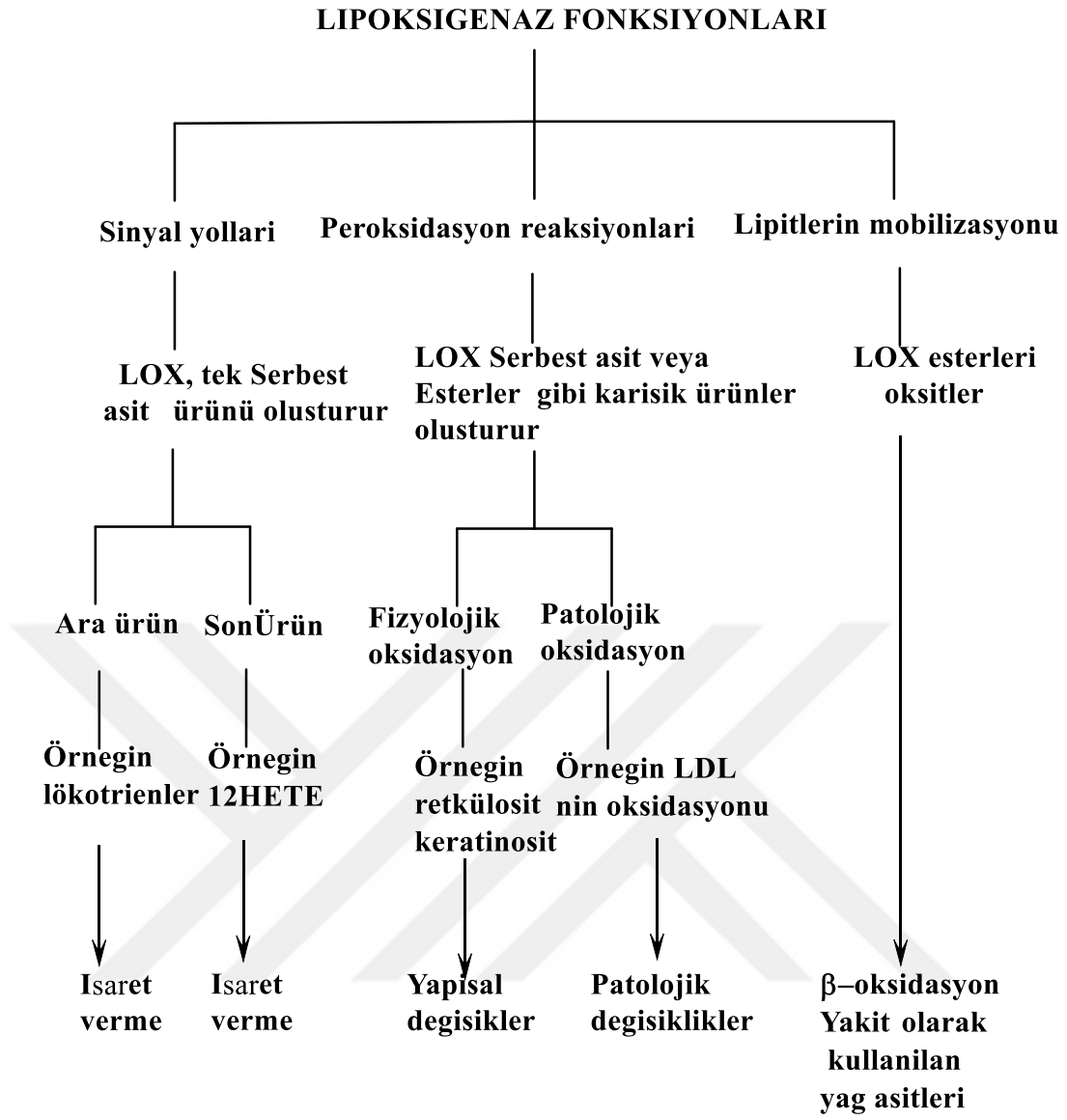
- a-) Ara ürüne örnek olarak bitki sinyalinde jasmonik asit ve aldehit biyosentezidir. Omurgalı hayvanlarda ise lipoksin ve lökotrien sentezidir. Lökositin 5-LOX aktivasyonu ile oluşan lökotrienler ve dihidroeikanosoidler bronkokonstriksiyon ve astımı provoke ederler.
- b-) Son ürün olarak, 12-LOX'un plateletlerde aktivasyonu ile oluşan hidroksiieikozatetraenoik asit (12-HETE) örnektir. 12-HETE; prostat kanserindeki metastaza bağlı aktivitede, hücre adesyonunda, hücre yüzey sinyalinde ve protein kinaz aktivasyonunda önemli etkileri vardır (Şekil 3, Brash, 1986).

### **Peroksidasyon reaksiyonlar (membran yapı modifikasyonu)**

- a-) Tipik olarak substrat esterlerinin metabolizmasıyla ilişkilidir. Sıklıkla ürünler hidroperoksit karışımlarıdır. Membran lipidlerinin LOX katalizli peroksidasyonu yapısal değişiklikleri indükler. 15-LOX'la keratinosit ve retikülosit yapısal değişikliği örnektir.
- b-) 15-LOX düşük dansiteli proteinlerin oksidasyonuna katılmaktadır. Aterosklerozis başlangıcında anahtar bir rol oynamaktadır (Kuhn *et al.* 2015).

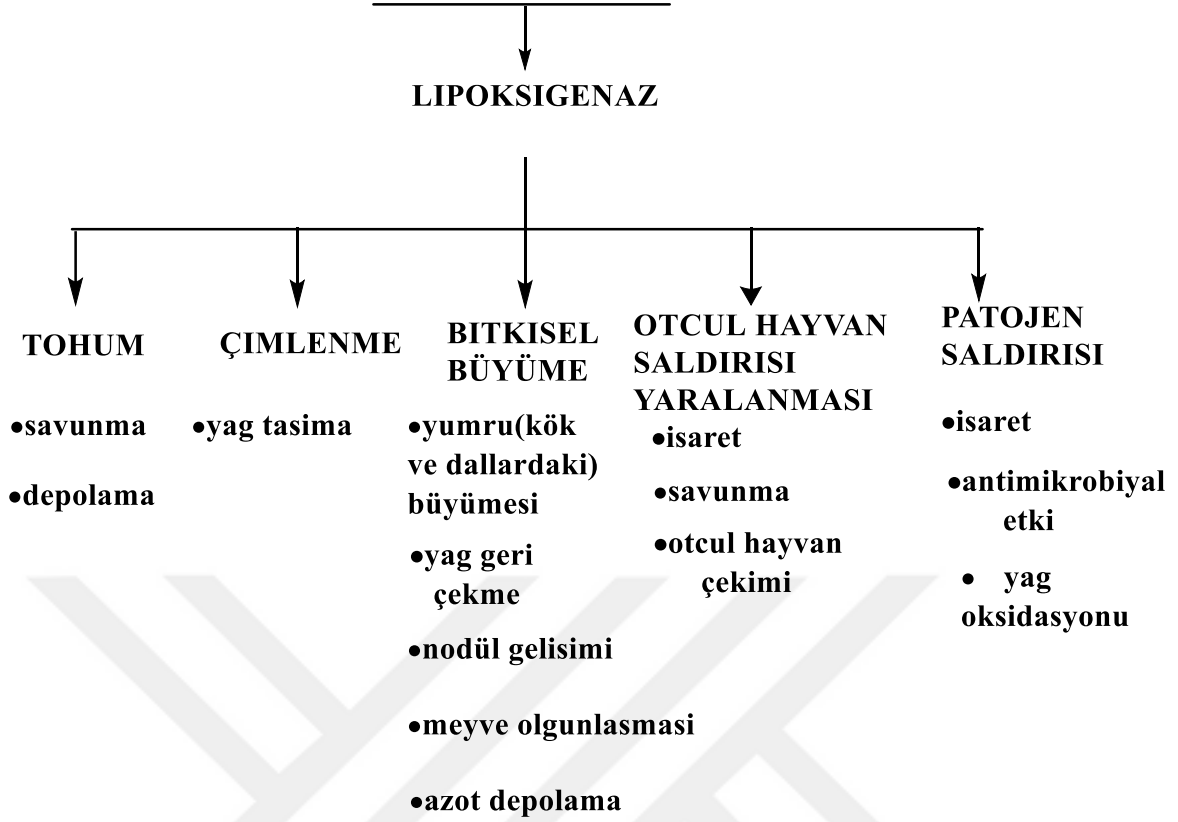
### **Metabolizma için lipidlerin mobilizasyonu**

LOX enzimi, yağlı tohum bitkilerde çimlenmede, gelişen embriyoda (beta oksidasyonla yakıt kaynağı olarak) kullanılmaktadır (Şekil 4; Porta, 2002)



**Şekil 3.** Lipoksijenaz fonksiyonları (Brash, 1986)

## ÇOKLU DOYMAMIS YAG ASITLERI



Şekil 4. LOX'un, bitki yaşamı boyunca aktif rolleri (Porta, 2002)

### LOX'un Kullanıldığı Yerler

5-LOX' la araşidonik asit lökotrienlere dönüştürülebilir. Dolayısıyla COX-2/ 5-LOX inhibe edebilen ikili inhibitörlerin geliştirilmesi ve degranülasyon (IgE molekülü antijen molekülü köprü yapmasıyla olur) reaksiyonları; bunların nonsteroit antiinflamatuvarlar ile oluşan yan etki ve tekil inflamatuvar etkilerinin azaltılmasına olanak sağlayabilmektedir. (Evans *et al.* 2008).

LOX'un yaygın kullanım alanlarından biri gıda sektöründe ekmek yapımıdır. LOX karotinoitleri oksitleyip ekmek içinin beyazlığını artırıp, tercih edilen bir beyazlatıcıdır. Ayrıca hamurun yoğrulma toleransını artırarak, hamuru iyileştirici yönde etki eder (Zhang *et al.* 2013).

Soya fasulyesinden LOX enzimi doğal olarak elde edilerek bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitlerine oksijen ekleyerek risinoleik asite dönüştürülebilmektedir. Risinoleik asit ve onun türevleri sabun, boya, vernik, reçine, plastik ve bağlayıcı maddelerin asıl bileşeni olarak endüstride farklı kullanım alanlarıyla dikkatimizi çekmektedir (Omar *et al.* 2003).

Ayrıca LOX; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamında ksenobiotiklerin oksidasyonu, epoksidasyon, desülfürasyon, N-demetilasyon ve sülfoksidasyon reaksiyonlarını Fenton reaksiyonu ile

yapmaktadır. Guaiakolün  $H_2O_2$  ile soya fasulyesi LOX ile tetraguaiakole dönüştürülmesi, aldrinin epoksidasyonu, parathionun desülfürasyonu, aminopirinin N-demetilasyonu ve tiyobenzamidin sülfoksidasyonu, LOX enziminin katalizlediği reaksiyonlara örnek olarak verilebilir (Viswanath *et al.* 2020).

### **Kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)**

Kinoa taneleri, geleneksel tahıllardan daha yüksek besleyici değere sahiptir. İnsan tüketimi ve beslenmesi için dünya çapında umut verici bir çeşittir (Şekil 5). Kinoa; botanik nedenlerle olduğu kadar, sıra dışı bileşimi, yağ, protein ve katı yağ arasındaki istisnai denge nedeniyle de sözde tahıl olarak adlandırılmıştır. Kinoa, çeşitli hastalık riskini azaltmayı amaçlayan mükemmel bir 'fonksiyonel gıda' örneğidir. Ayrıca insan beslenmesine güçlü katkı sağlayabilen mineraller, vitaminler, yağ asitleri ve antioksidanlar, özellikle hücre zarlarını korumak, beyin nöronal fonksiyonlarında kanıtlanmış iyi sonuçlarla fonksiyonel özelliklidir. Mineralleri, antioksidan enzimlerde kofaktör olarak çalışarak, zengin proteinlerine daha yüksek değer katar. Kinoa ayrıca insan beslenmesi için diğer bitkisel gıdalara göre avantaj sağlayan fitohormonlar içerir (Vega *et al.* 2010).



**Şekil 5.** Kinoa tohumları (Dağ *et al.* 2019).

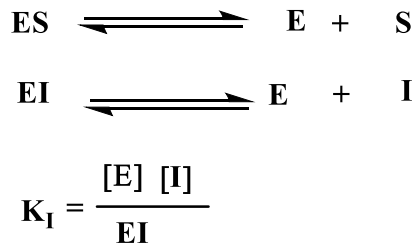
## Enzim inhibisyonu

Bazı bileşiklerin, enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerini azaltması veya yok etmesi olayı inhibisyon olarak adlandırılmaktadır. Enzim aktivitesine bu şekilde etki eden bileşiklere inhibitör denilmektedir. Genellikle inhibitörler düşük molekül ağırlıklı iyon ve bileşiklerdir. Biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması olan enzim inhibisyonu oldukça önem arz etmektedir. Tersinir (geri dönüşümlü) ve tersinmez (geri dönüşümsüz) iki tür inhibisyon vardır. Dönüşümsüz inhibisyon'da, İnhibitörün aktif merkeze kovalent olarak bağlandığı dönüşümsüz inhibisyonudur. Serinin aktif merkezde bulunduğu enzimlerin diizopropilflorofosfat tarafından inaktivasyonları dönüşümsüz inhibisyonlara örnektir. İnhibitörün enzimle ya da enzim substrat kompleksi ile kovalent olmayan şekilde bağlanması geri dönüşümlü inhibisyonda olmaktadır (Keha ve Küfrelioğlu 2022). Üç çeşit tersinir inhibisyon vardır. Bunlar;

- 1- Kompetitif inhibisyon (Yarışmalı)
- 2- Nonkompetitif inhibisyon (Yarışmasız)
- 3- Unkompetitif inhibisyon (Yarı yarışmalı)

### Yarışmalı inhibisyon

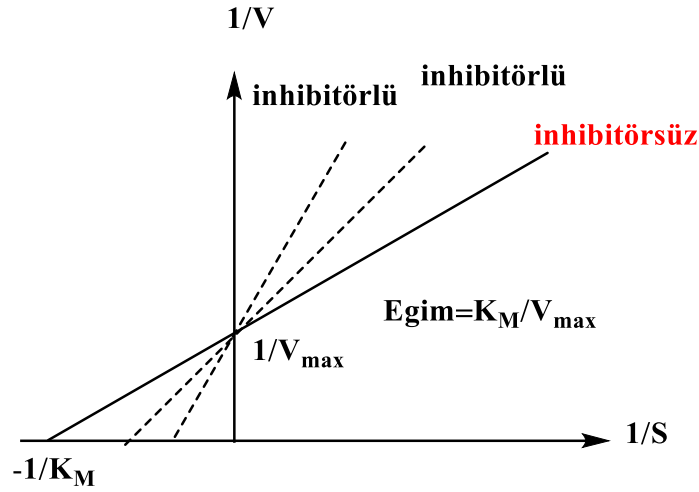
Yapı olarak substrata benzeyen yarışmalı inhibitörün enzimin aktif merkezine bağlanarak oluşturduğu inhibisyon yarışmalı inhibisyonudur. Enzimin substrat ve inhibitörle ayrışmaları denge reaksiyonudur. Bundan dolayı substrat konsantrasyonu artırılarak ES kompleksi lehine bir denge kayması oluşturur (Şekil 6). Fakat inhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttırılarak ortadan kaldırılabilir. Yarışmalı inhibisyonda  $V_{max}$  değeri değişmez,  $K_m$  değeri artar (Şekil 7).



**Şekil 6.** Yarışmalı inhibisyon reaksiyonu ve denge sabiti

Yarışmalı inhibisyonda Lineweaver-Burk denklemi şu şekli alır:

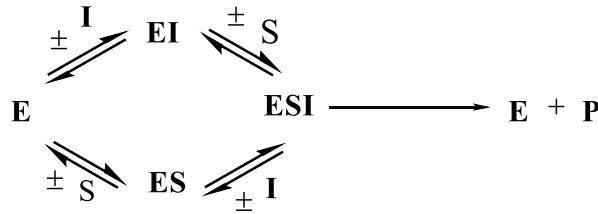
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]}$$



Şekil 7. Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon

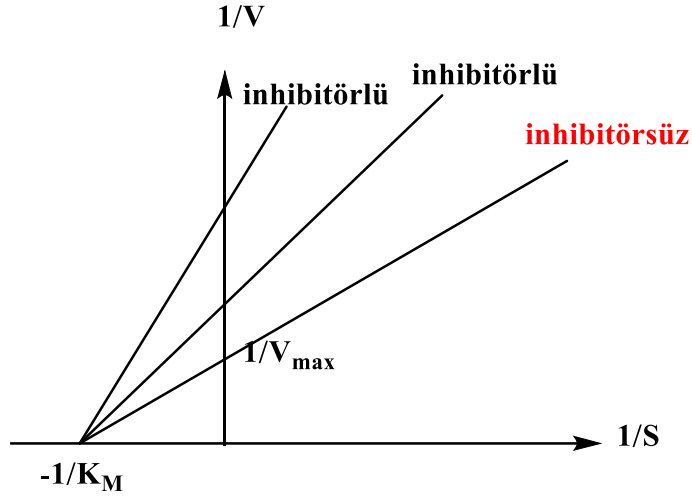
### Yarışmasız inhibisyon

Enzime ya da enzim-substrat kompleksine İnhibitör aktif merkez dışındaki bir bölgeden bağlanarak oluşturduğu inhibisyonudur. Farklı iki kompleks oluşur. Enzime inhibitörün bağlanması enzimi deforme edebileceğinden ES oluşması ve ayrışması normal hız ile yürümez. Substrat ve inhibitör ve arasında yarışma söz konusu değildir. Artırılan substrat konsantrasyonu inhibisyonu kaldıramaz. ES ve EI komplekslerini substrat ve inhibitör gelişi güzel bir tarzda birbirinden bağımsız ve dönüşümlü olarak aynı anda farklı merkezlere bağlanarak oluştururlar. Bunun yanında ES, I ve S ile birleşerek ESI kompleksini meydana getirir. Enzimin turnover sayısını, katalitik aktivitesini düşürerek yarışmasız inhibitör etkisini olmuş olur. Bu tip inhibisyonunda aşağıdaki reaksiyonlar olabilir:



Farklı inhibitör konsantrasyonları için aşağıda çizilen  $1/V-1/S$  doğrularının eğimi farklıdır, ama hepsi x eksenini aynı noktada kestiklerinden dolayı  $K_m$  değerleri aynıdır (Şekil 8). İnhibisyondan kaynaklı maksimum hız ise azalmıştır. Yarışmasız inhibitör varlığındaki maksimum hız ( $V_{\max}^I$ )

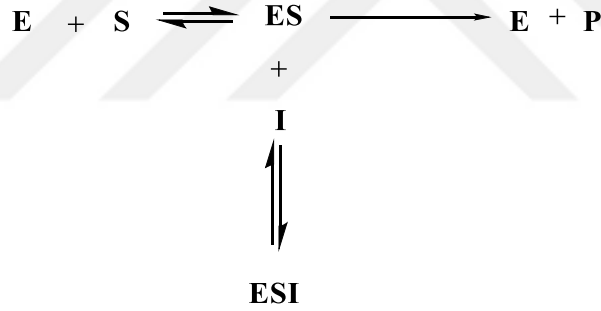
$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + [i]/K_I}$$



**Şekil 8.** Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon

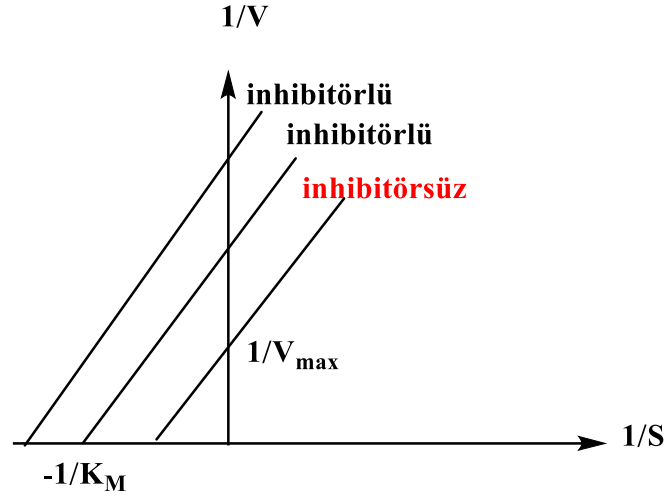
#### Yarı yarışmalı inhibisyon

Enzim-substrat kompleksine inhibitör direkt etki ile bağlanır. Bu etki ile oluşan yapı bozulacağından ürün meydana gelmez. İnhibitör serbest enzime bu inhibisyon çeşidinde bağlanamaz. Bundan dolayı substratı tek olan sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona az rastlanır. Reaksiyonu:



Şeklindedir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında ESI kompleksi ortamda sürekli var olacağından  $V_{\max}$  azalır. ESI kompleksi ES kompleksini ortamdaki sürekli çekmesi enzim ve substratın ES kompleksini oluşturma dengesi daha fazla sağa kaydırarak  $K_m$  küçülür.  $1/V-1/S$  grafikleri farklı inhibitör konsantrasyonlarında çizilirse birbirine paralel doğrular elde edilir. (Şekil 9) Hem  $V_{\max}$  hem de  $K_m$  değerleri yarı yarışmalı inhibisyonda azalmaktadır. Çoğunlukla iki substratlı reaksiyonlarda bu inhibisyon gözlenir. Yani:

$$K_M^I = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad \text{ve} \quad V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad \text{'dir.}$$

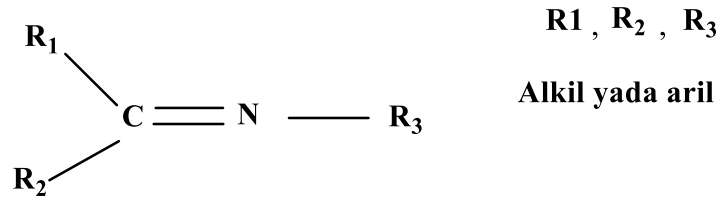


**Şekil 9.** Yarı Yarışmalı İnhibisyon

### Schiff bazı

İlk kez 1864 yılında Schiff tarafından sentezlenen bileşiklerdir.  $>C=N-$  grubu içerip koordinasyon kimyasında ligand olarak kullanılmaktadırlar. Pfeiffer tarafından ilk kez ligand olarak kullanılmıştır.  $R_1R_2C=NR'$  formülüyle gösterilir (Kaya 2021).

