



**SHOGAOL'ÜN ANTiOKSiDAN VE
ANTiPROLiFERATiF AKTiViTELERiNiN
BELiRLENMESi VE BAZi METABOLiK
ENZiMLER ÜZERiNDE ETKiSiNiN
ARAşTIRILMASI**

İsmail YAPICI

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Doktora Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**SHOGAOL'ÜN ANTİOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Determination of Antioxidant and Antiproliferative Activities of Shogaol and
Investigation of Its Effect on Some Metabolic Enzymes)

DOKTORA TEZİ

İsmail YAPICI

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Erzurum
Şubat 2023

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**SHOGAOL'ÜN ANTİOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Prof.Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, İsmail YAPICI tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

JüriBaşkanı:	Prof.Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof.Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
JüriÜyesi:	Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
JüriÜyesi:	Prof.Dr. Ekrem KÖKSAL <i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
JüriÜyesi:	Prof.Dr. S. Beyza Ö.SARIKAYA <i>Gümüşhane 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

EnstitüMüdürü

Aslı Islak İmzalıdır

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında sunulan “**Shogaol’ün Antioksidan ve Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Bazı Metabolik Enzimler Üzerinde Etkisinin 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	7	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Metot	34	35
Araştırma Bulguları	9	20
Tartışma ve Sonuç	5	20
Tezin Geneli	15	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
İsmail YAPICI	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
10.2.2023	10.2.2023

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

Bu doktora tez çalışmasının deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda ve Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Doktora tezimin başlangıç aşamasından sonuna kadar yüksek bilgi ve birikimi ile bana yön gösteren, her koşulda desteğini esirgemeyen Türkiye Bilimler Akademisi Asli Üyesi ve Biyokimya Bilim Dalı Başkanı, değerli ve kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Tez İzleme Komitesi üyesi olarak tez çalışmalarına destek veren, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a,

Tez çalışmalarımın farklı aşamalarında desteklerini gördüğüm Biyokimya Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Gümüşhane Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ahmet ALTAY'a, Ardahan Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Ebubekir İZOL'a, Sayın Nurgül ABUL'a, Sayın Zeynebe BİNGÖL'e ve Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda çalışan diğer arkadaşlara,

Doktoraya başladığım günden itibaren maddi ve manevi desteklerini yakinen hissettiğim başta anne ve babam olmak üzere sevgili ailemin ayrı ayrı tüm fertlerine,

Teşekkür ederim.

İsmail YAPICI

ÖZET
DOKTORA TEZİ
SHOGAOL'ÜN ANTIOKSİDAN VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ VE BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNDE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

İsmail YAPICI

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Amaç: Bu tez çalışmasında fenolik bileşikler sınıfında olan Shogaol'ün birçok metotla antioksidan kapasitesi, insan karbonik anhidraz I ve II, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glukozidaz, α -amilaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi, A-549 akciğer kanseri, HT-29 kolon kanseri, MCF-7 ve MDA-MB-453 göğüs kanseri hücre hatları, 3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi araştırıldı.

Yöntem: Shogaol'ün antioksidan kapasitesini belirleme amacıyla DPPH radikali, ABTS radikali ve DMPD radikali giderme ile Cu^{2+} , Fe^{3+} ve FRAP indirgeme metotları kullanıldı. Standart olarak BHA, BHT ve Troloks kullanıldı. Enzim çalışmalarında hCA I ve hCA II izoenzimleri insan eritrositlerinden, Sepharose-4-B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim saflığının kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Spektrofotometrik olarak 280 nm'de absorbans ölçülerek kalitatif protein tayini ve 595 nm'de absorbans ölçülerek kantitatif protein tayinleri yapıldı. Ek olarak Shogaol'ün hCA I, hCA II, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glukozidaz, α -amilaz enzimlerine karşı inhibisyon etkisine bakıldı. Ayrıca TBE yöntemi ile hücre sayımı yapılarak XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü yapıldı ve Shogaol'ün A-549, HT-29, MCF-7, MDA-MB-453 ve 3T3-L1 hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisi araştırıldı.

Bulgular: Shogaol; FRAP metodunda standart olarak kullanılan BHA, BHT ve Troloks'tan (konsantrasyon: 60 $\mu\text{g/mL}$); DPPH $\cdot$ giderme metodunda BHT'den; ABTS $^{+}$ giderme, Cu^{2+} ve Fe^{3+} indirgeme metotlarında Troloks'tan daha yüksek antioksidan kapasite gösterdi. hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla %40,67 verimle 273 kat ve %81,92 verimle 309 kat saflaştırıldı. hCA I ve hCA II izoenzimleri için tek bant gözlemlendi ve molekül ağırlıkları yaklaşık 30 kDa olarak bulundu. Shogaol hCAI, hCA II, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glukozidaz enzimlerine karşı sırasıyla 75,91 nM, 47,04 nM, 37,44 nM, 24,11 nM, 35,72 nM'lık IC_{50} değerleriyle etkili inhibisyon aktivitesi gösterdi. Shogaol en yüksek antiproliferatif etkiyi 8,38 μM 'lık IC_{50} değeriyle HT-29 kolon kanseri hücre hattına karşı gösterdi. Shogaol, A-549 akciğer kanseri ve HT-29 kolon kanseri hücre hattında standart kemoterapötik ilaç Karboplatin'den, MCF-7 göğüs kanseri hücre hattında standart kemoterapötik ilaç Dosetaksel'den daha etkili antiproliferatif aktiviteye sahiptir. Shogaol'ün HT-29, A-549, MCF-7, MDA-MB-453 hücre hatlarına karşı gösterdiği seçicilik endeks değerleri sırasıyla 14,83; 10,82; 2,42; 1,99 olarak; Karboplatin'in ise sırasıyla 0,46; 0,33; 1,30; 0,94 olarak bulundu.

Sonuç: Shogaol'ün antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu; hCA I, hCA II, AChE, BChE, α -glukozidaz enzimlerini etkili bir şekilde inhibe ettiği; çalışılan kanser hücre hatlarında güçlü antiproliferatif etkiye sahip olduğu değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Shogaol, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu, karbonik anhidraz, α -glukozidaz, antiproliferatif etki.

Şubat 2023, 146 sayfa

ABSTRACT
DOCTORAL DISSERTATION
DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE
ACTIVITIES OF SHOGAOL AND INVESTIGATION OF ITS EFFECT ON SOME
METABOLIC ENZYMES

İsmail YAPICI

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Purpose: In this thesis, the antioxidant capacity of Shogaol, which is in class the phenolic compounds, by several methods; its inhibition effect on human carbonic anhydrase I and II, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -glycosidase, and α -amylase enzymes; and its antiproliferative effect on A-549 lung cancer, HT-29 colon cancer, MCF-7 and MDA-MB-453 breast cancer cell lines, 3T3-L1 mouse fibroblast normal cell line was investigated.

Method: In order to determining the antioxidant capacity of Shogaol, DPPH radical, ABTS radical and DMPD radical scavenging, Cu^{2+} , Fe^{3+} and FRAP reduction methods were used. BHA, BHT and Trolox were used as standards. For enzyme studies, hCA I and hCA II isoenzymes were purified from human erythrocytes by Sepharose-4-B-L-Tyrosine-sulfanilamide affinity chromatography. Enzyme purity was checked by SDS-PAGE. Qualitative protein assay was performed by measuring absorbance at 280 nm spectrophotometrically. Also quantitative protein determinations were made by measuring absorbance at 595 nm. In addition, the inhibition effect of Shogaol towards hCA I, hCA II, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -glycosidase, and α -amylase enzymes was examined. Moreover, cell counting was performed with the TBE method and cell viability was measured with the XTT method and the antiproliferative effect of Shogaol on A-549, HT-29, MCF-7, MDA-MB-453 and 3T3-L1 cell lines was investigated.