Primer âminlerin, aldehit veya ketonlarla kondenzasyonunda karbonla azot arasında bir çift bağ oluşarak Schiff bazları oluşur. Çok zayıf bazik özellik göstermektedirler (Hacıoğlu 2011).



Schiff bazları (iminler) kararlı ve kolay sentezlenebiliyor olmaları nedeniyle ilgi duyulan bileşikler arasındadır. Birçok biyolojik sistemde, kimyasal katalizde, tıp ve eczacılık alanlarında ve yeni teknolojilerde kullanılabilir olmaları iminlere olan bu ilgi ile açıklanabilir (Raczuk *et al.* 2022).

### Araştırmanın Amacı ve Önemi

Enzimler tarafından oluşturulan ürünlerin kullanım çeşitliliği ve ekonomideki kapladığı alan oldukça büyüktür. Bunun yanında enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, organik reaksiyonlardan daha yüksek saflıkta ve daha yüksek verimle meydana gelmektedir. Bu sebeplerden dolayı enzimler, çoğu zaman hem endüstrinin hem de bilim çevresinin dikkatini çekmektedir (Yılmaz 2016). Bu enzimlerden biri de LOX enzimidir.

Çağımızda sebzelerin çeşitli metodlarla uzun süre saklanması çok büyük önem arz etmektedir. Bu sektör ülkemizde ve dünyada ekonomik olarak büyük paya sahiptir. Bu bağlamda sebzelerin uzun süre saklanması ve aroma bileşenlerinin sentezi sırasında çeşitli bitkilerden saflaştırılan LOX'a yaygın bir şekilde ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü lezzet bozulmasında LOX enzimi sorumlu tutulmaktadır. Bu alanda kullanılan peroksidazdan daha az ısıya duyarlılığı ve daha çabuk inaktivasyonu yönüyle daha çok tercih edilmeye başlanmıştır (Xu *et al.* 2016).

LOX enzimi, temel ihtiyaç maddesi olan ekmekte de yaygın olarak kullanılmaktadır (karotenoidleri oksitleyip ekmek içini beyazlatıcı olarak, hamurun yoğrulma toleransını artırır). LOX enziminin bir başka kullanımı ise Fenton reaksiyonu ile fenol türevi bileşiklerini oksitlemektedir. Bu reaksiyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li ortamda yapmaktadır (ksenobiotiklerin oksidasyonu, epoksidasyon, desülfürasyon, N-demetilasyon ve sülfoksidasyon reaksiyonları gibi) (Sarı, 2006).

Bir başka LOX kullanımı bitkisel doymamış yağ asitlerine oksijen eklemek suretiyle risinoleik asite dönüştürülebilmektedir. Risinoleik asit ve türevleri; sabun, boya, vernik, reçine, plastik ve yağlayıcı maddelerin asıl bileşeni olarak kullanılmaktadır (Viswanath *et al.* 2020).

Ayrıca LOX'lar memelilerde; düzenleyici bileşiklerin (hidroksieikozatetraenoik asit (HETE), lökotrien, lipoksin ve hepoksilinler) biyosentezinde yer alan enzimlerdir. Bronşiyal astım, inflamasyon ve tümör anjiyojenezleri gibi önemli durumlarda LOX ürünlerinin rol oynadığı belirtilmektedir. Bronşiyal astım, inflamasyon, kanser ve otoimmün hastalıklarının tedavisi inhibitör mekanizmasıyla daha da önem kazanmaktadır. Dolayısıyla LOXlar ilaç tasarımlarında potansiyel hedef olarak dikkat çekmektedir (Yıldız 2010).

LOX canlılar için elzem olan, sinyal yolağında (jasmonik asit, lökotrien, 12HETE), peroksidasyon reaksiyonlarında (keratonisit, retikülosit, LDL oksidasyonu), lipid mobilizasyonunda (ester oksidasyonu ile beta oksidasyonunda) önemli fonksiyonları vardır (Brash, 1986).

Bazı enzimler; yeni gıda ürünleri geliştirmek, daha yüksek ekstraksiyon oran ve seviyede üretmek veya gıda kalitesini geliştirmek (lezzet gibi) için, ürünlerin üretimi sırasında sıklıkla olarak kullanılmaktadır. Öte yandan, enzimlerin de gıda kalitesi üzerinde zararlı etkileri olabilir. Gıda kalitesindeki kusurlar, gıdada doğal olarak bulunan enzimlerden veya bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerden kaynaklanabilir. Bu nedenle, koruma teknolojileri, mikrobiyal inaktivasyonun yanı sıra, bozucu etkiye sahip enzimleri inaktive etmeyi amaçlar. Enzimlerin faydalı ve/veya zararlı etkileri nedeniyle, birçok gıda işleme

adımında enzimatik aktivitenin kontrolü gereklidir. Dondurulmuş sebzelerde depolama stabilitesinin belirlenmesinde daha önemli olan, uygun haşlamanın göstergesi olarak LOX'un kullanılması tavsiye edilmiştir. Endüstri için, hızlı LOX aktivasyonu belirleme yöntemleri çalışılmalıdır (Baysal and Demirdogen 2007).

Son zamanlarda LOX enzimi üzerine araştırmalar gittikçe artmaktadır. Literatürde Kinoa gibi hem besin hem bileşim açısından zengin bir bitkiden LOX enzimini saflaştırılma araştırması ve özellikle yeni sentezlenmiş Schiff bazlarının LOX enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenlerle araştırmamızın sağlık ve gıda endüstrisinde çalışan bilim insanları açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.



## KURAMSAL TEMELLER

LOX, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu yoluyla hidroperoksitlerin oluşumunu katalize eden hem olmayan demir içeren bir enzim ailesidir (Yasin *et al.* 2023). LOX enziminin saflaştırılması 1972 yıllarına dayanır. İlk olarak soya fasulyesinden saflaştırılmıştır (Grossman *et al.* 1972).

LOX'lar tahıllarda (buğday, mısır, yulaf, çavdar, arpa), baklagillerde (maş fasulyesi, yeşil fasulye, bezelye, lacivert fasulye, soya fasulyesi) ve patates yumrularında bol miktarda bulunabilir (Lampi *et al.* 2020). LOX yolakları tarafından üretilen ürünlerin çeşitli işlevleri vardır. LOX vejetatif büyüme sırasında depo proteini olarak kullanılır. LOX çimlenme sırasında depo lipidlerinin mobilizasyonu ile ilgilidir (Porta and Rocha-Sosa, 2002) LOX ayrıca, bitkileri böceklerden ve patojenlerden veya abiyotik stres sırasında korumaya yardımcı olan koruyucu bileşenlerin (jasmonatlar, divinil eterler, yaprak aldehytleri) üretiminde de önemli bir rol oynar (Ogorodnikova *et al.* 2015). Öte yandan, doymamış yağ asitleri ile LOX reaksiyonları kötü tatlar/kötü kokular üretebilir ve gıdaların bozulmasına neden olabilir. LOX yolunun istenmeyen bileşenleri nedeniyle, LOX inhibisyon çalışmaları büyük önem arz etmektedir (Padilla *et al.* 2014).

Literatürde LOX enziminin çeşitli kaynaklardan saflaştırılması ve bazı maddelerin bu enzim aktivitesi üzerine inhibisyon çalışmaları mevcuttur. Örneğin, Arens *et al.* (1973), amonyum sülfat ile çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi yöntemlerini kullanarak bezelyeden LOX enzimini saflaştırmış ve molekül kütlesini 78 kDa olarak jel filtrasyon kromatografisi ile belirlemişlerdir.

Yabuuchi and Amaha (1975), filizlenmiş ve filizlenmemiş arpadan LOX enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. LOX enziminin 1mM EDTA, Hg(II), Cu(II) tarafından inhibe edilmediği gösterilmiştir. Ayrıca literatürde LOX durum buğdayından, (Briante *et al.* 2000) patlıcandan (Lopez –Nicolas Manuel *et al.* 2001) ve soya fasulyesinden saflaştırılmıştır (Yıldırım 2003). Bezelye (*Pisum sativum L.*, cv. *Alaska*) mitokondrisinden yapılan bir çalışmada, SDS-PAGE ile LOX enzimi 97 kDa molekül kütlesinde saflaştırılmıştır (Braidot, 2004).

Pérez-Gilabert *et al.* (2005) yüksek çoklu doymamış yağ asitleri(PUFA) oranından dolayı lipid ekşiliğini ve depolama ömrünün sınırlayan bir mikorhizal mantar olan çöl trüfünden (*Terfezia clavaryi*) LOX enzimi Triton X-114'ün varlığında faz ayırma ve

arkasından iki aşamalı katyon değişirme kromatografisi ile saflaştırılmış, SDS-PAGE ile moleküler kütlesi 66 kDa olarak belirlenmiş; linoleik ve linolenik asite spesifik özgülük gösterdiğini, linoleik asitde %32 aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bezelye tohumlarından (*Pisum sativum* var. *Telephone* L.) amonyum sülfat çöktürmesiyle (%0-80 doygunluk) DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi kullanılarak SDS-PAGE ile 93 kDa molekül kütlesine sahip LOX enzimi saflaştırılmıştır. Ayrıca kafeik asit > quercetin> kateşin > benzoik asit > ferulik asit > kaempferol fenolik bileşiklerinin LOX enzimini belirtilen etkide inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Szymanowska *et al.* 2009). Başka bir çalışmada, Avakadodan (*Persea americana* Mill. cv. Hass) iyon değişim kromatografisi ile LOX enzimi kısmi saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Jacobo-Velázquez *et al.* 2010).

Öğütülmüş maş fasulyesi tozlarından jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemiyle, LOX enzimi saflaştırılmış, SDS-PAGE yapılarak Coomassie brilliant blue R-250 boyama yöntemiyle enzimin moleküler kütlesi 97 kDa olarak belirlenmiştir (Aanangi *et al.* 2016).

Kaliforniya haşhaş (*Eschscholtzia californica* Cham.) tohumlarından substrat olarak linolek asit kullanılarak, hidrofobik ve iyon değişim kromatografisi ile 85 kDa molekül kütlesine sahip LOX enzimi saflaştırılmıştır (Holkova *et al.* 2016).

Zeytin meyvesinden (*Olea europaea* L.) kademeli santrifüjleme ve hidrofobik kromatografi yöntemi kullanılarak SDS-PAGE gümüş boyama tekniği ile 98 kDa moleküler kütlesinde LOX saflaştırılmış, Propil gallat (0–6.6 µM) ve nordihidroguaiaretik asitin (0–66 µM) LOX’u inhibe ettiği bildirilmiştir (Lorenzi *et al.* 2006).

Sud'Ina *et al.* (1993) yaptıkları çalışmada propolis özlerinin aktif bileşeni olan Kafeik asit fenetil esterinin LOX'u nordihidroguaiaretik asitten daha fazla inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Mahesha *et al.* (2007) genistein maddesinin soya LOX1 ve LOX5 enzimini sırasıyla 107 mM ve 125 mM IC<sub>50</sub> değeriyle inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Ashour *et al.* (2018) Bupleurum marginatum’un metanol ve diklorometan ekstraktları 5-LOX enzimini sırasıyla 45,28 ve 25,92 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Baskın bir bileşik olan Rutin, -74,59 kcal/mol etkileşim enerjisi ile 5-LOX aktif bölgesindeki anahtar amino asitlerle güçlü bir etkileşim gösterdiğini bulmuşlardır.

Yıldız (2010) bitki ekstrelerinin yüksek LOX inhibisyonundan düşükten büyüğe doğru sırasıyla; Trabzon hurması, lavanta, zencefil, yeşil mercimek, brüksel lahanası, papatya, enginar, yeşil bakla, brokoli, kekik, nohut, sarımsak, kuru soğan, devediken, kuru bakla, taze

fasulye, kayısı, limon, alıç, tere, fındık, mısır püskülü, kuru fasulye, biberiye, sarımsak, havuç, yeşil çay, beyaz lahana, keçiyoynuzu, nar, karnabahar, elma, zerdeçal, ayva, üzüm çekirdeği, greyfurt, kapari, keten tohumu, badem, ceviz, taze üzüm olarak bildirmiştir. LOX inhibitör etkisi en yüksek olanın trabzon hurması olduğunu bildirmiştir. Ayrıca çalışmada salisilik asit, phloridzin, askorbik asit, niasin, E vitamini, krom pikolinat, omega 3, benzoik asit yüksekten düşüğe sırasıyla, salisilik asitin en fazla LOX inhibe edici etkisi olduğu organik maddelerin, sodyum selenat, krom (III)sülfat, vanadyum sülfat, mangan sülfat ve krom (III)klorür olduğu yüksekten düşüğe sırasıyla, selenyumun en fazla LOX inhibe edici olan anorganik maddelerin LOX inhibisyon özelliklerini bildirmiştir. Hem organik maddelerin hemde anorganik maddelerin inhibitör etkilerinin kabul edilebilir düzeyde olduklarını belirlemiştir.

*Sinameki alata* (Linn.) yapraklarının hidroalkolik özü ve ana bileşiği rhein ekstraktının LOX enzimini inhibe ettiğini (sırasıyla 90.2 ve 3.9 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleriyle) bildirmişlerdir (Singh *et al.* 2012). Memecylon'un üç türünün, (*M. umbellatum*, *M. talbotianum* ve *M. malabaricum*'un) metanolik özleri, 5-LOX'u inhibe ettiğini, en yüksek inhibitör etki, *M. malabaricum* için gözlemlendiğini bildirmişlerdir. (Sekhar *et al.*2013). Ben-Nasr *et al.* (2015) *L. cretica* bitkisinin, yaprak ve çiçek özleri, LOX enzimini inhibe ettiğini (her iki özde IC<sub>50</sub> = 0.013 ± 0.0034 µg/mL) serbest radikalleri temizleyebildiğini, lipid peroksidasyonunu düzenlediğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *Terminalia chebula*'nın yapraklarının etanol ekstraktları 800 µg/mL konsantrasyonda %52,67 oranında LOX enzimini inhibe edici etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda sulu, kloroform ve petrol eteri ekstraktlarının sırasıyla %46,31, %39,51 ve %20,25 inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Eshwarappa *et al.* 2016).

Kuo *et al.* (2006) muzdan %25-50 doymuş amonyum sülfat çöktürmesi kullanılarak, hidroksiapatit kolon ayrımı ve Superdex 200 üzerinde jel filtrasyonu ile LOX enzimi saflaştırmış ve moleküler kütlesi SDS-PAGE ile 85 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Szymanowska *et al.* (2009) bezelyeden amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ile LOX enzimi saflaştırmış ve SDS-PAGE ile molekül kütlesi 93 kDa olarak bildirmişlerdir. Substrat olarak linolenik asit, araşidonik asit, oleik asit ve metil linleate kullanmışlardır. LOX için en iyi substratın linolek asit olduğunu belirlemişlerdir.

Kohoude *et al.* (2017) *Zanthoxylum armatum* DC meyve, yaprak ve kabuk diklorometan, etil asetat ve metanol ekstraktlarının LOX enzimini sırasıyla  $IC_{50} = 58,01 \pm 0,16$ ,  $45,10 \pm 0,01$  ve  $28,01 \pm 0,10$  mg/L olarak inhibe ettiğini; meyve kısmının yapraklara ve kabuğa kıyasla daha fazla ( $\%63,8 \pm 1,2$ ) inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Marlin *et al.* (2017) *G. hombroniana* Pierre yapraklarının n-heksan, etil asetat ve metanol ekstraktların LOX enzimini  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 2,052; 0,134; ve 1,314  $\mu\text{g/mL}$  inhibe ettiğini, etil asetatın ise en fazla inhibisyon etkisini gösterdiğini belirlemişlerdir.

Putri *et al.* (2017) *Garcinia kydia* Roxburgh 'un metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraktlarının LOX enzimini  $IC_{50}$  değeri olarak sırasıyla 0,556; 0,212 ve 3,575  $\mu\text{g/mL}$  inhibe ettiğini bulmuşlardır. En fazla ise etil asetatın aktiflik gösterdiğini bildirmişlerdir. Apalowo *et al.* (2019) *Kigelia africana* yaprak özütü ve fraksiyonlarının LOX inhibitör etkisini ham ekstrakt, sulu ve etil asetat fraksiyonlarında incelemiş ve LOX üzerine etkili olduğunu belirlemişlerdir. Babatunde *et al.* (2019) kurutulmuş *Cassia alata* (Linn.) Roxb yaprağının metanolik ekstraktının  $28,39 \pm 1,36$  (25  $\mu\text{g/mL}$ 'de) ile  $67 \pm 4,43$  (100  $\mu\text{g/mL}$ 'de) ve  $69,86 \pm 2,05$  (25  $\mu\text{g/mL}$ 'de) ile 83,73'lük soyLOX inhibisyon yüzdesi üzerinde gözle görülür etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Dilshad *et al.* (2016) *Carthamus oxyacantha* bitkisinin metanolik ekstraktından iki yeni sfingolipid izole etmişlerdir. Hem bileşik 1 hem de 2, konsantrasyona bağlı bir şekilde LOX'a karşı inhibitör potansiyeli göstermiştir ( $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $83.3 \pm 1.3$  ve  $245.7 \pm 1.1$   $\mu\text{M}$ ). Mantzanidou *et al.* (2021) pirazolinlerin ve pirazol türevlerinin sentezini, uygun süstitüe aldehitlerin ve asetofenonların, uygun kalkonların ve hidrazin hidratın mutlak etanol içinde buzlu asetik asit damlaları varlığında kondenzasyonu yoluyla sentezlemişlerdir. Bileşikler  $\%68-99$  oranında iyi verimle elde edilmiş ve yapıları IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  ve element analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Bileşik **2g** en güçlü LOX inhibitörü olarak belirlenmiştir ( $IC_{50} = 80$   $\mu\text{M}$ ). En güçlü LOX inhibitörü **2g**'nin kenetlenme çalışmaları Val126, Phe143, Val520 ve Lys526 ile hidrofobik etkileşimleri ve klor atomu ile Arg182 arasında bir halojen bağının olduğunu göstermişlerdir.

Souleymane *et al.* (2016) *E. senegalensis* kök ve gövde kabuğunun diklorometan (DCM) ve etil asetat (EtOAc) ekstrelerindeki 12-LOX inhibisyonunu incelemişlerdir. DCM ekstraktları neredeyse hiç etki göstermedi. Kökte ( $IC_{50}\text{-LOX: } 7.21 \pm 2.31$ ) ve gövde kabuğundan ( $IC_{50}\text{-LOX: } 4.95 \pm 1.12$ ) elde edilen EtOAc özütleri hem radikal süpürücü hem de 12-LOX inhibitör etkiler göstermiştir. Alam *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada *Zanthoxylum armatum*'un yaprakları, kabuğu ve meyvesi organik çözücü ile ekstrakte edilmiş ve fenolik içerikleri (Folin-Chiocalteu yöntemi), flavonoid içerikleri (kolorimetrik yöntem), in vitro antioksidan testleri (DPPH ve FRAP), lipoksigenaz inhibitör aktivitesi (5-LOX testi),

mineral içerikleri (atomik absorpsiyon) ve ağır metal kontaminantları (atomik absorpsiyon) açısından değerlendirilmiştir. Ekstraktlar LOX enzimi inhibe etmiş; meyve, yaprak ve kabuğa kıyasla daha fazla inhibisyon ( $63,8 \pm 1,2$ ) göstermiştir. Avelia *et al.* (2017) *Garcinia lateriflora* bitkisinin metanol, etil asetat ve n-hekzan ekstraktlarının LOX enzimi üzerine etkisini araştırmışlardır. IC<sub>50</sub> seviyeleri sırasıyla 0,693, 0,793 ve 1,316 µg/mL olarak belirlemişlerdir. .

Roussaki *et al.* (2014) bir dizi kumarin analogu sentezlemiş, antioksidan ve soya LOX inhibitör etkileri açısından değerlendirmişlerdir. Kumarin iskeleti üzerindeki çeşitli yapısal modifikasyonlar, farklı biyolojik deneylerle ilgili ilginç yapı-aktivite ilişkilerini ortaya çıkarmıştır. Preniloksi kumarinler (**9** ve **10**), lipid peroksidasyonu ve soya fasulyesi LOX üzerine en iyi kombine inhibisyonunu göstermiştir. Tiyokumarinler (**11** ve **14**) ise güçlü LOX inhibisyonu sergilemişlerdir.

Afagnigni *et al.* (2020) yaptıkları çalışmada *Dissotis multiflora* (Sm) Triana ve *Paullinia pinnata* Linn'in anti-inflamatuar, sitotoksikite ve genotoksikite aktivitelerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. *D. multiflora* ve *P. pinnata* konsantrasyona bağlı olarak 15-LOX aktivitesini inhibe etmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### Materyal

| Kullanılan kimyasal maddeler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Üretici Firma                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Trihidroksimetilaminometan(Tris),Sodyumtiyosülfat, Glutaraldehit, N,N,N,N'tetrametiletilediamin(TEMED), Guaiakol, Formaldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Standart serum albumin, Coomassie brilliantblue G-250, Etanol, Coomassiebrillantblue R-250, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Akrilamid, Sodyum karbonat, Hidrojen peroksit, Sodyum bikarbonat, Brom timol mavisi, Gliserol, Metanol, Diklorometan, Etil asetat, Diyaliz torbası, Sodyum klorür, Q-Sepharoz | <b>Sigma Chemical Company</b> |
| Hidroklorik asit, Fosforik asit, İzopropanol Gümüş nitrat, Sodyum sülfat, Sülfirik asit,                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>E. Merk AG</b>             |
| Triklor asetik asit (TCA), Potasyum fosfat, Sodyum hidroksit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>Riedel deHaen</b>          |
| $\beta$ -merkaptetoetanol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Fluka</b>                  |

### Kullanılan alet ve cihazlar

|                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| Buzdolapları          | :Siemens                   |
| Elektroforez tankı    | : Biorad (dikey)           |
| Güç kaynağı           | : Bio Rad Power Pac 3000   |
| Hassas terazi         | : Denver Instrument tip214 |
| Çalkalayıcı (Shaker)  | : IKA KS 130 basic         |
| Karıştırıcı (Vorteks) | : Fisonswhirli-mixer       |

|                      |                                      |
|----------------------|--------------------------------------|
| Magnetik karıştırıcı | : JEIO–TECH magnetic stirrer         |
| Otomatik pipet       | : Isolab                             |
| Peristaltik pompa    | : İsmatec                            |
| pH metre             | : Thermo scientific Orion star A 211 |
| Spektrofotometre     | : Beckman coulter DU 730             |
| Soğutmalı santrifüj  | : Hermle LabotecnicZ 323 K(Germany)  |
| Ultraturaks          | : Heidolph Silient Crusher M D91126  |
| Buz cihazı           | : ScotsmanAF 80(İtaly)               |

### **Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**

**% 5 NaCl içeren 0,2 M (pH:7) fosfat tamponu (Homojenat hazırlamada kullanılan çözelti):** 24 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  alınarak 950 mL saf suda çözüldü. pH metrede pH 7,0'a kadar 1 M NaOH ile titre edildi. Saf su ile son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Sonra 20 g NaCl bir beher içine konuldu. Bunun üzerine hazırlanan 400 mL 0,2 M pH:7,0 fosfat tamponu (1:4 W/V) eklenerek % 5 lik NaCl ihtiva etmesi sağlandı.

**10 mM Fosfat Tamponu (pH:6,5) (Diyaliz yapılırken kullanılan çözelti):** 1,198g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  alınarak 950 mL saf suya eklenerek çözüldü. pH metre yardımıyla pH 7,4'ye kadar 1M NaOH ile titre edildi. Saf suyla son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

**5 mM (pH:6,5) Fosfat Tamponu (Aktivite ölçümündeki çözelti):** 0,599g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  alınarak 950mL saf suda çözüldü pH metre kullanılarak 1M NaOH ile pH 6,5 ye kadar titre edildi. Son hacim 1000 mL 'ye saf suyla tamamlandı.

**50 mM (pH:6,5) Fosfat Tamponu (Q- Sepharoz Kolon dengeleme çözeltisi):** 5,99g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  alınarak 950mL saf suda çözüldü pH metre kullanılarak 1M NaOH ile pH 6,5 ye kadar titre edildi. Son hacim 1000 mL 'ye saf suyla tamamlandı.

**Linoleik asit substrat çözeltisi (4  $\mu\text{M}$ ):** 3  $\mu\text{L}$  linoleik asit alınarak üzerine 250 $\mu\text{L}$  metanol ilave edildikten sonra bu çözeltiden 50 $\mu\text{L}$  alınıp üzerine 4950  $\mu\text{L}$  metanol ilave edilerek hazırlandı.

### **Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan çözelti**

Proteinlerin kantitatif tayini Coomassie brillant blue G-250 reaktifi kullanılarak yapıldı. 100 mL %95'lik etanolle 20 mg Coomassie brillant blue G-250 çözülerek, çözeltiye fosforik asitten (%95lik) 200 mL eklendi ve çözeltinin hacim 2 L'ye tamamlandı.

### Elektroforezde kullanılan çözeltiler

1. Numune tamponu: 3 mL %100'lük gliserin, 1,95 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 3 mL 0,1'lik brom timol mavisi ve 9 mL %10'luk SDS karıştırıldı. Hacim ile 30 mL'ye safsu ile tamamlandı. 1000 µL numune tamponunda 50µL olacak şekilde β-merkaptoetanol eklendi.
2. 1 M (pH 6.8) Tris-HCl tamponu: 480 mL suda 72,68 g (0,2 mol) Tris çözüldü. pH 6.8'e 1 M HCl ile ayarlanıp ,hacim 500 mL'ye tamamlandı.
3. 1 M (pH 8.8) Tris-HCl tamponu: 72,68 g (0,2 mol) Tris, 480 mL suda çözüldü. pH 8.8'e 1 M HCl ile ayarlanıp, hacim 500 mL'ye tamamlandı.
4. SDS (%10): 9 ml saf suda 1 g SDS çözüldü.
5. %10 luk Amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat 10 ml saf suda çözüldü.
6. %30Akrilamid-%0,8 bisakrilamid:15g akrilamid ile 0,4g bisakrilamid tartılarak 34,6 ml suda çözüldü.
7. Yürütme tamponu: 9 g Tris ve 28,8 g glisin, 600 mL suda çözüldükten sonra, üzerine SDS'nin %10'luk çözeltisinden 15 mL ilave edilip hacim 1500 mL'ye suyla tamamlandı.
8. Proteinlerin sabitleştirilme çözeltisi: %10 TCA, %50 izopropanol ve %40 su olacak şekilde hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin 100 ml metanolde çözülür, 20 ml asetik asit ve 80 ml su eklenerek hazırlandı
10. Jel yıkama çözeltisi: 100 ml metanol, 20 ml asetik asit ve 80 ml su karıştırılarak elde edildi.

**Tablo 1.** Gümüş Boyamada Kullanılan Çözeltiler

|   |                      |                                                                                                                                                                                                                                    |
|---|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Tespit çözeltisi     | 120 mL su, 60 mL %96'lık etanol ve 20 mL asetik asitten hazırlandı.                                                                                                                                                                |
| 2 | Redüksiyon çözeltisi | 80 mL su ve 45 mL etanol karıştırıldı. Bu çözeltide 4,8 g sodyum asetat çözüldü. pH 6 olacak şekilde Asetik asitle titre edildi. 3 mL glutaraldehit ve 150 mg sodyum tiyosülfat eklendikten sonra 150 mL'ye saf su ile tamamlandı. |
| 3 | Boyama çözeltisi     | 100 mg gümüş nitrat 100 mL saf suyla çözülüp üzerine 30 µl formaldehit eklendi.                                                                                                                                                    |
| 4 | Yıkama Çözeltisi 1   | 270 mL saf suda 3,75 g sodyum karbonat, çözülerek 120 µl formaldehit eklendi.                                                                                                                                                      |
| 5 | Yıkama çözeltisi 2   | 500 mL %5'lik asetik asit ve 2 mL gliserin karıştırılmasıyla hazırlandı.                                                                                                                                                           |

## **Çalışmada Kullanılan Schiff Bazlarının Temini**

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’de görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'dan temin edilmiştir.

## **L<sup>1</sup>H Ligandının Sentezi**

20 mL mutlak etil alkolde 4-Hidroksisalisilaldehit (1,38 g, 10 mmol) çözülüp paralel sentez cihazındaki 100 mL’lik bir balona bırakıldı. O-aminofenol (1,09 g, 10 mmol) ve (0,01 g) *p*-toluen sülfonik asitin 20 mL mutlak etil alkolde çözünmüş hali yavaş yavaş bu çözeltiye damlatıldı. 60 °C’de 3 saatte reaksiyon gerçekleştirildi. Sentezlenen ürün dietil eter, etil alkol ve sıcak saf su ile yıkanıp vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).

## **L<sup>1</sup>H ligandının komplekslerinin sentezi**

10 mL mutlak etil alkolde sentezlenen L<sup>1</sup>H ligandı (0,458 g, 1,00 mmol) çözülerek paralel sentez cihazındaki 100 mL’lik bir balona bırakıldı. Bu çözeltiye metal asetattları [nikel (II) asetattetrahidrat (0,124 g, 0,50 mmol), kobalt (II) asetattetrahidrat (0,125 g, 0,50 mmol), çinko (II) asetatdihidrat (0,110 g, 0,50 mmol), bakır (II) asetatmonohidrat (0,10 g, 0,50 mmol), kadmiyum (II) asetatdihidrat (0,133 g, 0,50 mmol), uranil asetatdihidrat (0,212 g, 0,50 mmol)] damlatma hunisiyle damlatılarak karıştırıldı. 2-4 saatte 50-60 °C’de Reaksiyon gerçekleştirildi. Sentezlenen ürün dietil eter, etil alkol ve sıcak saf su ile yıkanıp vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).

**Tablo 2.** L<sup>1</sup>H Ligandı ve Komplekslerinin Analitik ve Fiziksel Verileri

| Bileşik                                           | Formül                                                          | M.A.<br>(g/mol) | Renk            | Erime<br>Noktası<br>(°C) | $\mu_{\text{eff}}$ | Verim<br>(%) | Elementel Analiz, %<br>Hesaplanan (Bulunan) |                |                |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------|--------------|---------------------------------------------|----------------|----------------|
|                                                   |                                                                 |                 |                 |                          |                    |              | C                                           |                |                |
| L <sup>1</sup> H                                  | C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                 | 229,235         | Kırmızı         | 216-218                  | -                  | 88,00        | 68,11<br>(68,09)                            | 4,84<br>(4,79) | 6,11<br>(6,02) |
| [Co(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CoC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 515,387         | Koyu Kahverengi | > 300                    | 4,21               | 62,00        | 60,59<br>(60,46)                            | 3,91<br>(3,86) | 5,43<br>(5,39) |
| [Ni(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ]               | NiC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 515,147         | Kahverengi      | > 300                    | 2,71               | 54,00        | 60,62<br>(60,59)                            | 3,91<br>(3,86) | 5,44<br>(5,39) |
| [Cu(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CuC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 520,000         | Koyu Yeşil      | > 300                    | 1,84               | 63,00        | 60,05<br>(60,01)                            | 3,88<br>(3,78) | 5,39<br>(5,28) |
| [Zn(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ]               | ZnC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 521,844         | Açık Yeşil      | > 300                    | Dia.               | 65,00        | 59,84<br>(59,72)                            | 3,86<br>(3,79) | 5,37<br>(5,29) |
| [Cd(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CdC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | 568,864         | Açık Yeşil      | > 300                    | Dia.               | 52,00        | 54,90<br>(54,82)                            | 3,54<br>(3,46) | 4,92<br>(4,89) |
| [UO <sub>2</sub> (L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> ] | UC <sub>26</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>  | 726,482         | Koyu Kiremit    | > 300                    | Dia.               | 71,00        | 42,99<br>(42,86)                            | 2,77<br>(2,69) | 3,86<br>(3,79) |

**L<sup>2</sup>H Ligandının Sentezi**

20 mL mutlak etil alkolde 5-Nitrosalisilaldehit (1,67 g, 10 mmol) çözülerek paralel sentez cihazındaki 100 mL'lik bir balona bırakıldı. Yine 20 mL mutlak etil alkolde çözünmüş *o*-aminofenol (1,09 g, 10 mmol) ve (0,01 g) *p*-toluen sülfonik asit yavaş yavaş bu çözeltiye damlatıldı. 60 °C'de reaksiyon 4 saatte gerçekleştirildi. Sentezlenen ürün dietil eter, etil alkol ve sıcak saf su ile yıkanıp vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).

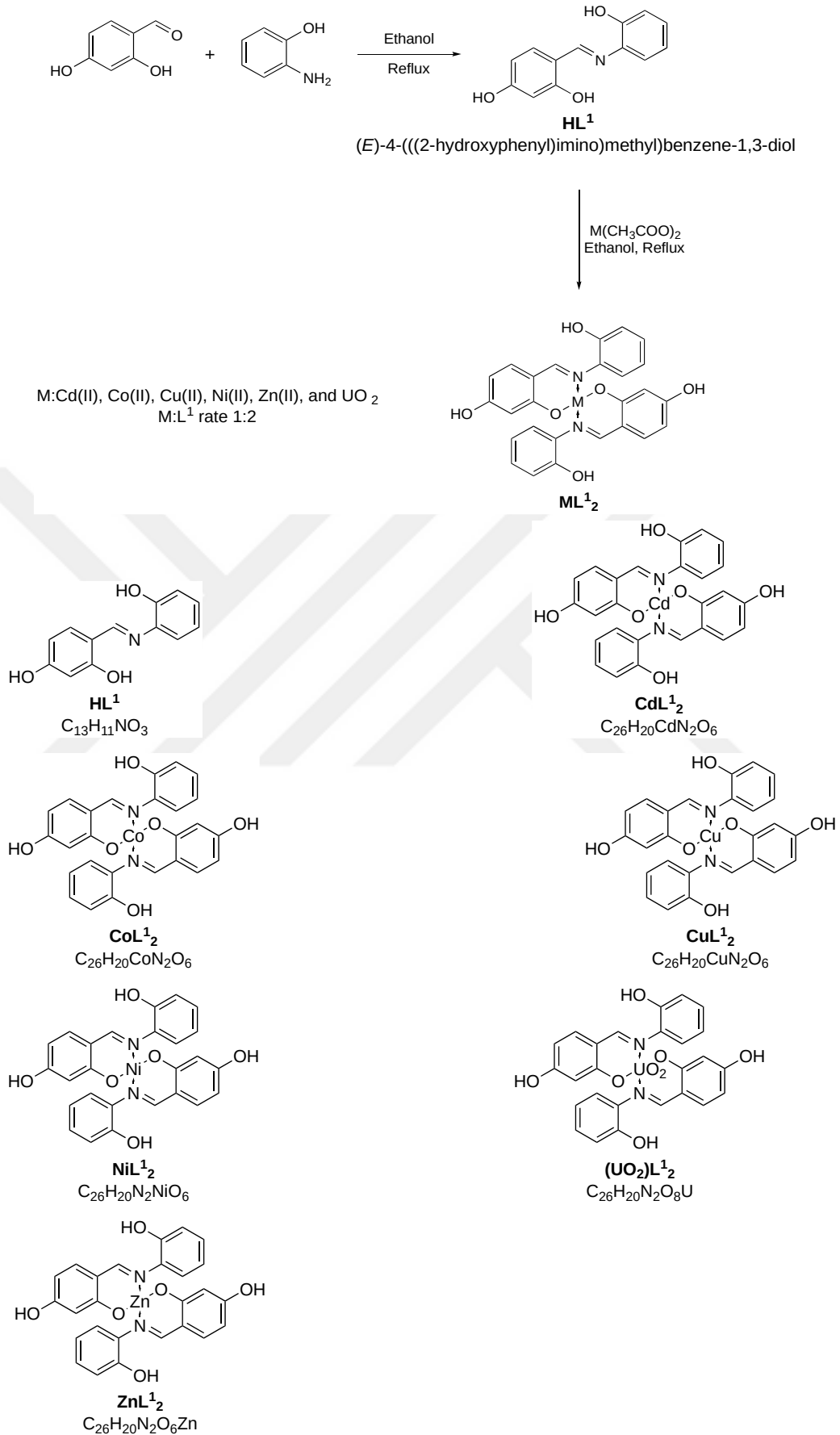
**L<sup>2</sup>H Ligandının komplekslerinin sentezi**

10 mL mutlak etil alkolde sentezlenen L<sup>2</sup>H ligandı (0,516 g, 1,00 mmol), çözülerek paralel sentez cihazındaki 100 mL'lik bir balona bırakıldı. Çözeltiye 10 mL mutlak etil alkolde çözülen metal asetatları [nikel (II) asetatetrahidrat (0,124 g, 0,50 mmol), bakır (II) asetatmonohidrat (0,10 g, 0,50 mmol), çinko (II) asetatdihidrat (0,110 g, 0,50 mmol), kobalt (II) asetatetrahidrat (0,125 g, 0,50 mmol), kadmiyum (II) asetatdihidrat (0,133 g, 0,50 mmol), uranil asetatdihidrat (0,212 g, 0,50 mmol)] damlatma hunisiyle damlatılarak karıştırıldı. Reaksiyon 50-60 °C'de 2-4 saatte gerçekleştirildi. Sentezlenen ürünler dinlendirildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı, vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).