Findings: Shogaol demonstrated higher antioxidant capacity than BHA, BHT and Trolox used as standards in the FRAP method (concentration: 60 $\mu\text{g/mL}$), and higher than BHT in DPPH $\cdot$ scavenging method, and higher than Trolox in ABTS $^{+}$ scavenging, Cu^{2+} and Fe^{3+} reduction methods. hCA I and hCA II isoenzymes were purified 273 and 309 folds, 40.67 and 81.92% yield, respectively. A single band was observed for each isoenzymes and their molecular weights were found to be approximately 30 kDa. Shogaol exhibited effective inhibition effect against hCA I, hCA II, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -glycosidase enzymes with IC_{50} values of 75.91, 47.04, 37.44, 24.11, 35.72 nM, respectively. Shogaol showed highest antiproliferative effect on HT-29 colon cancer cell line with an IC_{50} value of 8,38 μM . Shogaol had more effective antiproliferative effect than that of standard chemotherapeutic drug Carboplatin in A-549 lung cancer and HT-29 colon cancer cell line, and than the drug Docetaxel in MCF-7 breast cancer cell line. The selectivity index of Shogaol was found to be 14.83, 10.82, 2.42, 1.99 against HT-29, A-549, MCF-7, MDA-MB-453 cell lines, respectively. On the other hand, Carboplatin exhibited selectivity index of 0.46, 0.33, 1.30 and 0.94 against indicated cancer lines, respectively.

Results: It is considered that Shogaol has a high antioxidant capacity, and it effectively inhibits hCA I, hCA II, AChE, BChE, and α -glycosidase enzymes. Also, it has a strong antiproliferative effect on the studied cancer cell lines.

Keywords: Shogaol, antioxidant activity, enzyme inhibition, carbonic anhydrase, α -glycosidase, antiproliferative effect.

February 2023, 146 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Serbest Radikaller	4
Antioksidanlar.....	12
Doğal Antioksidanlar	15
Sentetik Antioksidanlar.....	26
Oksidatif Stres.....	28
6-Shogaol	28
Enzimler	31
Karbonik anhidraz	36
Asetilkolinesteraz	38
Bütirilkolinesteraz	39
α -Glikozidaz	40
α -Amilaz.....	41
Kanser	42
MATERYAL VE METOT	45
Kullanılan Kimyasallar	45
Yararlanılan Cihaz ve Aletler	45
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	46
Stok numune çözeltisi	46
Stok standart çözeltileri.....	46
DPPH $\cdot$ giderme metodu çözeltileri	46
Fe ³⁺ indirgeme metodu çözeltileri.....	46
ABTS ⁺ giderme metodu çözeltileri	46

Cuprak metodu çözeltileri	46
DMPD ⁺⁺ giderme metodu çözeltileri	47
FRAP indirgeme metodu çözeltileri.....	47
hCA I ve hCA II izoenzimleri saflaştırma çözeltileri	47
hCA I ve hCA II izoenzimleri kantitatif protein tayin çözeltileri	48
SDS-PAGE çözeltileri.....	48
hCA I ve hCA II izoenzimleri esterase aktivitesi çözeltileri	49
Asetilkolinesteraz aktivite çözeltileri	49
Bütirilkolinesteraz aktivite çözeltileri	49
α -Glikozidaz aktivite çözeltileri	49
α -Amilaz aktivite çözeltileri.....	49
Antikanser aktivite testlerinde kullanılan çözeltiler.....	50
Antioksidan Çalışmaları.....	50
DPPH [•] giderme metodu	50
Fe ³⁺ indirgeme metodu.....	50
ABTS ^{•+} giderme metodu	51
Cuprak metodu	52
DMPD ⁺⁺ giderme metodu.....	52
FRAP metodu.....	53
hCA I ve hCA II İzoenzimleri Saflaştırma Çalışmaları.....	53
CA enzim hemolizatının hazırlanması	53
Afinite jelinin hazırlanması.....	54
Afinite kolonunun paketlenmesi	55
Afinite kolonuna numune eklenmesi ve elüatların alınması	55
Kalitatif protein tayini	55
Kantitatif protein tayini	55
SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	56
hCA I ve hCA II İzoenzimleri Esteraz Aktivitesi Tayini	56
hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	57
Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	58
Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	58
α -Glikozidaz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	59
α -Amilaz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi.....	59
Antikanser Araştırma Çalışmaları.....	60
Hücre kültürü koşulları.....	60