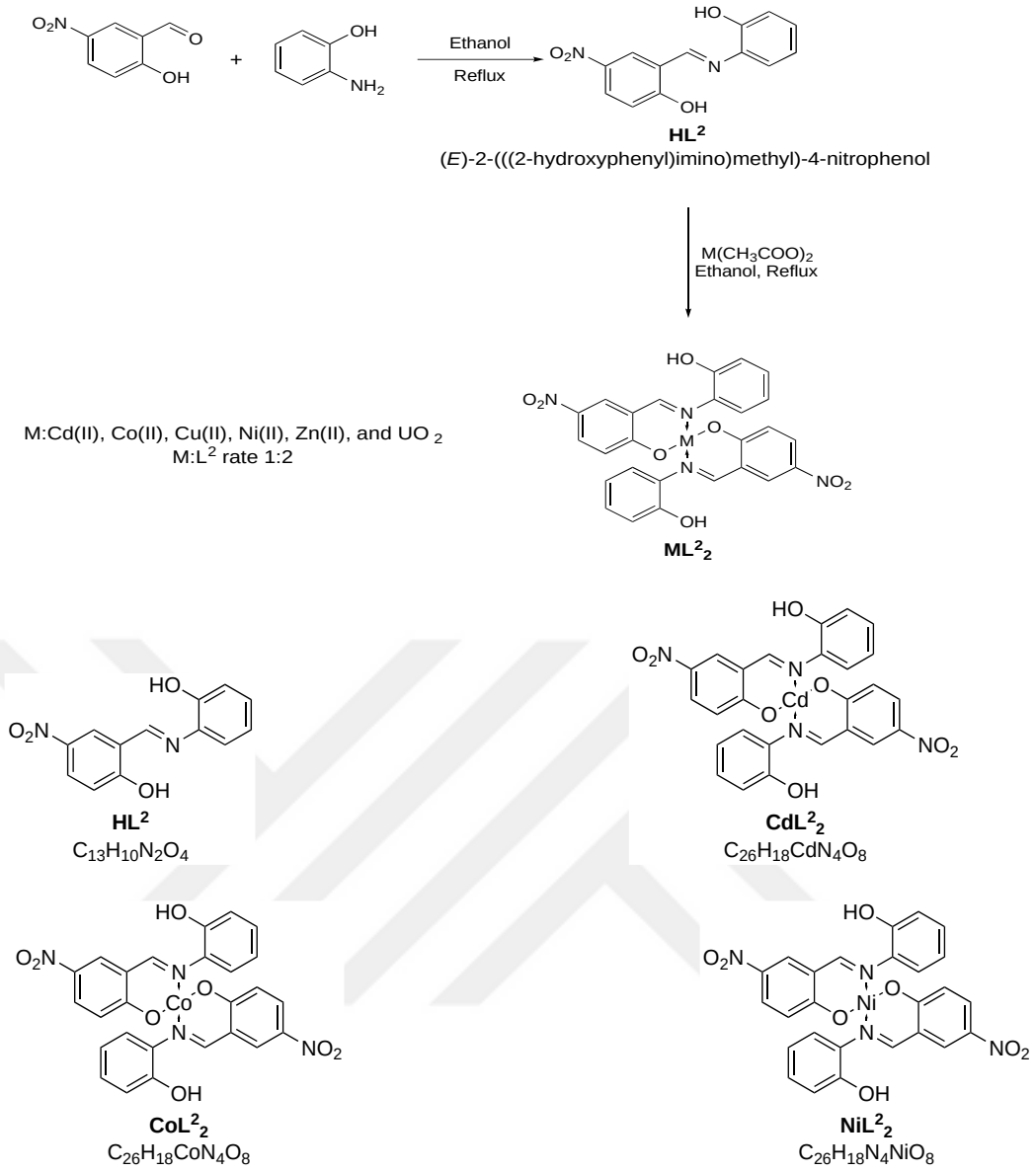
**Tablo 3.** L<sup>2</sup>H Ligandı ve Komplekslerinin Analitik ve Fiziksel Verileri

| Bileşik                                           | Formül                                                          | M.A.<br>(g/mol) | Renk            | Erime<br>Noktası<br>(°C) | $\mu_{\text{eff}}$ | Verim<br>(%) | Elementel Analiz, %<br>Hesaplanan (Bulunan) |                |                  |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------|--------------|---------------------------------------------|----------------|------------------|
|                                                   |                                                                 |                 |                 |                          |                    |              | C                                           |                |                  |
| L <sup>2</sup> H                                  | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>   | 258,233         | Koyu Kavuniçi   | 206-208                  | -                  | 81,00        | 60,46<br>(60,32)                            | 3,90<br>(3,86) | 10,85<br>(10,72) |
| [Co(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CoC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> | 573,383         | Koyu Kahverengi | > 300                    | 4,51               | 61,00        | 54,46<br>(54,48)                            | 3,16<br>(3,08) | 9,77<br>(9,68)   |
| [Ni(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ]               | NiC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> | 573,143         | Açık Kahverengi | > 300                    | 2,69               | 52,00        | 54,49<br>(54,37)                            | 3,16<br>(3,18) | 9,77<br>(9,63)   |
| [Cu(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CuC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> | 577,996         | Koyu Yeşil      | > 300                    | 1,82               | 61,00        | 54,03<br>(54,06)                            | 3,14<br>(3,06) | 9,69<br>(9,58)   |
| [Zn(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ]               | ZnC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> | 579,840         | Sarı            | > 300                    | Dia.               | 64,00        | 53,86<br>(53,69)                            | 3,13<br>(3,07) | 9,66<br>(9,58)   |
| [Cd(L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ]               | CdC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> | 626,860         | Açık Sarı       | > 300                    | Dia.               | 56,00        | 49,82<br>(49,80)                            | 2,89<br>(2,71) | 8,94<br>(8,78)   |
| [UO <sub>2</sub> (L <sup>2</sup> ) <sub>2</sub> ] | UC <sub>26</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> | 784,478         | Koyu Kiremit    | > 300                    | Dia.               | 69,00        | 39,81<br>(39,78)                            | 2,31<br>(2,27) | 7,14<br>(7,08)   |

## Çalışmada Kullanılan Schiff bazları



Şekil 10. L<sub>2</sub><sup>1</sup>H ligandı Kullanılarak oluşturulan schiff bazlarının açık yapıları



**Şekil 11.** L<sub>2</sub><sup>2</sup>H ligandı Kullanılarak oluşturulan Schiff bazlarının açık yapıları

### Kinoa bitkisinin homojenizasyonu

Erzurum aktarlarından temin edilen 20 gr kinoa öğütücüde un haline getirilip üzerine 80 mL % 5 NaCl içeren 0,2 M (pH:7) (1:4 oranında w/v) fosfat tamponu ve %1 aseton'dan oluşan çözelti 4°C de 60 dakika bekletildi. Ultraturaks ile kinoalar 5 dakika boyunca homojenize edildi. Daha sonra santrifüj tüplerine örnekler alınarak 13000 g'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek supernatant alındı.

### LOX Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Arens *et al.* (1973) ve Barone *et al.* (1990) tarafından önerilen yöntemler LOX aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır. Yöntemde linoleik asit ana substrat çözeltisi 5 mL metil alkol içerisinde derişimi 4 µM olacak şekilde hazırlandı. 2910 µL (50 mM fosfat tamponu

(pH:6.5) içerisine 90 µl substrat çözeltisi eklendi sonra da 20 µl enzim çözeltisi ilave edilerek 3 dakika boyunca 234 nm de artan absorbans kaydedildi (Sarı, 2006).

IU/mL cinsinden enzim aktivitesinin hesaplanmasında aşığıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{25} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_f$$

Formüldeki simgeler asagıda açıklanmıştır;

EÜ/ml : Enzim ünitesi (1 ml'deki)

OD : Bir dakikadaki absorbans deęiřimi

25 : 234 nm'de oluşan ürün için milimolar ekstrikasyon katsayısı

V<sub>T</sub> : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V<sub>E</sub> : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S<sub>f</sub>: Seyreltme faktörü

#### **Amonyum sülfat çöktürmesi katı amonyum sülfat**

Katı amonyum sülfatla kinoa'dan elde edilen homojenat sırasıyla %20'den başlayıp %60'a kadar 20'şer birim aralıklarda çöktürüldü. öktürme sonucunda oluşan karışım +4°C, 13000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Homojenat tamponu içerisinde özölen pelletler, aktivite ölçümü yapılarak çöktürme aralığı belirlendi.

Gerekli amonyum sülfat miktarı aşığıdaki formülden hesaplandı.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim özeltisinin hacmi

S<sub>1</sub>: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

#### **Q-Sepharoz anyon değişim kromatografisi**

Q-Sepharoz anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu metaryeli hazır olarak temin edildi. Jel 50 mM Na-fosfat, pH=6,5 tamponu ile karıştırılarak beş dakika beklemeye bırakıldı. Daha sonra karışımın pH'sı 6,5 'a ayarlandı. Dibe çöken jel tekrar tampon ile süspanse edildi. 50 mM Na-fosfat, pH=6,5 ile kolona tatbik edildi ve aynı tampon ile kolon yıkandı.

## **Protein tayini**

### **Kalitatif protein tayini**

Protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm'deki UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel, 1968).

### **Bradford protein tayin yöntemi**

Kinoa bitkisinden elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve Q-Sepharoz anyon değiştirici kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları, Bradford metodu kullanılarak belirlendi (Bradford, 1976).

### **Enzim Saflığının Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Belirlenmesi**

SDS-PAGE ile LOX enzimi saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi. Molekül ağırlığı belli olan hazır standart proteinler kullanıldı (Laemmli 1970).

**Ayırma jeli şöyle hazırlandı:** 4,4 ml %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, pH: 8,8 olan 5 mL 1 M Tris-HCl, 0,2 mL %10 SDS, 0,13 mL %5'lik TEMED ve 3,13 mL su karıştırılıp üzerine 0,2 mL %10'luk amonyum persülfat (PER) ilave edildi.

**Yığma jeli şöyle hazırlandı:** 0,4 mL %30 akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,41 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL %5'lik TEMED ve 2,45 mL saf su alınarak karıştırıldı. Sonra %10'luk PER'den 0,1 mL eklendi.

Elektroforez sistemine numuneler yüklendi. Uygulama işlemi gerçekleştirildikten sonra ilk başta yarım saat 80 voltta yürütüldü. Sonra 1,5 saat 120 volta yürütüldü.

Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra cam plaklardan çıkartılan jele hem coomassie hemde gümüş boyama işlemi yapıldı.

### **Optimum pH'nın belirlenmesi**

Linoleik asit substratı için kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için optimum pH ölçümü yapıldı. Optimum pH ölçümü için pH'sı 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 7,5 ve 8,0 olan 0,05 M Fosfat tamponları, pH'sı 7,5, 8,0 8,5, 9,0 olan 0,05 M olan Tris-HCl tamponları, pH'sı 9,0, 9,5, 10,0 olan 0,05 M Glisin tamponu hazırlandı. Aynı ayrı her tampon için enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

## Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi

Linoleik asit substratı için kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için 0,005 M 0,025 M, 0,05 M, 0,1M, 0,2 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M, 0,8 M, 1,0 M fosfat tamponlarıyla çalışıldı. Her bir çözelti için aktivite ölçümü yapıldı.

## Kinoa tohumundan elde edilen LOX enzimi üzerine Schiff bazlarının inhibitör etkilerinin incelenmesi

Bu çalışmada inhibitör olarak HL,  $\text{CdL}_2$ ,  $\text{NiL}_2$ ,  $\text{HL}^2_2$ ,  $\text{CdL}^2_2$ ,  $\text{NiL}^2_2$ ,  $\text{CoL}^2_2$ ,  $\text{CuL}^2_2$ ,  $\text{UO}_2\text{L}^2_2$ , ve  $\text{ZnL}^2_2$ , bileşikleri kullanıldı. Farklı inhibitör konsantrasyonları denenerek inhibisyon aralığı belirlenmeye çalışıldı. %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı.

$K_i$  değerlerini belirlemek için ise beş farklı substrat konsantrasyonunda optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Çalışmada uygun substrat konsantrasyonu ön deneme ile belirlendi. Her bir inhibitör için elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. İnhibisyon türleri ve bu grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri hesaplandı.

## Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Moleküler kenetlenme çalışmaları yardımıyla proteinler ile moleküllerin (ligandların) kararlı bir kompleks oluşturmak için bağlanma bölgeleri belirlenebilmekte, olası yapı-aktivite ilişkileri ile ligandların proteinlere bağlanırken oluşturduğu konformasyonlar ve yönelimler tahmin edilebilmektedir. Bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda inhibisyon etkinlikleri araştırılan moleküllerin LOX enzimiyle etkileşimlerini detaylandırmak amacıyla moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirildi. Moleküler kenetlenme simülasyonlarında kullanılan LOX enziminin üç boyutlu yapısı (PDB ID: 1N8Q Borbulevych *et al.* 2004) “RCSB Protein Data Bank” web sitesinden (<https://www.rcsb.org>) indirilerek “Small-Molecule Drug Discovery Suite 2023-1 (Schrödinger, LLC, NY, USA)” yazılımının “Protein Preparation Wizard” modülü (Madhavi Sastry *et al.* 2013) kullanılarak hazırlandı. Bu proteinin yapısında birlikte kristalize olan Protokatekuik asit enzimin bağlanma bölgesinde tutuldu. Yapıda eksik olan hidrojen atomları aynı yazılımın “Prime” modülü kullanılarak (Jacobson *et al.* 2004) tamamlanmış, amino asit kalıntılarının iyonizasyon ve totomeri durumları “Epik” modülü ile (Shelley *et al.* 2007) belirlendi ve protonların oryantasyonları  $7,0 \pm 2,0$  pH değerinde “PropKa” modülü kullanılarak ayarlandı. Protein hazırlık aşamasında yalnızca enzimin aktif bölgesindeki su molekülleri muhafaza edilerek liganda 5 Å’den uzakta olan su molekülleri çıkartıldı ve bu moleküllerin bağlanma bölgesindeki durumları “OPLS4” kuvvet alanı (Lu *et al.* 2021) kullanılarak yeniden optimize edildi. Sentezlenen bileşiklerin iki boyutlu çizimleri

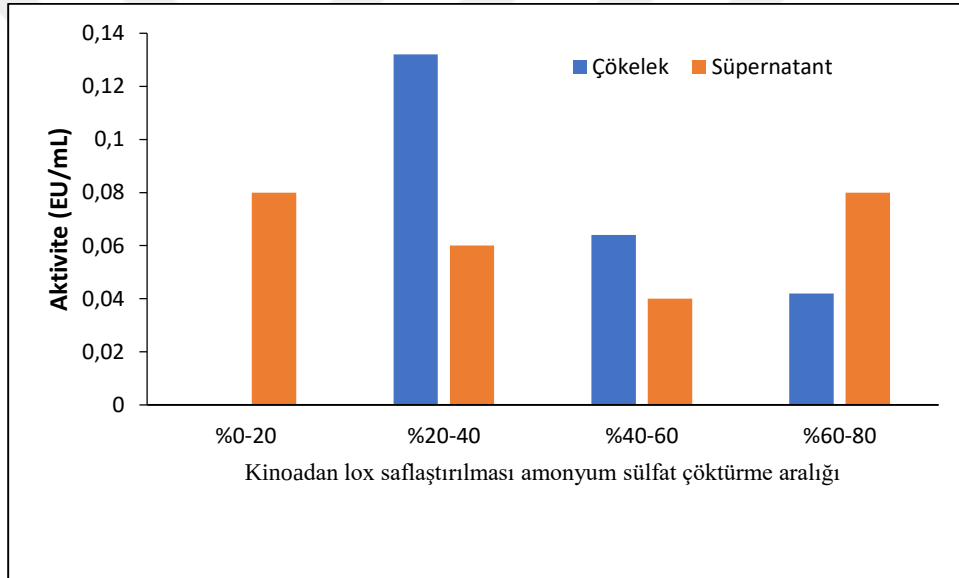
“ChemDraw 21 PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)” yazılımı ile gerçekleştirildi ve “LigPrep” modülü (CS *et al.* 2018) yardımıyla pH  $7,0 \pm 2,0$ ’deki olası iyonizasyon durumları, totomerleri ve enantiyomerleri belirlendi. Ligandların minimizasyonu için “OPLS4” kuvvet alanı parametreleri kullanıldı. Kenetlenme öncesi “Receptor Grid Generation” modülü (Halgren *et al.* 2009) ile bağlanma bölgesinin haritası oluşturuldu ve aynı yazılımın “Glide XP” algoritması (Friesner *et al.* 2004; Halgren *et al.* 2004) kullanılarak ilk önce Protokatekuik asit (Kristal içindeki Protokatekuik asit’in ilk konformasyonu ile kenetlenme sonrası konformasyonu üst üste çakıştırılarak RMSD değeri 0,18 Å olarak hesaplandı) daha sonra diğer ligandlar proteine kenetlendi.



## ARAŞTIRMA BULGULAR

### Kinoa LOX Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığı

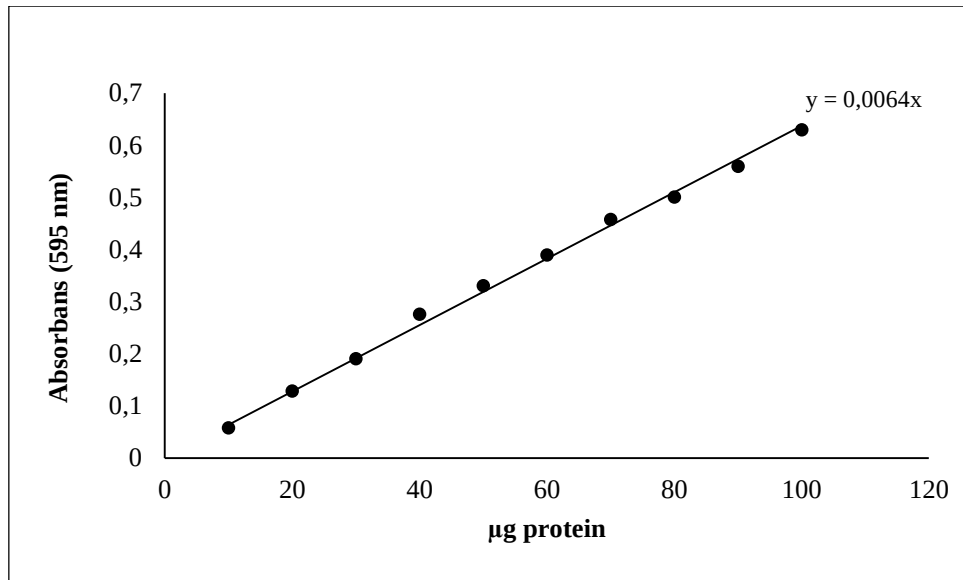
- Kinoa tohumlarında LOX enziminin varlığı araştırıldı, homojenat elde edildi ve homojenatta aktivite olduğu görüldü.
- Homojenatın % 0–20 ve % 60–80 aralığında 20’şer birim amonyum sülfat çöktürmesi işlemi uygulandı. Her santrifüj işleminden sonra hem çökelekte hemde süpernatantta aktivite bakılarak çöktürme aralığı %20-40 olarak belirlendi. (Şekil 12)



**Şekil 12.** Kinoa LOX enziminin Amonyum sülfat çöktürme aralığı

### Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

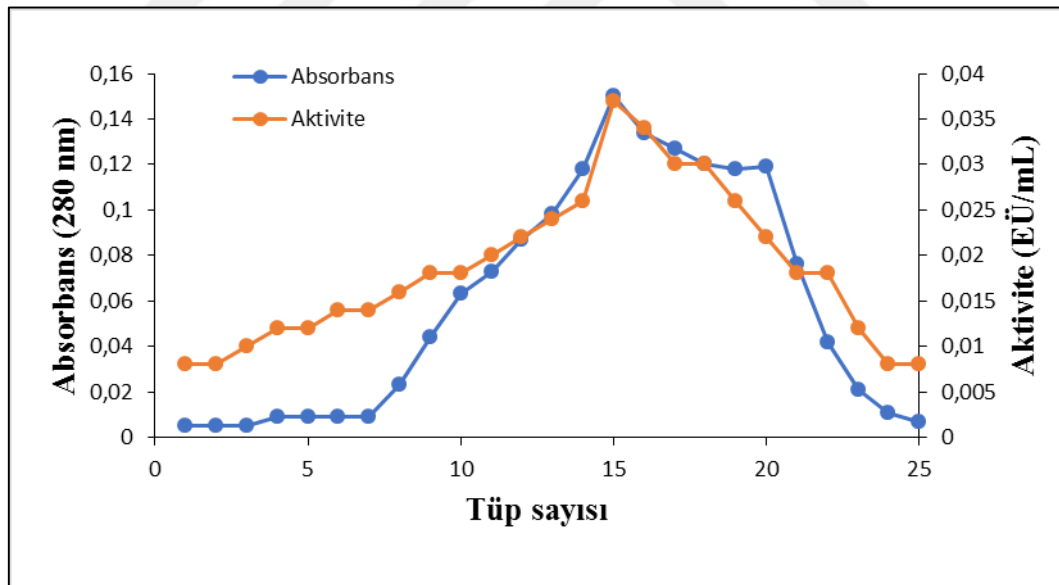
Saflaştırma basamağındaki işlemler için kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. µg proteine karşılık gelen absorbans değerlerini içeren standart grafik Şekil 13’de gösterildi.



Şekil 13. Protein standart eğrisi

### Q-Sepharoz İyon Değişim Kromatografisi

Q-Sepharoz İyon Değişim Kromatografisi kullanılarak basamaklı NaCl elüsyonu ile elde edilen elüatlarda hem aktivite hem de 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek Şekil 14'deki grafik elde edildi.



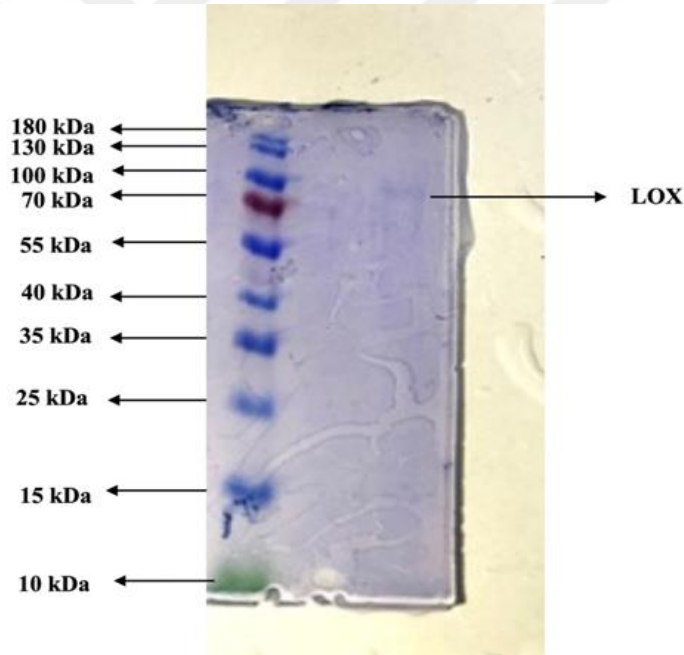
Şekil 14. Q-Sepharoz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

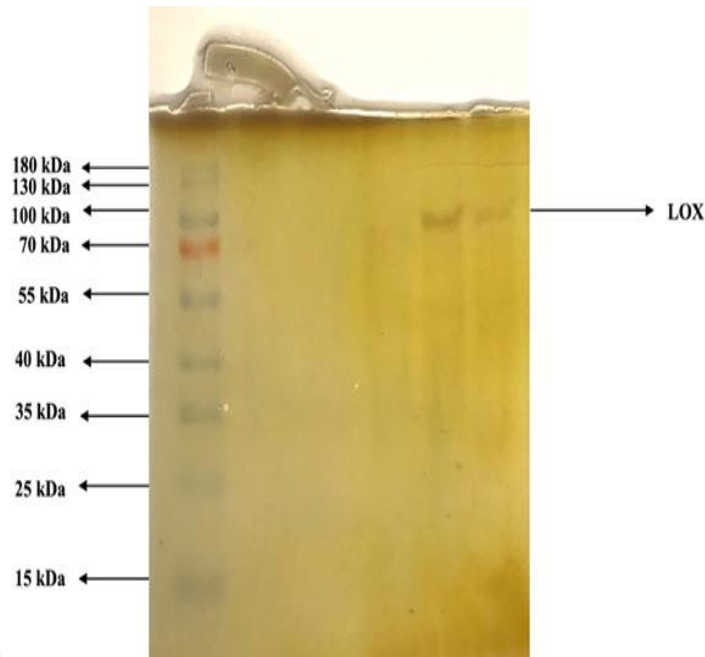
**Tablo 4.** Kinoadan LOX enziminin saflaştırılma basamakları

| Saflaştırma Basamakları                                      | Aktivite (EÜ/mL) | Protein (mg/mL) | Toplam Hacim (mL) | Toplam Aktivite (EÜ) | Toplam Protein (mg) | Spesifik Aktivite (EÜ/mg protein) | Saflaştırma Katsayısı | % Verim |
|--------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------|---------|
| <b>Homojenat</b>                                             | 0,184            | 9,58            | 25                | 4,6                  | 239,50              | 0,019                             | 1                     | 100     |
| <b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve Diyaliz</b> | 0,12             | 4,13            | 15                | 1,80                 | 61,95               | 0,029                             | 1,53                  | 39,13   |
| <b>Q-sepharoz iyon değişim kromatografisi</b>                | 0,037            | 0,025           | 9                 | 0,333                | 0,225               | 1,48                              | 77,89                 | 7,24    |

#### Kinoadan saflaştırılan LOX enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Kinoadan LOX enziminin Q-Sepharoz iyon değişim kromatografisi neticesinde toplanan elüatlarda SDS-PAGE yöntemiyle enzimin saflığını kontrol edildi. LOX enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 97 kDa olarak hesaplandı. SDS-PAGE fotoğrafı Şekil 15 ve 16'da gösterildi.

**Şekil 15.** Coomassie blue boyama yöntemiyle elde edilen SDS-PAGE görüntüsü



**Şekil 16.** Gümüş boyama yöntemiyle elde edilen SDS-PAGE görüntüsü

#### **Optimum pH çalışmasının sonuçları**

Kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi optimum pH değerini bulmak için pH değeri 4,0-8,0 arası 0,05 M'lık fosfat tamponu, pH değeri 7,5-9,0 arası 0,05 M'lık Tris-HCl tamponu, pH değeri 9,0-10,5 arası 0,05 M'lık glisin tampon çözeltileri kullanıldı. Enzimin her bir tampon için absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek aktiviteleri hesaplandı (Tablo 5-7).

Kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için optimum pH 5,5 olarak belirlendi (Şekil 17).

**Tablo 5.** Fosfat Tamponu İçin Farklı pH 'larda Aktivite Değerleri

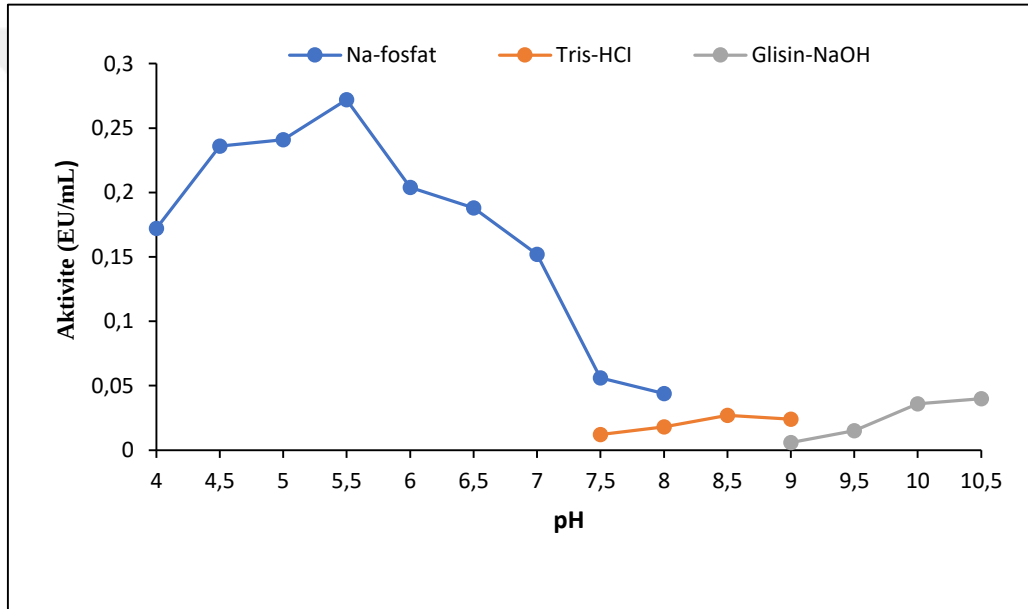
| Aktivite (EU/mL) | pH  |
|------------------|-----|
| 0,172            | 4,0 |
| 0,236            | 4,5 |
| 0,241            | 5,0 |
| 0,272            | 5,5 |
| 0,204            | 6,0 |
| 0,188            | 6,5 |
| 0,152            | 7,0 |
| 0,056            | 7,5 |
| 0,044            | 8,0 |

**Tablo 6.** Tris-HCl Tamponu İçin Farklı pH'larda Aktivite Değerleri

| pH  | Aktivite (EU/mL) |
|-----|------------------|
| 7,5 | 0,012            |
| 8,0 | 0,018            |
| 8,5 | 0,027            |
| 9,0 | 0,024            |

**Tablo 7.** Glisin Tamponu İçin Farklı pH larda Aktivite Değerleri

| pH   | Aktivite (EU/mL) |
|------|------------------|
| 9,0  | 0,006            |
| 9,5  | 0,015            |
| 10,0 | 0,036            |

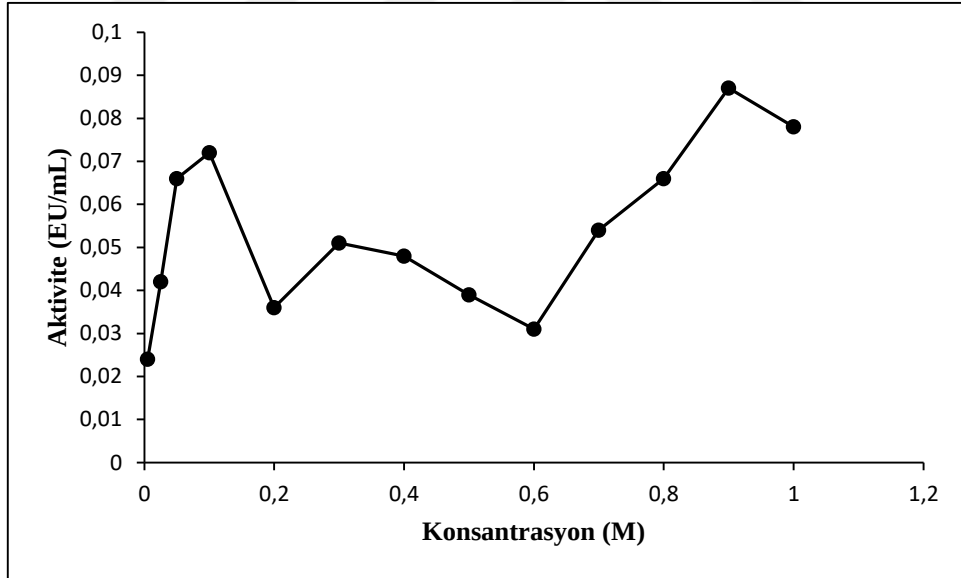
**Şekil 17.** Kullanılan farklı pH tamponları için elde edilen Kinoa LOX aktivite değerleri

### Optimum iyonik şiddetin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi için 0,005 M-1,0 M arasında değişen konsantrasyonlarda 1,0 M'lık fosfat tamponu hazırlandı. Değişik konsantrasyonlarda elde edilen aktivite değerleri Tablo 8'de gösterildi. Kinoa tohumlarından elde edilen LOX enzimi için en uygun iyonik şiddet 0,9 M olarak belirlendi (Tablo 8, Şekil 18).

**Tablo 8.** Kinoa Tohumlarından Elde Edilen Homojenatta LOX Enzimi İçin En Uygun İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Konsantrasyon-Aktivite Değerleri

| Fosfat tampon konsantrasyonu (M) | Aktivite EU/mL |
|----------------------------------|----------------|
| 1                                | 0,078          |
| 0,9                              | 0,087          |
| 0,8                              | 0,066          |
| 0,7                              | 0,054          |
| 0,6                              | 0,031          |
| 0,5                              | 0,039          |
| 0,4                              | 0,048          |
| 0,3                              | 0,051          |
| 0,2                              | 0,036          |
| 0,1                              | 0,072          |
| 0,05                             | 0,066          |
| 0,025                            | 0,042          |
| 0,005                            | 0,024          |

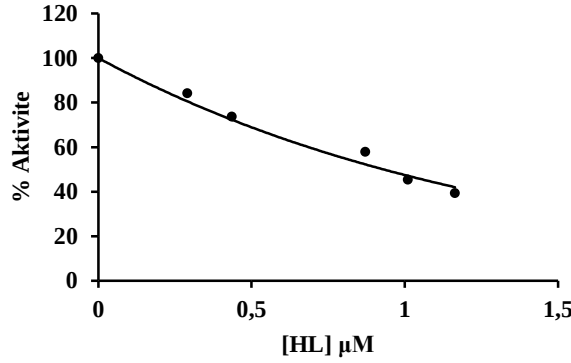


**Şekil 18.** Kinoa tohumlarından elde edilen homojenatta LOX enzimi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi

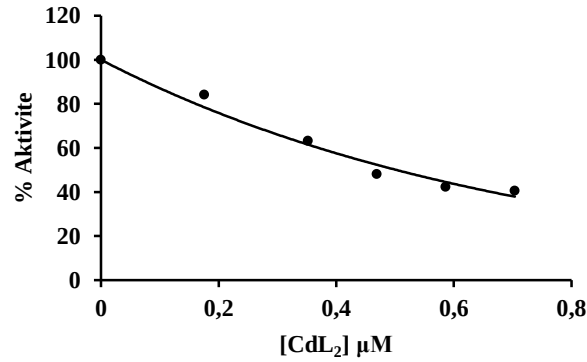
## Kinoa tohumundan elde edilen LOX enzimi üzerine Schiff bazlarının inhibisyon etkilerinin incelenmesi

### IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi

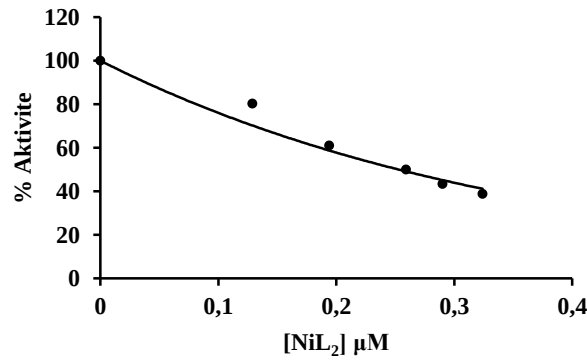
Uygun inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Aktivite değerlerinden faydalanılarak enzim aktivitesini yarıya düşüren IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.



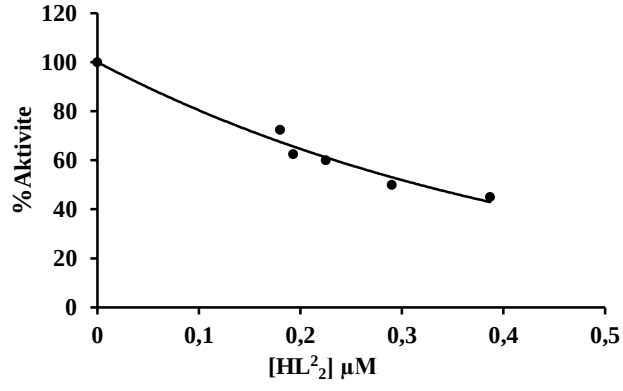
**Şekil 19.** LOX enzimi aktivitesine karşı HL bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değeri tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği



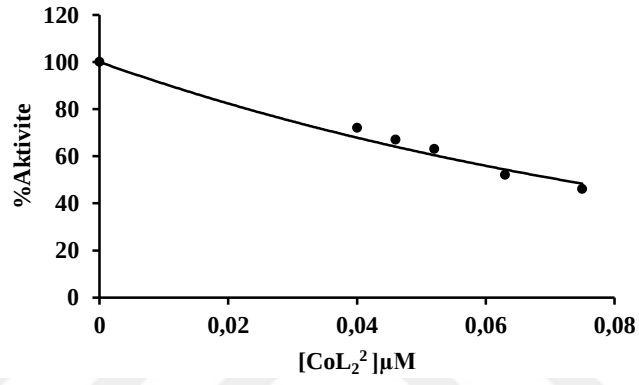
**Şekil 20.** LOX enzimi aktivitesine karşı CdL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği



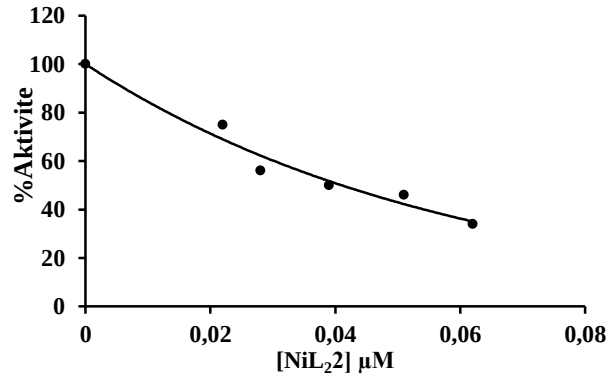
**Şekil 21.** LOX enzimi aktivitesine karşı NiL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği



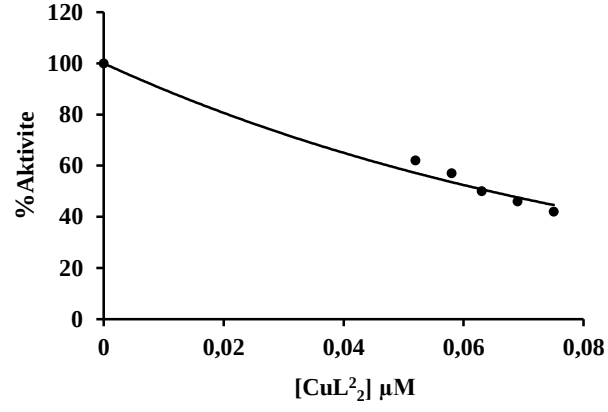
**Şekil 22.** LOX enzimi aktivitesine karşı HL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] – Aktivite % grafiği



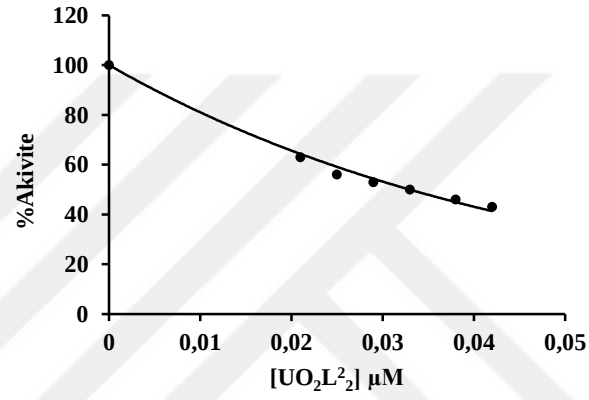
**Şekil 23.** LOX enzimi aktivitesine karşı CoL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



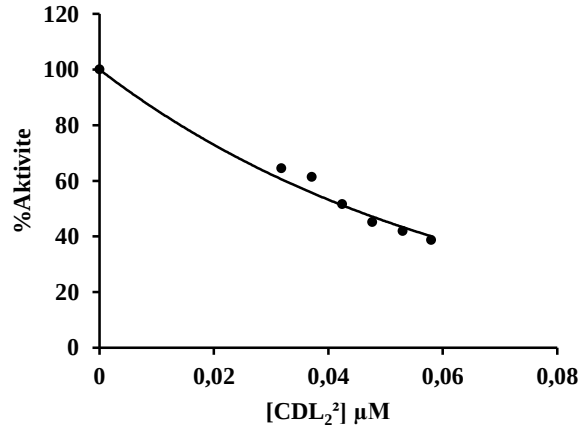
**Şekil 24.** LOX enzimi aktivitesine karşı NiL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



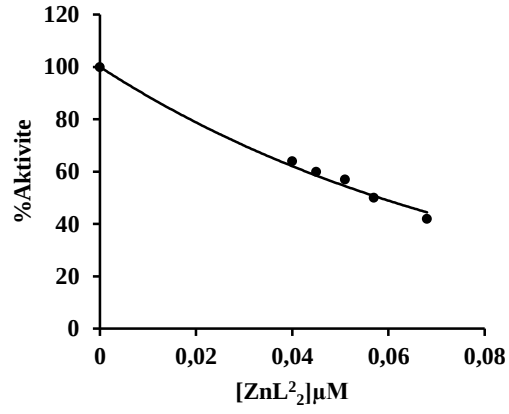
**Şekil 25.** LOX enzimi aktivitesine karşı CuL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



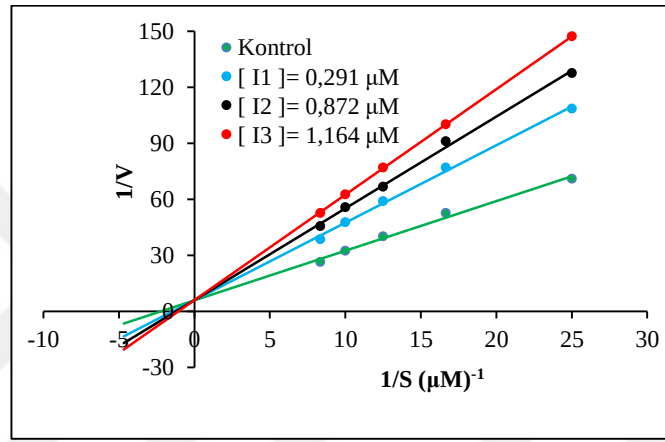
**Şekil 26.** LOX enzimi aktivitesine karşı UOL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



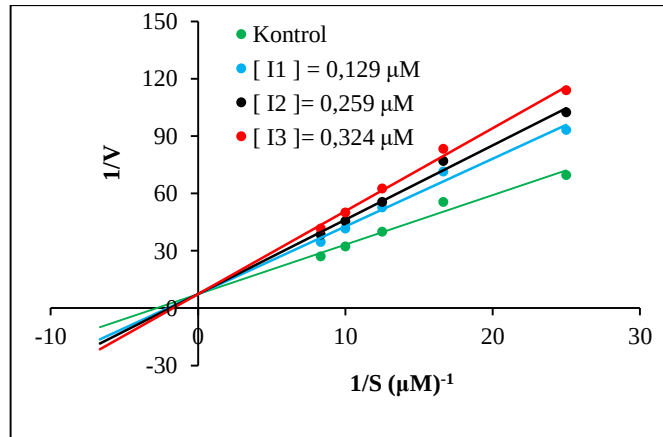
**Şekil 27.** LOX enzimi aktivitesine karşı CdL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve IC<sub>50</sub> değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



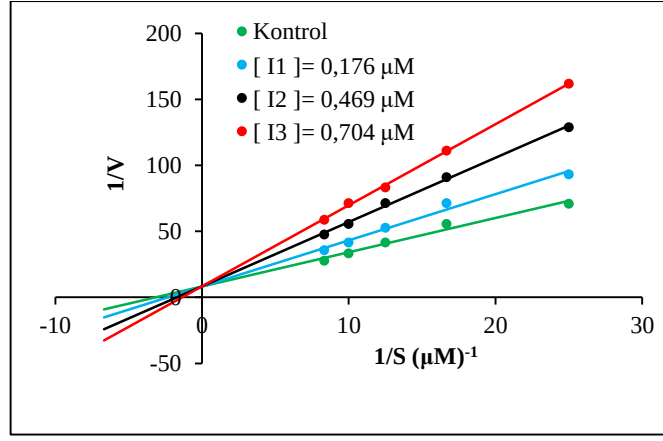
**Şekil 28.** LOX enzimi aktivitesine karşı  $ZnL_2$  bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $IC_{50}$  değerinin tespitinde kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