Hücrelerin çözündürülmesi	60
Hücrelerin bölünmesi	61
Hücrelerin dondurulması	61
Hücre sayımı	62
XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü	63
ARAŞTIRMA BULGULARI	64
Antioksidan Aktivite Bulguları	64
DPPH $\cdot$ giderme metodu bulguları	64
Fe ³⁺ indirgeme metodu bulguları	65
ABTS ⁺ giderme metodu bulguları	66
Cuprak metodu bulguları	67
DMPD ⁺ giderme metodu bulguları	68
FRAP metodu bulguları	69
Enzim Saflaştırma Bulguları	70
Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	70
Karbonik anhidraz I ve II saflaştırma bulguları	71
SDS-PAGE bulguları	72
Karbonik anhidraz I ve II saflaştırma basamakları bulguları	72
Enzim İnhibisyonu Araştırma Bulguları	73
Shogaol'ün hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde esteraz aktivitesi inhibisyon bulguları	73
Shogaol'ün asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki aktivite bulguları	76
Shogaol'ün bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki aktivite bulguları	77
Shogaol'ün α -glukozidaz enzimi üzerindeki aktivite bulguları	79
Shogaol'ün α -amilaz enzimi üzerindeki aktivite bulguları	80
Antikanser Araştırma Bulguları	81
A-549 insan akciğer kanseri hücre hattı araştırma bulguları	81
HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı araştırma bulguları	82
MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattı araştırma bulguları	83
MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattı araştırma bulguları	84
3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattı araştırma bulguları	85
TARTIŞMA VE SONUÇ	87
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	128

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri	8
Tablo 2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	21
Tablo 3. Karbonik Anhidraz Enziminin Çift Yönlü Etki Mekanizması	36
Tablo 4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	37
Tablo 5. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin İlgili Olduğu Hastalıklar	38
Tablo 6. DPPH· Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği	50
Tablo 7. Fe ³⁺ İndirgeme Metodu Deney Tüpü İçeriği	51
Tablo 8. ABTS ^{·+} Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği	52
Tablo 9. Cuprak Metodu Deney Tüpü İçeriği	52
Tablo 10. DMPD ^{·+} Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği	53
Tablo 11. FRAP Metodu Deney Tüpü İçeriği	53
Tablo 12. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Küvet İçeriği	57
Tablo 13. Asetilkolinesteraz Aktivite Tayini Küvet İçeriği	58
Tablo 14. Bütirilkolinesteraz Aktivite Tayini Küvet İçeriği	58
Tablo 15. α-Glikozidaz Aktivite Tayini Küvet İçeriği	59
Tablo 16. α-Amilaz Aktivite Tayini Küvet İçeriği	59
Tablo 17. Shogaol ve Standart Antioksidanlar (BHA, BHT ve Troloks) İçin DPPH· Giderme Aktivitesi IC ₅₀ Değerleri	65
Tablo 18. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) Fe ³⁺ İndirgeme Metoduna Göre 30 µg/mL'deki Absorbans Değerleri	66
Tablo 19. Shogaol ve Standart Antioksidanlar (BHA, BHT ve Troloks) İçin ABTS ^{·+} Giderme Aktivitesi IC ₅₀ Değerleri	67
Tablo 20. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) Cuprak Metoduna Göre 30 µg/mL'deki Absorbans Değerleri	68
Tablo 21. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) FRAP Metoduna Göre 60 µg/mL'deki Absorbans Değerleri	69
Tablo 22. İnsan Eritrositinden Elde Edilen Hemolizat ve Hemolizattan Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan hCA I ve hCA II İzoenzimleri İçin Enzim Ünitesi, Spesifik Aktivite, % Verim ve Saflaştırma Katsayısı Sonuçları	73
Tablo 23. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Esteraz Aktivitesi IC ₅₀ Değerleri	73
Tablo 24. Shogaol'ün hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC ₅₀ ve Ki Değerleri	76
Tablo 25. Shogaol'ün Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimleri Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC ₅₀ ve Ki Değerleri	79