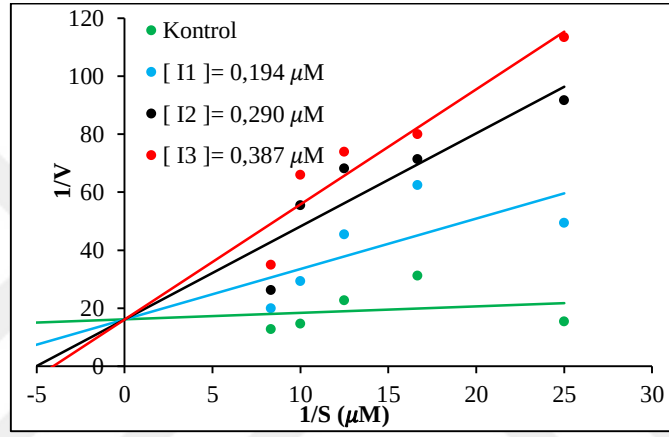
**Şekil 29.** LOX enzimi aktivitesine karşı HL bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tespitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



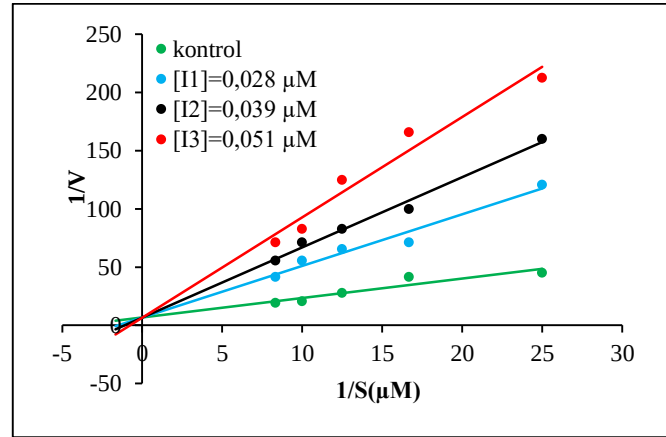
**Şekil 30.** LOX enzimi aktivitesine karşı  $NiL_2$  bileşiğinin etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



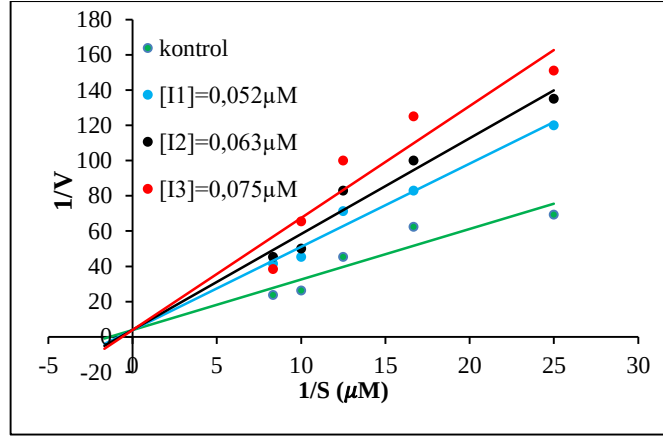
**Şekil 31.** LOX enzimi aktivitesine karşı CdL<sub>2</sub> bileşiğinin etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



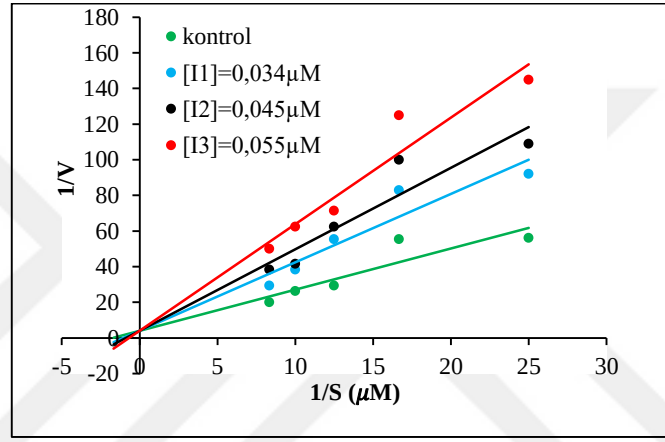
**Şekil 32.** LOX enzimi aktivitesine karşı HL<sup>2</sup> bileşiğinin etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



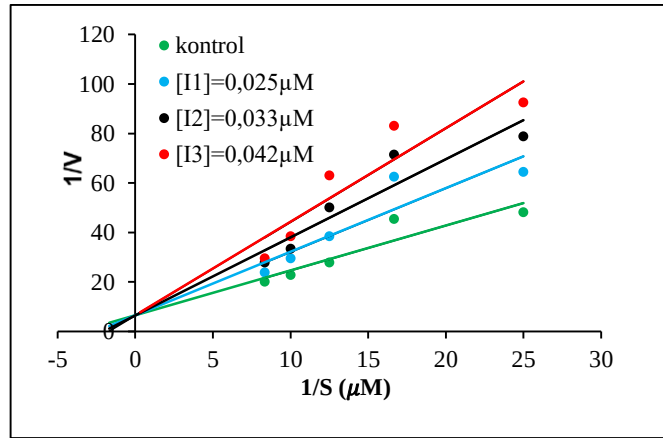
**Şekil 33.** LOX enzimi aktivitesine karşı NiL<sup>2</sup> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



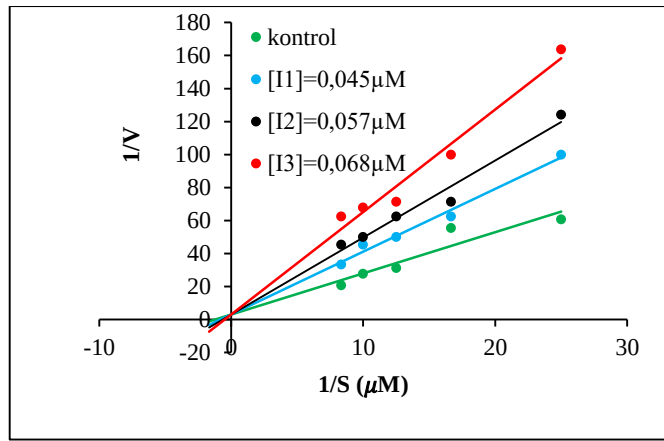
**Şekil 34.** LOX enzimi aktivitesine karşı CoL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



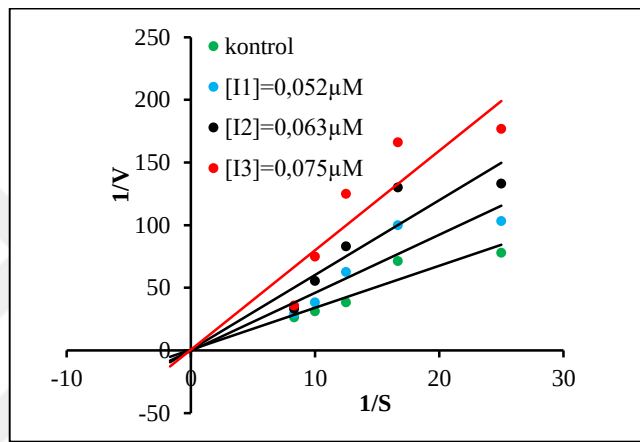
**Şekil 35.** LOX enzimi aktivitesine karşı CdL<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 36.** LOX enzimi aktivitesine karşı UO<sub>2</sub>L<sub>2</sub> bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 37.** LOX enzimi aktivitesine karşı  $ZnL_2$  bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



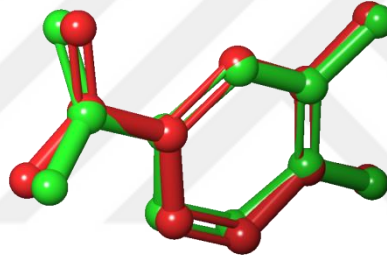
**Şekil 38.** LOX enzimi aktivitesine karşı  $CuL_2$  bileşiğinin inhibitör etkisini gösteren ve  $K_i$  sabitinin tepitinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

**Tablo 9.** LOX Enzimi Aktivitesine karşı Etki Eden Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin  $IC_{50}$  Değerleri ve  $K_i$  Sabitleri

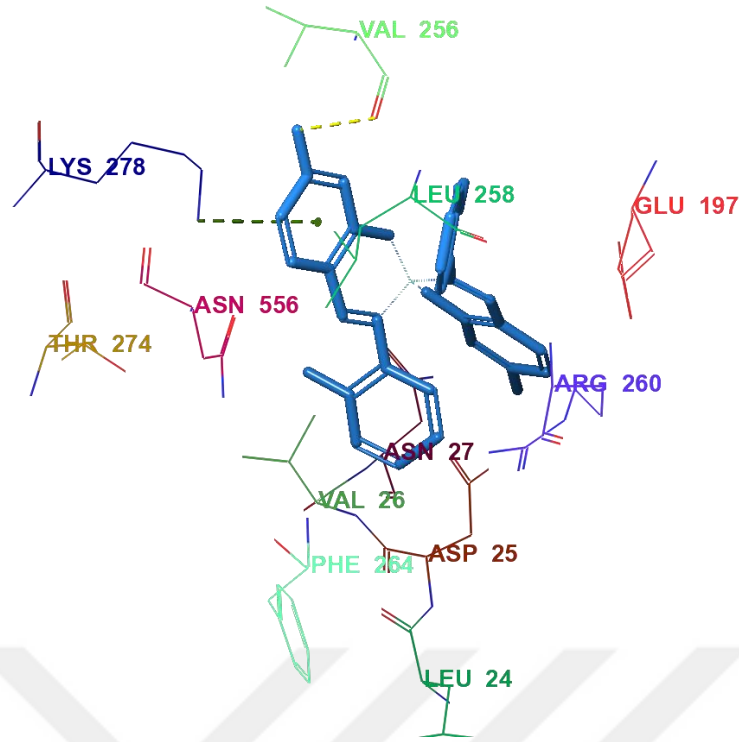
| İnhibitör  | $IC_{50}$<br>( $\mu M$ ) | $R^2$  | $K_i$<br>( $\mu M$ ) | İnhibisyon Tipi |
|------------|--------------------------|--------|----------------------|-----------------|
| HL         | 0,930                    | 0,9826 | $0,858 \pm 0,194$    | Yarışmalı       |
| $CdL_2$    | 0,502                    | 0,9798 | $0,519 \pm 0,014$    | Yarışmalı       |
| $NiL_2$    | 0,253                    | 0,9670 | $0,448 \pm 0,087$    | Yarışmalı       |
| $HL_2$     | 0,317                    | 0,9662 | $0,024 \pm 0,003$    | Yarışmalı       |
| $NiL_2$    | 0,257                    | 0,9850 | $0,014 \pm 0,002$    | Yarışmalı       |
| $CoL_2$    | 0,071                    | 0,9682 | $0,068 \pm 0,014$    | Yarışmalı       |
| $Cu L_2$   | 0,064                    | 0,9676 | $0,091 \pm 0,042$    | Yarışmalı       |
| $Zn L_2$   | 0,058                    | 0,9834 | $0,067 \pm 0,017$    | Yarışmalı       |
| $UO_2 L_2$ | 0,032                    | 0,9873 | $0,047 \pm 0,011$    | Yarışmalı       |
| $Cd L_2$   | 0,043                    | 0,9728 | $0,043 \pm 0,008$    | Yarışmalı       |

### Moleküler kenetleme sonuçları

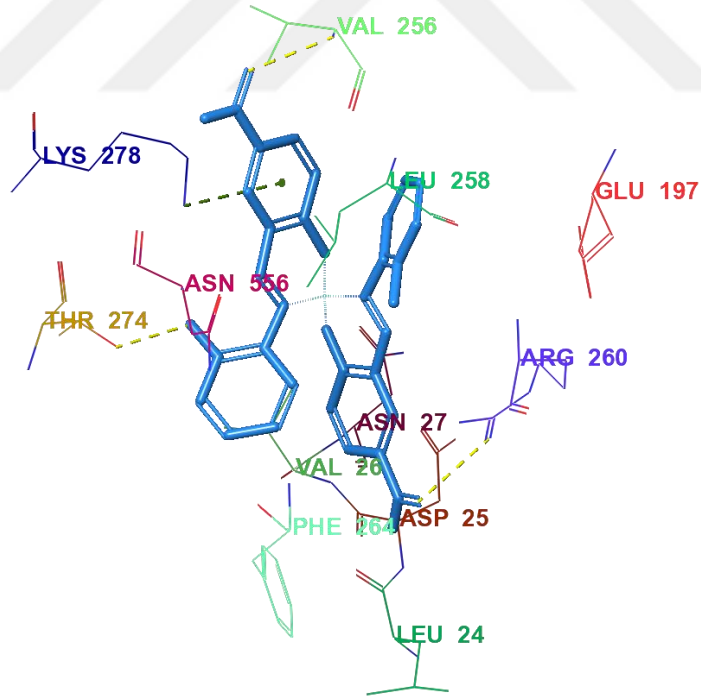
*In vitro* koşullarda inhibisyon etkinliği en güçlü olan  $\text{NiL}^1_2$  ile  $\text{NiL}^2_2$  bileşiklerinin moleküler kenetlenme diyagramları (Şekil 39-41 )sunulmuştur.  $\text{NiL}^1_2$  bileşiğinin hidroksil grubu ile Val206 amino asit kalıntısı arasında 2,00 Å mesafede bir hidrojen bağı ve benzen halkası ile kritik öneme sahip Lys278 amino asit kalıntısı arasında  $\pi$ -katyon etkileşimi meydana gelmiştir.  $\text{NiL}^2_2$  bileşiğinin nitro grupları ile Val206 ve Arg260 amino asit kalıntıları arasında 2,07 Å ve 2,09 Å mesafelerde iki hidrojen bağı ve hidroksil grubu ile Thr274 amino asit kalıntısı arasında 1,82 Å mesafede bir hidrojen bağı oluşmuştur. Ayrıca kritik Lys278 amino asit kalıntısı ile benzen halkası arasında  $\pi$ -katyon etkileşimi tespit edilmiştir. Her iki molekülde Leu24, Val26, Trp148, Tyr150, Val256, Tyr257, Leu258, Ala263, Phe264, Phe272, Tyr275, Leu560 ve Leu563 gibi önemli kalıntılarla hidrofobik etkileşimler sergilemiştir.



**Şekil 39.** Kristal (PDB ID: 1N8Q) içindeki doğal ligand Protokatekuik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit)'in ilk konformasyonu (yeşil) ile kenetlenme sonrası konformasyonunun (kırmızı) üst üste çakıştırılması (RMSD: 0,18 Å).



**Şekil 40.** Moleküler kenetlenme sonucunda  $\text{NiL}^1_2$  - LOX (PDB ID: 1N8Q) etkileşim diyagramı (Hidrojen bağı sarı renkli ve  $\pi$ -katyon etkileşimi yeşil renkli kesik çizgilerle gösterilmiştir).



**Şekil 41.** Moleküler kenetlenme sonucunda elde edilen  $\text{NiL}^2_2$  - LOX (PDB ID: 1N8Q) etkileşim diyagramı (Hidrojen bağı sarı renkli ve  $\pi$ -katyon etkileşimi yeşil renkli kesik çizgilerle gösterilmiştir).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Protein yapısında olan enzimler; hücrede dolayısıyla organizmadaki çoğu reaksiyonun en uygun koşullarda gerçekleşmesini sağlayan hayati moleküllerdir. Enzimlerin aktivitelerini belirlemek ise onların varlığını, lokalizasyonu, saflığını, katalitik mekanizması gibi özelliklerini belirlemenin en önemli yoludur.(Sarı 2006) LOX enzimi; ikiden fazla doymamış bağ içeren yağ asidine oksijen ekleyerek, hidroperoksit oluşturan, yapısında hem olmayan demir bulunduran, birçok hayvan ve bitki dokusunda bulunan, dioksigenazlardır (Lončarić *et al.*2021)

LOX reaksiyonlarının en önemli iki etki mekanizması vardır. Birincisi gıdaların uzun süre saklanmasıda kötü tat ve koku oluşumuna sebep olarak gıdanın özelliklerini etkilemektir.( Manarga Birlik 2014) İkincisi insan vücudunda inflamatuvar reaksiyonların uyarılmasında önemli bir rol oynamaktır. Bundan dolayı enflamasyon, kanser, inme, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok önemli hastalıkla bağlantılıdır (Werz and Steinhilber 2006) LOX'lar, LDL (Düşük dansiteli lipoprotein) oksidasyonlarını indükleyerek aterosklerozun erken evresiyle ilişkilendirilmektedir. LOX ürünü olan yağ asidi peroksitleri ise membran hasarı oluşturup hem hücre hasarı oluşturur (hücre ölümlerini hızlandırma) hemde bitki ve hayvanlarda metabolizmayı düzenleyici rol oynamaktadır (Rådmark and Samuelsson 2007).

Yiyeceklerin üretim ve saklanma koşullarında bozulmalarının en büyük nedenlerinden biri olarak sayılan LOX'lar, ekmek yapımı ve aroma üretiminde kullanılmaktadırlar. Doymamış yağ asitleri ile LOX reaksiyonları kötü tatlar/kötü kokular üretebilir ve gıda bozulmasına neden olabilir. Bu gibi LOX yolunun istenmeyen bileşenleri nedeniyle LOX inhibisyonu ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır (Chedea and Jisaka 2013).

Başka bir yönden bitki kökenli yiyeceklerdeki antioksidan durumunun negatif etkilenmesi durumundanda LOX'lar sorumlu tutulmaktadır. Kullanım alanlarıyla dikkatleri üzerinde toplayan LOX'un saflaştırılması ve inhibisyon özelliklerinin araştırılması, sağlık ve gıda sektörü gibi hayati alanlarda önemli çözümleri oluşturacağını düşünülmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda özellikle protein içeriği yüksek besinsel ve sağlık kullanımı yaygın tahıl benzeri bir bitki olması yönüyle kinoa bitkisinden LOX enzimi saflaştırılarak, schiff bazlarının LOX enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Moleküler kenetleme çalışmasıyla da en iyi inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin bağlanma profilleri belirlendi.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller oldukları için şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar ve bu nedenle bir çözeltideki enzimin varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada LOX enzimi homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve Q-sepharoz anyon değişim kromatografisi kullanılarak üç basamakta saflaştırıldı. Amonyum sülfat çöktürme aralığı (Şekil 12) görüldüğü gibi %20-40 olarak belirlendi. (Tablo 4 )görüldüğü gibi Kinoadan saflaştırılan LOX enzimi 1,48 spesifik aktivite, %7.24 verim ve 77,89 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan LOX enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 97 kDa olarak hesaplandı (Şekil 15 ve şekil 16). Holková *et al.* (2019) afyon haşhaş kallus kültürlerinden LOX enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, Fenil-Sepharose CL-4B kullanılarak hidrofobik kromatografi ve HA Ultrogel sorbent kullanarak hidroksiapatit kromatografisi ile saflaştırmışlardır. SDS-PAGE yöntemi sonucunda LOX'un 83 kDa nispi moleküler ağırlık gösteren tek bir monomerik protein olduğunu ortaya koymuşlardır. Kaliforniya haşhaş fidelerinden elde edilen LOX, %60 amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik kromatografi (Phenyl-Sepharose CL-4B) ve iyon değişim kromatografisi (Q-Sepharose) ile 23.47 EU/mg spesifik aktiviteyle 69 kat saflaştırılmıştır. Molekül kütlesi 85 kDa olarak belirlenmiştir (Kollárová *et al.* 2017). Williams and Harwood (2008) LOX'u *Olea europaea* L. kallus kültürlerinden izole etmişlerdir. Bu deneyde LOX aktivitesinin kaybını önlemek için kültürlerden elde edilen aseton tozu kullanılmıştır. Amonyum sülfatın %60 doygunluğa kadar çökeltilmesi LOX'un 12 kat saflaştırılmasını sağlamıştır. Daha sonra DEAE Sephadex A50 üzerinde iyon değişim kromatografisinden sonra, 48 ve 55 saflaştırma faktörüne sahip iki LOX izoenzimi elde edilmiştir. Vanko *et al.* (2012) LOX'u afyon haşhaş kloroplastlarından 126,10 saflaştırma katsayısı ile iyon değişim kromatografisi ve afinite kromatografisinin bir kombinasyonu ile izole etmiş ve saflaştırmıştır.