Tablo 26. Shogaol'un α -Glikozidaz Enzimi Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC ₅₀ ve Ki Değerleri	80
Tablo 27. Shogaol'un α -Amilaz Enzimi Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Aktivitesi IC ₅₀ Değeri	81
Tablo 28. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların A-549 İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC ₅₀ Değerleri..	82
Tablo 29. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaç Karboplatin'in HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC ₅₀ Değerleri..	83
Tablo 30. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların MCF-7 İnsan Göğüs Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC ₅₀ Değerleri..	84
Tablo 31. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların MDA-MB-453 İnsan Göğüs Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC ₅₀ Değerleri..	85
Tablo 32. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaç Karboplatin'in 3T3-L1 Fare Fibroblast Normal Hücre Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC ₅₀ Değerleri	86
Tablo 33. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşikler İçin DPPH· Giderme Aktivitesi IC ₅₀ Değerleri	88
Tablo 34. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Fe ³⁺ İndirgeme Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri	89
Tablo 35. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşikler İçin ABTS ⁺ Giderme Aktivitesi IC ₅₀ Değerleri	91
Tablo 36. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Cuprak Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri	93
Tablo 37. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin FRAP Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri	94
Tablo 38. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin hCA I ve hCA II İzoenzimleri İçin IC ₅₀ ve Ortalama K _i Değerleri	97
Tablo 39. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzimleri İçin IC ₅₀ ve Ortalama K _i Değerleri	99
Tablo 40. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin α -Glikozidaz Enzimi İçin IC ₅₀ ve Ortalama K _i ; α -Amilaz İçin IC ₅₀ Değerleri.....	101
Tablo 41. Shogaol Bileşiği ve Farklı Kemoterapötik İlaçların Çeşitli Kanseri ve Normal Hücre Hatları Üzerindeki IC ₅₀ (μ M) Değerleri.....	106
Tablo 42. Shogaol Bileşiği ve Karboplatin'in Seçicilik Endeksi (SI) Değerleri	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipid peroksidasyonu	7
Şekil 2. H ₂ O ₂ oluşumu, giderilmesi ve fenton reaksiyonu yoluyla OH [•] üretimi	10
Şekil 3. Bazı reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	11
Şekil 4. Protein oksidasyonu mekanizması	12
Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması.....	15
Şekil 6. Antioksidan enzimler tarafından reaktif oksijen türlerinin giderilmesi	17
Şekil 7. Tokoferollerin genel kimyasal yapısı.....	18
Şekil 8. α-Tokoferol'ün radikal süpürme mekanizması	19
Şekil 9. A ve C vitaminlerinin kimyasal yapıları	20
Şekil 10. Fenol radikalinin rezonans kararlılığı	21
Şekil 11. Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapıları	22
Şekil 12. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması	23
Şekil 13. Flavonoidlerin kimyasal yapıları	24
Şekil 14. β-Karoten'in kimyasal yapısı	25
Şekil 15. BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları	27
Şekil 16. TBHQ, PG ve OG'nin kimyasal yapıları	27
Şekil 17. 6-Shogaol'ün kimyasal yapısı	29
Şekil 18. 6-Shogaol'ün sentezi.....	29
Şekil 19. 8-Shogaol, 10-Shogaol, 6-Gingerol ve Zingeron'un kimyasal yapıları.....	30
Şekil 20. Zencefil bitkisi	30
Şekil 21. Lineweaver-Burk grafiği.....	34
Şekil 22. Dönüşümlü inhibisyon türleri	35
Şekil 23. Karbonik anhidraz enziminin katalitik bölgeleri.....	36
Şekil 24. Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı	39
Şekil 25. Asetilkolin'in asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidrolizi	39
Şekil 26. Bütirilkolin'in bütirilkolinesteraz tarafından hidrolizi.....	40
Şekil 27. ABTS'nin kimyasal yapısı	51
Şekil 28. CNBr Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jeli reaksiyon basamakları.....	54
Şekil 29. p-Nitrofenil asetat'ın p-Nitrofenol'e dönüşümü	57
Şekil 30. Class II güvenlik kabini	61
Şekil 31. Hemositometre ile canlı hücre sayımı.....	62
Şekil 32. XTT tetrazolyum tuzu	63