Lorenzi *et al.* (2006) diferansiyel santrifüjleme ve hidrofobik kromatografi teknikleriyle LOX enzimini zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) meyvesinden 65 kat saflaştırmışlardır. Aanangi *et al.* (2016) LOX enzimini maş fasulyesinden jel filtrasyon, iyon değişim kromatografisi ve kromatofokuslama gibi kromatografik yöntemleri içeren özel işlem adımlarıyla 27 kat saflaştırarak elde etmişlerdir. Sharma and Chugh (2017) LOX'un iki izoenzimi (LOX 1 ve LOX 2), amonyum sülfat fraksiyonlama, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak inci darı olgun tanelerinden LOX 1 için 56 ve LOX 2 için 40 kat saflaştırma katsayısı ile saflaştırmışlardır. Molekül kütlelerini LOX 1 için

yaklaşık 85 kDa, LOX 2 için 79 kDa olarak belirlemişlerdir. Molodchenkova *et al.* (2016) *Fusarium graminearum* tarafından enfekte edilmiş ve salisilik asit ile muamele edilmiş buğday fidelerinden LOX enzimini; %60 amonyum sülfat-diyaliz, jel-filtrasyon ve iyon-değişim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırmış ve enzimin moleküler kütlesini 90 kDa olarak belirlemişlerdir. Öztürk Kesebir (2022) cevizden LOX enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Sepharose Fast Flow İyon Değiştirme Kolonu kullanılarak 24,29 U/mg spesifik aktivite ile %68 verimle 62,28 kat olarak saflaştırmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışma literatürle kıyaslandığında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kinodan saflaştırılan enzimin karakterizasyon çalışmaları incelendiğinde; optimum pH değeri fosfat tamponunda 5,5 olarak (Şekil 17), optimum iyonik şiddet değeri ise 0,9 M olarak belirlenmiştir (Şekil 18). Al-Hashimi *et al.* (2020) mısırdan elde edilen yerel bir *Aspergillus niger* izolatından saflaştırdıkları LOX enziminin optimum sıcaklığı ve pH'sını sırasıyla 35 °C ve 6,5 olarak bulmuşlardır. Liu *et al.* (2023) kuru uskumrudan elde edilen saflaştırılan LOX enziminin optimum depolama süresi 1-2 gün, sıcaklığı 30 °C ve pH değerini 7,0 olarak belirlemişlerdir. Liburdi *et al.* (2021) yeşil bezelye (*Pisum sativum* L.), kuru bezelye (*Pisum sativum* L.) ve mercimekten (*Lens culinaris*) elde ettikleri LOX'un en yüksek aktivite değerlerini pH 6,0-7,0 aralığında ölçmüşlerdir. Tüm ekstraktlar için optimum sıcaklık, baklagillerin besinsel önemi göz önüne alındığında 30-60°C aralığına görülmüştür. Kaliforniya haşhaşından saflaştırılan LOX'un aktivitesi için 6,5 pH'ın en uygun pH olduğu belirlenmiştir (Kollárová *et al.* 2017). Soya fasulyesi LOX-1'in optimum pH değeri 9,0 ve LOX-2 izoformunun optimum pH değeri 6,5 olarak bulunmuştur (Sheu and Chen, 1991). Bu yapılan çalışmaların dışında, yeşil bezelyede LOX için optimum pH 6.0 (Gökmen *et al.* 2002), farklı acı bakla türlerinde (*Lupinus albus* ve *Lupinus angustifolius*) optimum pH' 6.0 (Yoshie-Stark *et al.* 2004), yulafta optimum pH 4.5 (Yi *et al.* 2005), muzda optimum pH 6.2 (Kuo *et al.* 2006), maş fasulyesinde optimum pH 6.5 (Aanangi *et al.* 2016), haşhaş fidelerinde (*Papaver somniferum* L.) optimum pH 6.5 (Holkova *et al.* 2016) olarak bildirmişlerdir. Görüldüğü gibi bitkilerden izole edilen LOX enzimi için optimum pH değerleri 4.5 ile 8.0 arasında değişmektedir. Yaptığımız bu çalışmada bulunan optimum pH değeri literatürle uyumluluk göstermektedir.

LOX enziminin reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerinin çoğu, gıdaların uzun süreli saklanmasıyla doymamış yağ asitleri üzerinde etki ederek kötü tat/koku oluşumuna neden olmaktadır. LOX, araşidonik asit metabolizmasının lökotriene dönüşmesi sürecinde bir tür hız sınırlayıcı enzimdir ve inflamasyon oluşumuna aracılık eder. LOX'un inhibisyonu lökotrienleri azaltabilir ve böylece bir anti-enflamatuar etki üretebilir. Bunun yanında insanda eksprese olan LOX enzimleri kanser, inme, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkla ilişkilidir (Hu and Ma, 2017). Bu nedenlerden dolayı günümüzde LOX enzimi üzerine gerçekleştirilen inhisyon çalışmaları büyük önem arz etmektedir.

Schiff bazları, primer aminlerin karbonil grupları ile kondensasyonundan sentezlenirler. Azometin grubunun özelliklerinden dolayı Schiff bazı ligandları çeşitli metal iyonlarına kolayca koordine edilebilir. Ayrıca, substratın bir amino veya karbonil grubu ile proteinin bağlanmasını içeren bazı enzimatik reaksiyonlarda, Schiff bazları önemli ara ürünlerdir (Shahraki, 2022). Schiff bazlarının antikanser (Luo *et al.* 2017), antibakteriyel (Dhahagani *et al.* 2014), antifungal (Kakanejadifard *et al.* 2018) ve antioksidan (Shah *et al.* 2020) özellikleri de dahil olmak üzere biyolojik aktiviteleri üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir.

Schiff baz ligandları, yüksek şelatlama özelliklerinden dolayı geçiş metal iyonları ile koordinasyon kompleksleri oluşturur. Özellikle, Schiff baz ligandları kataliz, elektrokimya ve esas olarak tıbbi kimyada potansiyel terapötik ajanlar olarak sınırsız uygulamalara sahiptir (Gonul *et al.* 2016). Metal iyonlarının ve ligandların doğası, geçiş metali komplekslerinin tıbbi özelliklerini etkiler (Hasi *et al.* 2016). Koordinasyon kimyasının gelişmesi önemli ölçüde Schiff bazlarının geçiş metal kompleksleri üzerine yapılan araştırmalara bağlıdır.

Bu tez kapsamında sentezlenmiş schiff bazlarının saflaştırılan LOX enzimi üzerine etkileride incelenmiştir. Çalışmamızda HL ve HL<sub>2</sub> olarak iki farklı ligand kullanılmış ve bunların metal kompleksleri sentezlenmiştir. LOX enzimi üzerine schiff bazlarının K<sub>i</sub> değerlerinin etkisi sıralandığında NiL<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,014 ± 0,002 µM) > HL<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,024 ± 0,003 µM) > Cd L<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,043 ± 0,008 µM) > UO<sub>2</sub> L<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,047±0,011 µM) > Zn L<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,067±0,017 µM) > CoL<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,068 ± 0,014 µM) > Cu L<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,091±0,042 µM) > NiL<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,448 ± 0,087 µM) > CdL<sub>2</sub> (K<sub>i</sub>: 0,519 ± 0,014 µM) > HL (K<sub>i</sub>: 0,858 ± 0,194 µM) şeklinde olmaktadır (Tablo 9). HL ligandının metal komplekslerinde nikel ve kadmiyum dışında diğer metallerde inhibisyon etkisine rastlanmamıştır. Çalışılan bütün bileşikler yarışmalı inhibisyon sergilemiştir (Şekil 29-38 ) Sonuçlara bakıldığında LOX enzimi üzerine en iyi inhibitör olma özelliğini NiL<sub>2</sub> bileşiği göstermiştir (Şekil 33). İki farklı ligantda nikel kompleksi LOX enzimini diğer metallere oranla daha fazla inhibe etmiştir. Çinko ve bakır

kompleksinin kullanılması enzim inhibisyonunda çok fazla değişim göstermemiştir. Kadmiyum  $HL_2$  kompleksi bakır kompleksine göre yaklaşık 2 kat daha fazla inhibisyon etkisi sergilemiştir.

Schiff bazlarının LOX etkinliğinin incelenmesinin dışında bu tez çalışmasında moleküler kenetleme çalışmaları da yapılmıştır. *In vitro* koşullarda inhibisyon etkinliği en güçlü olan  $NiL_2$  ile  $NiL_2$  bileşiklerinin moleküler kenetlenme diyagramları Şekil 39- 41'de sunulmuştur (Center Grid Box: 20,952 x 1,758 x 18,895 Å).  $NiL_2$  bileşiğinin hidroksil grubu ile Val256 amino asit kalıntısı arasında 2,00 Å mesafede bir hidrojen bağı ve benzen halkası ile kritik öneme sahip Lys278 amino asit kalıntısı arasında  $\pi$ -katyon etkileşimi meydana gelmiştir (Kenetlenme skoru: -6,38 kcal/mol).  $NiL_2$  bileşiğinin nitro grupları ile Val256 ve Arg260 amino asit kalıntıları arasında 2,07 Å ve 2,09 Å mesafelerde iki hidrojen bağı ve hidroksil grubu ile Thr274 amino asit kalıntısı arasında 1,82 Å mesafede bir hidrojen bağı oluşmuştur. Ayrıca kritik Lys278 amino asit kalıntısı ile benzen halkası arasında  $\pi$ -katyon etkileşimi tespit edilmiştir (Kenetlenme skoru: -4,54 kcal/mol). Her iki molekülde Leu24, Val26, Trp148, Tyr150, Val256, Tyr257, Leu258, Ala263, Phe264, Phe272, Tyr275, Leu560 ve Leu563 gibi önemli kalıntılarla hidrofobik etkileşimler sergilemiştir.

Literatürde LOX enziminin inhibisyonu ve moleküler kenetleme üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Öztürk Kesebir (2022) Morin hidrat, *p*-kumarik asit, siringaldehit ve vanilik asidin LOX'u inhibe ettiğini ve  $IC_{50}$  değerlerinin sırasıyla 304  $\mu M$ , 233  $\mu M$ , 643,2  $\mu M$  ve 218,1  $\mu M$  olduğunu göstermiştir. Yashaswini *et al.* (2017) sesamolün, soya LOX-1 enzimini 51,84  $\mu M$   $IC_{50}$  değeri ve 4,9  $\mu M$   $K_i$  ile doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Khan *et al.* (2015) *Polygonatum verticillatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının LOX, üreaz, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine karşı inhibitör profilini standart deneysel protokoller kullanarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda LOX enzimine karşı ekstraktlar önemli ölçüde etki göstermiştir. Fazal-Ur-Rehman *et al.* (2019) aminlerin bazik ortamda oksalil klorür ile reaksiyonu sonucu bir dizi oksamid ligandı sentezlenmişlerdir. Sentezlenen oksamidlerin karakterizasyonu için IR,  $^1H$ -NMR ve ESI-MS teknikleri gibi spektroskopik ve analitik teknikler kullanılmıştır. Sentezlenen oksamidler LOX enzimi inhibisyonu için taranmıştır. Biyolojik tarama, oksamidlerin iyi LOX inhibisyon etkisi gösterdiğini ortaya koyarken, ikame edilmemiş oksamidlerin herhangi bir belirgin LOX inhibisyonu göstermemiştir. Ayrıca bu çalışmada LOX inhibisyonu için oksamidlerin moleküler kenetlenme çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Moleküler kenetlenmeden elde edilen sonuçlar ampirik verilerle iyi korelasyon göstermiştir. Santha and Vishwanathan (2022) *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen redoks-aktif bir fenazin pigmenti olan piyosiyanınin, 5-LOX

enzimini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu mekanizmayı karakterize etmek amacıyla, moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiş ve moleküler mekanik Poisson-Boltzmann yüzey alanı (MMPBSA) bağlanma enerjisi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları, piyosiyanın 5-LOX'un aktif bölgesinde dinamik olarak kararlı olduğunu ve MMPBSA bağlanma enerjisinin (-84.720 kJ/mol) 5-LOX standart inhibitörü zileuton (-72.729 kJ/mol) ile karşılaştırılabilir olduğunu ortaya koymuştur.

Haroun *et al.* (2022) anti-enflamatuar etki mekanizması olarak LOX inhibitör aktivitesine sahip bir dizi benzotiyazol bazlı tiyazolidinon etkisi üzerine çalışma yapmışlardır. Anti-inflamatuar aktiviteyi belirlemek için karragenan ile indüklenen fare ayak pençesi ödem deneyi gerçekleştirilirken, LOX inhibisyonu sodyum linoleatın 13-hidroperoksilinoleik aside dönüştürülmesi yoluyla incelenmiştir. 3 numaralı bileşiğin en güçlü inhibitör olduğu (%69,57) ve referans ilaç indometasinden (%47) daha aktif olduğu bulunmuştur. Moleküler kenetleme çalışmalarıyla bileşiklerin LOX enzimine bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Abdelkhalek *et al.* (2023) yeni bir tiyeno [2,3-d] pirimidin türevleri serisini anti-inflamatuar özelliklere sahip hem 15-LOX hem de COX-2 enzimlerine karşı çoklu hedefe yönelik ligandlar geliştirmek amacıyla Gewald koşulu altında sikloheksanondan başlayarak tasarlanmış ve sentezlenmişlerdir. Bileşik **60**, referans nordihidroguaiaretik asitten (NDGA,  $IC_{50} = 1,28 \mu M$ ) daha etkili 15-LOX inhibisyonu sergilemiştir ( $IC_{50} = 1,17 \mu M$ ). Ayrıca, 15-LOX ve COX-2 aktif bölgelerine bağlanan bileşikler için yapılan moleküler kenetleme çalışmaları biyolojik değerlendirmelerle iyi bir uyum göstermiştir. Alavi *et al.* (2021) bu çalışmada, bir dizi mono- ve dialilfenol türevi tasarlanmış, sentezlenmiş ve potansiyel 15-hLOX-1 inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir. Alil parçasının ve para sübstituentlerinin elektronik doğalarının, radikal süpürme aktivitesinde ve ardından sentetik inhibitörlerin LOX inhibisyon potansiyelinde ana rol oynadığı bulunmuştur. Sentetik bileşikler arasında, 2,6-diallil-4-(heksiloksi)fenol ( $IC_{50} = 0,88 \mu M$ ) ve 2,6-diallil-4-aminofenol ( $IC_{50} = 0,80 \mu M$ ) LOX inhibisyonu için en iyi sonuçları göstermiştir.

Flores *et al.* (2020) 5-LOX'un organometalik inhibitörleri ile ilgili olarak,  $0,87 \mu M$   $IC_{50}$  ile 5-LOX'a karşı güçlü bir inhibisyon sunan bir tiyazol heterosiklik ara parçası ile bağlanmış katekol parçaları ile işlevselleştirilmiş ferrosenil türevlerinin ticari ilaç zileuton ( $IC_{50} = 0,92 \mu M$ ) ile karşılaştırılabilir ilk örneklerini bildirmiştir. *In-silico*, *in-vitro* ve elektrokimyasal çalışmalar sayesinde, bu inhibitör gücü kooperatif bir redoks mekanizmasıyla (katalitik demirin inaktif Fe(II) durumuna indirgenmesi) ilişkilendirmek mümkün olmuştur. Ek olarak, yapılan başka bir çalışmada ferrosen ve ferrosenil öncüllerinin (aldehit, karboksilik asit ve amin) 5-LOX inhibisyonu üzerindeki son çalışmaları, sadece karboksilik asit

kompleksinin 2,5  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  ile karışık bir inhibisyona sahip olduğunu göstermiş ve 5-LOX'un hem organometalik hem de inhibitör farmakofor parçalarının varlığının enzim inhibisyonunda kooperatif bir rol oynadığı sonucuna varmıştır (Munˆoz-Osses *et al.* 2021). Georgiou *et al.* (2023) 4,6-difenil-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-tiyon (KKII5 olarak kısaltılmıştır) ve (E)-N'-benzilidenehidrazinkarbothiohidrazid (DKI5 olarak kısaltılmıştır) bileşiklerinin olası ilaç ˆncˆleri olarak potansiyeli araştırmışlardır. Yapıları, LOX-1 enziminin aktif bölgesine bağlanmaları ve toksisiteleri ortak deneysel ve hesaplamalı metodolojilerle incelenmiştir. LOX-1'in aktif bölgesinde dihidropirimidinetiyon KKII5 için en güçlü bağlanma enerjisi -9.60 kcal/mol olarak gözlenmiştir. ADMET hesaplamaları, iki molekülün önemli toksisiteleri olmadığını ve olası ilaç ˆncˆleri olarak hizmet edebileceğini göstermiştir. KKII5 bileşiğı için LOX enzimi üzerine  $\text{IC}_{50}$  değeri 19  $\mu\text{M}$  olarak bulunurken DKI5 bileşiğı için 22, 5  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Navarrete *et al.* (2023) 5-LOX inhibitörü olarak kateşol (( $\eta^5$ -(E)- $\text{C}_5\text{H}_4\text{-NCH-3,4-benzodiol}$ ) $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)$  (**3a**)) ve vanilin (( $\eta^5$ -(E)- $\text{C}_5\text{H}_4\text{-NCH-3-metoksi-4-fenol}$ ) $\text{Fe}(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)$  (**3b**)) ile işlevselleştirilmiş iki ferrosenil Schiff bazı kompleksi elde etmişlerdir. Kompleksler **3a** ve **3b**, organik analogları (**2a** ve **2b**) ve bilinen ticari inhibitörlerle karşılaştırıldığında 5-LOX inhibitörleri olarak  $\text{IC}_{50}$  = (**3a**) için  $0,17 \pm 0,05 \mu\text{M}$  ve (**3b**) için  $0,73 \pm 0,06 \mu\text{M}$  olarak etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

## Öneriler

Çalışmamızda kullanılan schiff bazları metal komplekslerinin; kolay sentezlenebilir olmaları, ucuz olmaları, iyi inhibitör özelliği sergilemeleri, kimyasal ve termal kararlılıklarının yüksek olması nedeniyle LOX ilişkili önemli hastalıklarda (inflamasyon ve kanser gibi) inhibitörük etkisinden faydalanılabilir. Yukarıda belirtilenlere dayanarak, uygun ligand ve komplekslerin seçimi LOX inhibisyonunda önemli rol oynadığı açıktır. Bazı metal kompleksleri iyi derecede inhibitör etkisi gösterirken, diğerleri LOX inhibisyonunda zayıf etkili görünmektedir. Bu nedenle, çok sayıdaki kimyasal bileşik yanında en yeni, en belirgin LOX inhibitörlerini bulma konusunda boşlukları doldurmak için çok fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Aanangi, R., Kotapati, K. V., Palaka, B. K., Kedam, T., Kanika, N. D., & Ampasala, D. R. (2016). Purification and characterization of lipoxygenase from mung bean (*Vigna radiata* L.) germinating seedlings. *3 Biotech*, 6, 1-8.
- Abdelkhalek, A. S., Kothayer, H., Rezq, S., Orabi, K. Y., Romero, D. G., & El-Sabbagh, O. I. (2023). Synthesis of new multitarget-directed ligands containing thienopyrimidine nucleus for inhibition of 15-lipoxygenase, cyclooxygenases, and pro-inflammatory cytokines. *European journal of medicinal chemistry*, 256, 115443.
- Afagnigni, A. D., Nyegue, M. A., Djova, S. V., & Etoa, F. X. (2020). LC-MS Analysis, 15-Lipoxygenase Inhibition, Cytotoxicity, and Genotoxicity of *Dioscorea multiflora* (Sm) Triana (Melastomataceae) and *Paullinia pinnata* Linn (Sapindaceae). *Journal of tropical medicine*, 2020, 5169847.
- Alam, F., & Ashraf, M., 2019. Phenolic contents, elemental analysis, antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of *Zanthoxylum armatum* DC fruit, leaves and bark extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(4).
- Alavi, S. J., Seyedi, S. M., Saberi, S., Safdari, H., Eshghi, H., & Sadeghian, H. (2021). Allylphenols as a new class of human 15-lipoxygenase-1 inhibitors. *Drug development research*, 82(2), 259–266.
- AL-Hashimi, A. G., AL-Asady, A. K., & AL-Temime, N. T. (2020). Extraction, Purification and Characterization of Lipoxygenase From *Aspergillus Niger*. *Biochemical & Cellular Archives*, 20(1), 1685-1692.
- Altaş, N.A., 2013. Bazı Bitkilerde Pullulanaz Aktivitesinin Araştırılması, Pullulana Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu, Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Anonymous, 2023 [https://en.wikipedia.org/wiki/Lipoxygenase#cite\\_note-renamed\\_from\\_17847087\\_on\\_20160311071109-1](https://en.wikipedia.org/wiki/Lipoxygenase#cite_note-renamed_from_17847087_on_20160311071109-1) (08.07.2023)
- Apalowo, O. E., Adekola, M. B., Asaolu, F. T., Oriyomi, O. V., Ogunleye, G. S., Areola, J. O., & Babalola, O. O. (2019). GC-MS analysis and inhibitory effect of *Kigelia africana* Leaf extract and fractions on 5-lipoxygenase. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 625-628.
- Arens, D., Seilmeier, W., Weber, F., Kloos, G., Grosch, W., 1973. Purification and properties of a carotene co-oxidizing lipoxygenase from peas. *Biochim. Biophys. Acta* 327:295-305
- Ashour, M. L., Youssef, F. S., Gad, H. A., El-Readi, M. Z., Bouzabata, A., Abuzeid, R. M., & Wink, M. , 2018. Evidence for the anti-inflammatory activity of *Bupleurum marginatum* (Apiaceae) extracts using in vitro and in vivo experiments supported by virtual screening. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(7), 952-963.
- Avelia, S., Mauldina, M. G., & Elya, B., 2017. Antioxidant activity and lipoxygenase inhibitory assay with total flavonoid content of *Garcinia lateriflora* Blume leaves extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(Special Issue October), 163-165.

- Babatunde, J. O., & Kayode, O. K. (2019). Inhibitory action of dried leaf of *Cassia alata* (Linn.) Roxb against lipoxygenase activity and nitric oxide generation. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 185-190.
- Barone, R., Briante, R., D'auria, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Guidice, I.d., Borelli, g.m., Fonzo, N.D., Nucci, R., 1990. Purification and Characterization of Lipoxygenase Enzyme from Durum Wheat. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47:1924-1931
- Baysal, T. and Demirdöven, A., 2007, Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 491-496pp
- Ben-Nasr, S., Aazza, S., & Mnif, W. Miguel MdGC (2015). Antioxidant and anti-lipoxygenase activities of extracts from different parts of *Lavatera cretica* L. grown in Algarve (Portugal). *Pharmacogn. Mag*, 11, 41-48.
- Borbulevych, O. Y., Jankun, J., Selman, S. H., & Skrzypczak-Jankun, E. (2004). Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, 54(1), 13-19
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Braidot, E., Petrucci, E., Micolini, S., Tubaro, F., Vianello, A., & Macrì, F., 2004. Biochemical and immunochemical evidences for the presence of lipoxygenase in plant mitochondria. *Journal of experimental botany*, 55(403), 1655-1662.
- Brash, A. R., & Ingram, C. D., 1986. Lipoxygenase metabolism of endogenous and exogenous arachidonate in leukocytes: GC-MS analyses of incubations in H218O buffers. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 23(2-3), 149-154.
- Chedea, V. S., & Jisaka, M. (2013). Lipoxygenase and carotenoids: A co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology*, 12(20).
- CS, S., KG, A., & V, V., 2018. Designing of enzyme inhibitors based on active site specificity: lessons from methyl gallate and its lipoxygenase inhibitory profile. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 38(3), 256-265.
- Dağ, Ş. RO ve Özkan, AMG (2019). Kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) üzerine bir çekim. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 43 (3), 309-333.
- Demir, Y., & Beydemir, Ş. (2015). Purification, refolding, and characterization of recombinant human paraoxonase-1. *Turkish journal of chemistry*, 39(4), 764-776.
- Dhahagani, K., Mathan Kumar, S., Chakkaravarthi, G., Anitha, K., Rajesh, J., Ramu, A., & Rajagopal, G. (2014). Synthesis and spectral characterization of Schiff base complexes of Cu(II), Co(II), Zn(II) and VO(IV) containing 4-(4-aminophenyl)morpholine derivatives: antimicrobial evaluation and anticancer studies. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 117, 87-94.
- Dilshad, M., Riaz, N., Saleem, M., Shafiq, N., Ashraf, M., Ismail, T., Rafiq, H. M., & Jabbar, A. (2016). New lipoxygenase and cholinesterase inhibitory sphingolipids from *Carthamus oxyacantha*. *Natural product research*, 30(16), 1787-1795.
- Eshwarappa, R. S. B., Ramachandra, Y. L., Subaramaihha, S. R., Subbaiah, S. G. P., Austin, R. S., & Dhananjaya, B. L., 2016. Anti-Lipoxygenase activity of leaf gall extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Research*, 8(1), 78.

- Evans, J. F., Ferguson, A. D., Mosley, R. T., & Hutchinson, J. H., 2008. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 29(2), 72-78.
- Fazal-ur-Rehman, S., Wasim, A. A., Iqbal, S., Khan, M. A., Lateef, M., & Iqbal, L. (2019). Synthesis, lipoxygenase inhibition activity and molecular docking of oxamide derivative. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(3), 1253-1259.
- Feussner, I., Kühn, H., & Wasternack, C., 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in plant science*, 6(6), 268-273.
- Flores, E., Muñoz-Osses, M., Torrent, C., Vásquez-Martínez, Y., Gómez, A., Cortez-San Martín, M., ... & Mascayano, C. (2020). Design, Synthesis and Biological Evaluation of Ferrocenyl Thiazole and Thiazolo [5, 4-d] thiazole Catechols as Inhibitors of 5-hLOX and as Antibacterials against *Staphylococcus aureus*. *Structural Relationship and Computational Studies. Organometallics*, 39(14), 2672-2681.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., ... & Shenkin, P. S., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1739-1749.
- Georgiou, N., Chontzopoulou, E., Cheilari, A., Katsogiannou, A., Karta, D., Vavougyiou, K., Hadjipavlou-Litina, D., Javornik, U., Plavec, J., Tzeli, D., Vassiliou, S., & Mavromoustakos, T. (2023). Thiocarbohydrazone and Chalcone-Derived 3,4-Dihydropyrimidinethione as Lipid Peroxidation and Soybean Lipoxygenase Inhibitors. *ACS omega*, 8(13), 11966–11977.
- Gonul, M., Kose, G., & Ceyhan, S. (2016). Serin, Methoxy group containing bidentate Schiff base ligands and their transition metal complexes: synthesis, structural characterisation, photoluminescence, antioxidant capacity and superoxide dismutase activity studies. *Inorganica Chimica Acta*, 453, 522–530.
- Gökmen, V., Bahçeci, S., & Acar, J. (2002). Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research and Technology*, 215, 42-45.
- Hacıoğlu, C., 2011, *2-Amino-5-Merkapto-1,3,4-Tiyadiazol*'ün Çeşitli aldehitlerle kondenzasyonu İle Yeni Schiff Bazlarının Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul
- Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7), 1750-1759.
- Halgren, T. A., 2009. Identifying applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. *J. Chem. Inf. Model*, 49, 377-389.
- Haroun, M., Petrou, A., Tratat, C., Kositsi, K., Gavalas, A., Geronikaki, A., Venugopala, K. N., & Harsha, N. S. (2022). Discovery of benzothiazole-based thiazolidinones as potential anti-inflammatory agents: anti-inflammatory activity, soybean lipoxygenase inhibition effect and molecular docking studies. *SAR and QSAR in environmental research*, 33(6), 485–497.
- Hasi, Q.M., Fan, Y., Yao, X. Q., Hu, D. C., & Liu, J. C. (2016). Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of a bidentate Schiff base ligand and its metal complexes. *Polyhedron*, 109, 75–78.

- Holkova, I., Bilka, F., Rauova, D., & Bezakova, L. (2016). Purification and properties of lipoxygenase from opium poppy seedlings (*Papaver somniferum* L.). *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 772-780.
- Holková, I., Rauová, D., Mergová, M., Bezáková, L., & Mikuš, P. (2019). Purification and product characterization of lipoxygenase from opium poppy cultures (*Papaver somniferum* L.). *Molecules*, 24(23), 4268.
- Hu, C., & Ma, S. (2017). Recent development of lipoxygenase inhibitors as anti-inflammatory agents. *MedChemComm*, 9(2), 212–225.
- Jacobson, M. P., Pincus, D. L., Rapp, C. S., Day, T. J., Honig, B., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2004). A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(2), 351-367.
- Kakanejadifard, A., Khojasteh, V., Zabardasti, A., & Azarbani, F. (2018). New azo-schiff base ligand capped silver and cadmium sulfide nanoparticles preparation, characterization, antibacterial and antifungal activities. *Organic Chemistry Research*, 4(2), 210-226.
- Kaya S.,2021. Schiff baz metal komplekslerinin hesapsalkarakterizasyonu ve antikanser-antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas
- Keha, E. ve Küvrevioğlu Ö.İ., 2022. Biyokimya. Aktif yayınları, 97-125, Erzurum
- Khan, H., Saeed, M., Muhammad, N., Gaffar, R., Gul, F., & Raziq, N. (2015). Lipoxygenase and urease inhibition of the aerial parts of the *Polygonatum verticillatum*. *Toxicology and Industrial Health*, 31(8), 758-763.
- Kohoude, M. J., Gbaguidi, F., Agbani, P., Ayedoun, M. A., Cazaux, S., & Bouajila, J.,2017. Chemical composition and biological activities of extracts and essential oil of *Boswellia dalzielii* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 33-42.
- Kollárová, R., Holková, I., Rauová, D., Bálintová, B., Mikuš, P., & Obložinský, M. (2017). HPLC Analysis and Biochemical Characterization of LOX from *Eschscholtzia californica* Cham. *Molecules*, 22(11), 1899.
- Kuhn, H., Banthiya, S., & Van Leyen, K.,2015. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 308-330.
- Kuo, J. M., Hwang, A., Yeh, D. B., Pan, M. H., Tsai, M. L., & Pan, B. S. ,2006.Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 3151-3156.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lampi, A. M., Yang, Z., Mustonen, O., & Piironen, V. (2020). Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models. *Food chemistry*, 311, 125982.
- Liburdi, K., Esti, M., Petroselli, V., Mandler-Drienyovszki, N., Radicetti, E., & Mancinelli, R. (2021). Catalytic properties of lipoxygenase extracted from different varieties of *Pisum sativum* and *Lens culinaris*. *Journal of food biochemistry*, 45(2), e13617.
- Liu, Q., Lei, M., Zhao, W., Li, X., Zeng, X., & Bai, W. (2023). Formation of Lipid-Derived Flavors in Dry-Cured Mackerel (*Scomberomorus niphonius*) via Simulation of Autoxidation and Lipoxygenase-Induced Fatty Acid Oxidation. *Foods*, 12(13), 2504.

- Lončarić, M., Strelec, I., Moslavac, T., Šubarić, D., Pavić, V., & Molnar, M. (2021). Lipoxygenase inhibition by plant extracts. *Biomolecules*, 11(2), 152.
- Lorenzi, V., Maury, J., Casanova, J., & Berti, L. (2006). Purification, product characterization and kinetic properties of lipoxygenase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(7-9), 450-454.
- Lu, C., Wu, C., Ghoreishi, D., Chen, W., Wang, L., Damm, W., Ross, G. A., Dahlgren, M. K., Russell, E., Von Bargen, C. D., Abel, R., Friesner, R. A., & Harder, E. D. (2021). OPLS4: Improving Force Field Accuracy on Challenging Regimes of Chemical Space. *Journal of chemical theory and computation*, 17(7), 4291–4300.
- Luo, H., Xia, Y. F., Sun, B. F., Huang, L. R., Wang, X. H., Lou, H. Y., Zhu, X. H., Pan, W. D., & Zhang, X. D. (2017). Synthesis and Evaluation of In Vitro Antibacterial and Antitumor Activities of Novel N,N-Disubstituted Schiff Bases. *Biochemistry research international*, 2017, 6257240.
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W., 2013. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27, 221-234.
- Mahesha, H. G., Singh, S. A., & Rao, A. A., 2007. Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: Evidence of isoflavones as redox inhibitors. 176-185.
- Manarga Birlik, P., 2014. Dondurulmuş Bezelye Ve Taze Fasulye Üretiminde Peroksidaz Ve Lipoksigenaz Enzimlerinin Haşlama Ve Depolama Sırasındaki Değişimleri. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi İzmir.
- Mantzanidou, M., Pontiki, E., & Hadjipavlou-Litina, D. (2021). Pyrazoles and Pyrazolines as Anti-Inflammatory Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(11), 3439.
- Marlin, S., & Elya, B. (2017). Antioxidant Activity and Lipoxygenase Enzyme Inhibition Assay with Total Flavonoid Content from *Garcinia hombroniana* Pierre Leaves. *Pharmacognosy Journal*, 9(2).
- Molodchenkova, O. O., Adamovskaya, V. G., Ciselskaya, L. Y., Bezkrovnaya, L. Y., Kartuzova, T. V., & Iablonska, V. B. (2016). Purification and properties of lipoxygenase from wheat seedlings infected by *Fusarium graminearum* and treated by salicylic acid.
- Muñoz-Osses, M., Quiroz, J., Vásquez-Martínez, Y., Flores, E., Navarrete, E., Godoy, F., ... & Mascayano, C. (2021). Evaluation of cyrhetrenyl and ferrocenyl precursors as 5-lipoxygenase inhibitors—biological and computational studies. *New Journal of Chemistry*, 45(30), 13360-13368.
- Navarrete, E., Morales, P., Muñoz-Osses, M., Vásquez-Martínez, Y., Godoy, F., Maldonado, T., Martí, A. A., Flores, E., & Mascayano, C. (2023). Evaluating the inhibitory activity of ferrocenyl Schiff bases derivatives on 5-lipoxygenase: Computational and biological studies. *Journal of inorganic biochemistry*, 245, 112233.
- Ogorodnikova, A. V., Mukhitova, F. K., & Grechkin, A. N. (2015). Oxylipins in the spikemoss *Selaginella martensii*: Detection of divinyl ethers, 12-oxophytodienoic acid and related cyclopentenones. *Phytochemistry*, 118, 42–50.
- Omar, M. N. B., Hamilton, R. J., & Moynihan, H. A. (2003). Stereoselective preparations of epoxy-, fluoro- and related derivatives of ricinoleic acid and 13 (S)-hydroxyoctadeca-9 (Z), 11 (E)-dienoic acid. *Arkivoc*, 7, 190-199.

- Öztürk Kesebir, A. (2022). Purification and Characterization of Lipxygenase from Walnuts (*Juglans Regia*) and Investigation of the Effects of Some Phenolic Compounds on the Activity. *ChemistrySelect*, 7(46), e202203961.
- Padilla, M. N., Hernández, M. L., Sanz, C., & Martínez-Rivas, J. M. (2014). Stress-dependent regulation of 13-lipxygenases and 13-hydroperoxide lyase in olive fruit mesocarp. *Phytochemistry*, 102, 80–88.
- Pérez-Gilabert, M., Sánchez-Felipe, I., & García-Carmona, F. (2005). Purification and partial characterization of lipxygenase from desert truffle (*Terfezia clavaryi* Chatin) ascocarps. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3666-3671.
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, 130(1), 15–21.
- Putri, N. L., Elya, B., & Puspitasari, N., 2017. Antioxidant activity and lipxygenase inhibition test with total flavonoid content from *Garcinia kydia* Roxburgh leaves extract. *Pharmacognosy Journal*, 9(2).
- Raczuk, E., Dmochowska, B., Samaszko-Fiertek, J., & Madaj, J. (2022). Different Schiff bases—structure, importance and classification. *Molecules*, 27(3), 787.
- Rådmark, O., & Samuelsson, B. (2007). 5-lipxygenase: regulation and possible involvement in atherosclerosis. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 83(3), 162-174.
- Roussaki, M., Zelianaios, K., Kavetsou, E., Hamilakis, S., Hadjipavlou-Litina, D., Kontogiorgis, C., Liargkova, T., & Detsi, A. (2014). Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipxygenase (LOX) inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(23), 6586–6594.
- Santha, S. S. R., & Vishwanathan, A. S. (2022). Mechanistic insights into 5-lipxygenase inhibition by pyocyanin: a molecular docking and molecular dynamics study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(20), 9752-9760.
- Sarı, O. 2006., Bezelye (*pisum sativum*)’den LOX Enziminin Saflaştırılması Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi Adana.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.S.
- Sekhar, S., Sampath-Kumara, K. K., Niranjana, S. R., & Prakash, H. S. (2013). In vitro antioxidant activity, lipxygenase, cyclooxygenase-2 inhibition and DNA protection properties of Memecylon species. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(Suppl 2), 257-62.
- Shah, S. S., Shah, D., Khan, I., Ahmad, S., Ali, U., & Rahman, A. (2020). Synthesis and antioxidant activities of Schiff bases and their complexes: An updated review. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 10, 6936-6963.
- Shahraki S. (2022). Schiff base compounds as artificial metalloenzymes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 218, 112727.
- Sharma, B., & Chugh, L. K. (2017). Two isoforms of lipxygenase from mature grains of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]: Purification and physico-chemico-kinetic characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1577-1584.
- Shelley, J. C., Cholleti, A., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Timlin, M. R., & Uchimaya, M., 2007. Epik: a software program for pK<sub>a</sub> prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*, 21, 681-691.
- Sheu, S. C., & Chen, A. O. (1991). Lipxygenase as blanching index for frozen vegetable soybeans. *Journal of food science*, 56(2), 448-451.

- Singh, B., Nadkarni, J. R., Vishwakarma, R. A., Bharate, S. B., Nivsarkar, M., & Anandjiwala, S., (201). The hydroalcoholic extract of *Cassia alata* (Linn.) leaves and its major compound rhein exhibits antiallergic activity via mast cell stabilization and Lipoxygenase inhibition. *Journal of ethnopharmacology*, 141(1), 469-473.
- Souleymane, F., Charlemagne, G., Baptiste, N. J., Pierre, G. I., & Jacques, S. (2016). DPPH radical scavenging and lipoxygenase inhibitory effects in extracts from *Erythrina senegalensis* (Fabaceae) DC. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(11), 185-191.
- Sud'Ina, G. F., Mirzoeva, O. K., Pushkareva, M. A., Korshunova, G., Sumbatyan, N. V., & Varfolomeev, S. D., 1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS letters*, 329(1-2), 21-24.
- Szymanowska, U., Jakubczyk, A., Baraniak, B., Kur, A., 2009. Characterisation of Lipoxygenase from Pea Seeds (*Pisum sativum* var. *Telephone* L.). *Food Chemistry*, 116:906-910
- Vanko, M., Rauová, D., Bezáková, L., Holková, I., Bilka, F., & Cupáková, M. (2012). Biochemical properties of lipoxygenase from opium poppy chloroplasts. *Biologia plantarum*, 56, 105-110.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63, 83-95.
- Vural, S., 2007. *5-amino-1, 3, 4-tiyadazol türevlerinin karbonik anhidraz enzim Üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Werz, O., & Steinhilber, D. (2006). Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*, 112(3), 701-718.
- Williams, M., & Harwood, J. L. (2008). Characterisation of lipoxygenase isoforms from olive callus cultures. *Phytochemistry*, 69(14), 2532-2538.
- Xu, B., Wang, L. K., Miao, W. J., Wu, Q. F., Liu, Y. X., Sun, Y., & Gao, C. (2016). Thermal versus microwave inactivation kinetics of lipase and lipoxygenase from wheat germ. *Journal of Food Process Engineering*, 39(3), 247-255.
- Yashaswini, P. S., Rao, A. A., & Singh, S. A. (2017). Inhibition of lipoxygenase by sesamol corroborates its potential anti-inflammatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 781-787.
- Yasin, M., Shahid, W., Ashraf, M., Saleem, M., Muzaffar, S., Aziz-ur-Rehman, ... & Riaz, N. (2023). Targeting new N-furfurylated 4-chlorophenyl-1, 2, 4-triazolepropionamide hybrids as potential 15-lipoxygenase inhibitors supported with in vitro and in silico studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(11), 5166-5182.
- Yıldırım, D., 2003. *LOxın Soya Fasulyesinden Saflaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Yıldız, E., 2010. *Lipooksijenazın Bazı Bitkiler Tarafından İnhibisyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul .
- Yılmaz, C., 2016. *Çay yapraklarından (camellia sinensis l.) Polifenol oksidaz enziminin Afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kimyasalların enzim aktivitesine karşı etkisinin incelenmesi*. Yüksek lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk üniversitesi ,Erzurum .
- Yi, H., Yi, M. A., & Choe, H. T. (2005). Changes in lipoxygenase properties and activity

- related to postgerminative growth and senescence in oat (*Avena sativa* L cv. Victory 1). *Journal of Plant Biology*, 48, 429-439.
- Yoshie-Stark, Y., & Wäsche, A. (2004). Characteristics of crude lipoxygenase from commercially de-oiled lupin flakes for different types of lupins (*Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*). *Food chemistry*, 88(2), 287-292.
- Zhang, C., Zhang, S., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., Wang, X., & Lu, F. (2013). Effects of recombinant lipoxygenase on wheat flour, dough and bread properties. *Food Research International*, 54(1), 26-32.



## ÖZGEÇMİŞ

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| <b>Kişisel Bilgiler</b>              |                 |
| <b>Adı Soyadı:</b>                   | Ergün EREMİNSOY |
| <b>Doğumtarihi:</b>                  |                 |
| <b>Doğum Yeri:</b>                   |                 |
| <b>Uyruğu:</b>                       |                 |
| <b>Adres:</b>                        |                 |
| <b>Tel:</b>                          |                 |
| <b>E-mail:</b>                       |                 |
| <b>Eğitim</b>                        |                 |
| <b>Lise:</b>                         |                 |
| <b>Lisans:</b>                       |                 |
| <b>Yüksek lisans:</b>                |                 |
| <b>Doktora:</b>                      |                 |
| <b>Yabancı Dil Bilgisi</b>           |                 |
| :                                    |                 |
| <b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b> |                 |
|                                      |                 |
| <b>Tezden Üretilmiş Yayınlar</b>     |                 |
|                                      |                 |