Şekil 33. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) DPPH· giderme aktivitesi grafiği.....	64
Şekil 34. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) Fe ³⁺ indirgeme kapasitesi grafiği	65
Şekil 35. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (5-20 µg/mL) ABTS ⁺ giderme aktivitesi grafiği.....	66
Şekil 36. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) Cu ²⁺ indirgeme kapasitesi grafiği.....	67
Şekil 37. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) DMPD ⁺ giderme aktivitesi grafiği.....	68
Şekil 38. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) FRAP metoduna göre Fe ³⁺ indirgeme kapasitesi grafiği.....	69
Şekil 39. Bradford metoduna göre hemolizattaki protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik.....	70
Şekil 40. Bradford metoduna göre hCA I ve hCA II izoenzimlerinin protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik.....	70
Şekil 41. hCA I izoenziminin elüsyon sonucu kalitatif tayin grafiği	71
Şekil 42. hCA II izoenziminin elüsyon sonucu kalitatif tayin grafiği.....	71
Şekil 43. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin SDS-PAGE sonucu fotoğrafı	72
Şekil 44. hCA I izoenziminin 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan esterase aktivitesi metodu sonucu IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği.....	74
Şekil 45. hCA II izoenziminin 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan esterase aktivitesi metodu sonucu IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği	74
Şekil 46. hCA I izoenzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K _i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 47. hCA II izoenzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K _i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 48. Asetilkolinesteraz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği	76

Şekil 49. Asetilkolinesteraz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	77
Şekil 50. Bütirikolinesteraz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği	78
Şekil 51. Bütirikolinesteraz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	78
Şekil 52. α -Glikozidaz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği.....	79
Şekil 53. α -Glikozidaz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 54. α -Amilaz enzimi için Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği	81
Şekil 55. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) A-549 insan akciğer kanserihücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri	82
Şekil 56. Shogaol bileşiği ve kemoterapötik ilaç Karboplatin'in HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri.....	83
Şekil 57. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri	84
Şekil 58. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri	85
Şekil 59. Shogaol bileşiği ve kemoterapötik ilaç Karboplatin'in 3T3-L1 fare fibroblast hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri	86
Şekil 60. Bir antioksidanın DPPH radikali giderme mekanizması	87
Şekil 61. ABTS ile $K_2S_2O_8$ 'in oksidasyonu ve $ABTS^{+}$ üretimi	90
Şekil 62. Bir antioksidan ile Cuprak reaktifi arasındaki varsayılan reaksiyon mekanizması	92

Şekil 63. FRAP metodunun indirgenme reaksiyonu $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+} - [\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$	94
Şekil 64. Asetazolamid bileşiğinin kimyasal yapısı.....	96
Şekil 65. İlaç olarak kullanılan asetilkolinesteraz enzimi inhibitörlerinden Takrin ve Rivastigmin'in kimyasal yapıları	98
Şekil 66. XTT tetrazolyum tuzunun XTT formazana indirgenmesi	103
Şekil 67. Apoptoza giden yollar	104



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS⁺	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
AChe	Asetilkolinesteraz enzimi
ACheI	Asetilkolinesteraz inhibitörü
BChE	Bütirilkolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
BSA	Sığır albümin çözeltisi
CA	Karbonik anhidraz
DF	Seyreltme faktörü
DMPD	N,N-Dimetil-fenilendiamin
DMPD⁺	N,N-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	1,1-Difenil-2-pikril hidrazil
DPPH[•]	1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)
E.C.	Enzim komisyon
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMEM	Eagle's minimum essential medium
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-subtrat-inhibitör kompleksi
ETS	Elektron taşıma sistemi
E.Ü.	Enzim ünitesi
FBS	Fetal sığır serumu
FRAP	Demir indirgeme antioksidan gücü
HAT	Hidrojen atomu transferi
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IC	İnhibitör konsantrasyonu
IC₅₀	Mevcut konsantrasyonu yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
IUPAC	Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
K_i	Enzim-inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_M	Maksimum hızın yarısındaki substrat konsantrasyonu
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid posfat
OG	Oktil gallat
PBS	Fosfat tamponlu salin
PER	Amonyum persülfat
PG	Propil gallat
PNF	p-Nitrofenil asetat
PNPG	4-Nitrofenil α-D-glukopiranozid

ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SET	Tek elektron transferi
TCA	Trikloro asetik asit
TBHQ	Tersiyer bütül hidrokinon
TEMED	Tetrametil etilendiamin
TNF	Tümör nekroz faktörü
TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine
Tris	Trihidroksimetil aminometan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
XTT	2,3-Bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H tetrazolium-5-karboksanilid
V	Reaksiyon hızı
V_{max}	Maksimum hız
A-549	Akciğer kanseri hücre hattı
HT-29	Kolon kanseri hücre hattı
MCF-7	Göğüs kanseri hücre hattı
MDA-MB-453	Göğüs kanseri hücre hattı
3T3-L1	Fare fibroblast normal hücre hattı

GİRİŞ

Canlı organizmalarda binlerce kimyasal reaksiyon meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar hayatın devamı için gerekli değişimlerdir. Bazılarında vücut için gerekli bir madde sentezlenirken bazı reaksiyonlarda ise vücuttan atılması gereken bir madde parçalanmaktadır. Bu reaksiyonların içinde redoks reaksiyonları, elektron aktarımının olduğu önemli bir reaksiyon türüdür. Elektronların aktarımı sırasında ortaklanmamış elektronlar oluşabilir ve serbest radikal adı verilen canlı vücudunda çeşitli hasarlara yol açan ajanlar meydana gelebilir (Gülçin 2012). Bu ajanlar çok kısa ömürlüdürler fakat başka moleküllerle reaksiyona girip onları da radikal haline getirirler ve bir seri zincir reaksiyonlarının başlamasına sebep olurlar (Gülçin vd 2003). Bu durum protein, lipid, nükleik asit, karbohidrat vb. moleküllerin ve dokuların hasarlı hale gelmesine neden olur. Bunun sonucunda vücutta yapısal bozukluklar ve birçok hastalık ortaya çıkar (Çakatay ve Kayalı 2006; Gülçin 2007a).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) kontrolsüz oluşması ve antioksidan savunma mekanizmasının dengesiz olması birçok hastalığın meydana gelmesine ve erken yaşlanmaya sebep olur. Oksijenli solunum yapan organizmalarda serbest radikallerin hem oluşumunu hem zararlarını engelleyen antioksidan maddeler mevcuttur. Antioksidanlar, serbest radikallerin protein, lipid, nükleik asit gibi biyomoleküllere verebileceği zararları önleyerek hastalıkların oluşma riskini azalmaktadırlar ve birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirmektedirler. Metabolizmayı koruyarak hastalıkların oluşmasını ya da ilerlemesini engellerler (Gülçin 2005b). Ayrıca yiyeceklerin ve ilaçların bozulmasının sebeplerinden biri olan lipid peroksidasyonunu geciktirerek raf ömrünü uzatırlar (Gülçin 2010).

Antioksidanlar giderme etkisi, söndürme etkisi, zincir kırıcı etki ve onarıcı etki gibi yollarla oksidanları giderirler (Gökpınar vd 2006). Endojen ve ekzojen olabilirler. Endojen antioksidanlar amino asit, protein, enzim yapısında olabildiği gibi başka molekül sınıfında da olabilirler. Örnek olarak hemoglobin, miyogloblin, ferritin, transferrin, bilirubin, sistein, metiyonin, albümin, ürat, katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dizmutaz verilebilir (Panglossi 2006). Ekzojen antioksidanlar sentetik ve doğal olabilirler. Sentetik olanlara BHA, BHT, PG ve TBHQ örnek olarak verilebilir. Doğal olanlara örnek olarak ise tokoferoller, A ve C vitaminleri, fenolik bileşikler, kumarinler, flavonoidler, karotenoidler verilebilir (Gülçin 2012).

Antioksidanlar, koruyucu olarak davranıp ROS kaynaklı oksidatif hasarı önlerler. Antioksidan sınıfları içinde en önemli bileşik türü olan fenolik bileşikler de doğal antioksidan özelliklerinin bulunmasından dolayı besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korurlar. Serbest radikallerin giderilmesi için BHA, BHT gibi fenolik yapıları sentetik antioksidanlar gıda ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır fakat zararlı oldukları tespit edildiğinden kullanılmaları sınırlandırılmıştır. Dolayısıyla son yıllarda doğal ve güvenli antioksidan kaynaklarına özellikle de bitki kaynaklı olanlara yönelim artmış olup çalışmalar bu alanda yoğunlaşmıştır (Gülçin 2007a; Gülçin vd 2009).

Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandıran, yan ürün oluşturmada %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Çok büyük bir kısmı protein yapısındadır. Hücre içindeki tüm kimyasal olaylar enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Enzimi olmayan bir reaksiyon yok gibidir. Hücre içinde sentezlenirler ve genellikle hücre içinde kullanılırlar. Oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere altı ana gruba ayrılırlar. Her grubun kendi içinde alt grubu vardır. Enzimlerin canlı vücudunda önemli rolleri olduğu anlaşıldıktan sonra enzim üzerinde yapılan çalışmalar artmıştır. Laboratuvar ortamında aylarca sürececek bir reaksiyon, enzimlerin varlığında saniyelerle ifade edilen bir sürede sonlanmaktadır. Enzimlerin bu hızlı reaksiyonları nedeniyle ki tanımlamalarının yapıp saflaştırılarak elde edilmeleri ve *in vitro* ortamda kullanılmalarının sağlanması, çok çalışılan bir alan haline gelmiştir. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Enzim çalışmalarında öne çıkan bir husus da hastalıkların nedenleri ve çözümleri hakkında enzimlerin aldıkları rol olmuştur. Bu hususta birçok araştırma yapılmış ve raporlar sunulmuştur. Bunun sonucunda bir kısım hastalıkların enzim inhibisyonu veya aktivasyonu ile tedavi yoluna gidilmiş ve halen devam edilmektedir. Örneğin Alzheimer hastalığının tedavisinde, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış üç kolinesteraz inhibitörü (AChEI) kullanılmaktadır (Raina *et al.* 2008). Bir çalışmada karbonik anhidraz inhibitörlerinin antitümör, ağrı kesici, antiülser, his materyali olarak, emisyon tomografisinde, manyetik rezonans belirlenmesinde, epilepside, nörolojik hastalıklarda, diüretik ilaçların geliştirilmesinde öncü antibiyotik olarak kullanıldığı ifade edilmiştir (Beydemir ve Gülçin 2004). Burada önemli olan iki husustan birisi, enzimi spesifik olarak yüksek oranda inhibe veya aktive edecek maddelerin bulunup tanımlanması, diğer husus ise bu maddenin yan etkisi olmayan doğal madde olarak elde edilmesidir.

Dünyada her yıl birçok insan çeşitli hastalıklara yakalanmaktadır. Bu hastalıkların bazılarının tedavisi yapılamamakta ve maalesef ölümle neticelenmektedir. Bu tür hastalıkların en önemlilerinden birisi de kanserdir. Kanser 200'den fazla türü vardır. Çevre kirliliğinin her geçen gün daha da artması, bazı teknolojik ürünler, atıklar ve hatta stresli bir hayat ortamı bu hastalığa yakalanma oranını artırmaktadır. Tedavi için çeşitli ilaçlar ve yöntemler kullanılmakla birlikte hem sentetik olup yan etkilerinin olması hem de maliyetli olmaları tedaviden elde edilecek sonucu olumsuz yönde etkilemektedir. Dolayısıyla tedavi yapılırken yan etkisi olmayan doğal ürünlerin ya da bileşiklerin kullanılması önemli hale gelmiştir ve bunun uygulamaları da yapılmaktadır. Örnek olarak, porsuk ağacı (*Taxus brevifolia*) bitkisinden izole edilen taksol molekülü akciğer, prostat, yumurtalık kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Yine madagaskar menekşesi (*Catharanthus roseus*) bitkisinden izole edilen vincristine molekülü böbrek kanseri ve lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar gibi doğal moleküllerin izole edilip ilaç olarak kullanılabilmesi için araştırmalar yapılması önem arz eden bir konu olarak görünmektedir (Akdulum 2011).

Yukarıda belirtilen noktalardan dolayı bu tez çalışmasında, zencefilde bulunan ve doğal fenolik bileşik olan 6-Shogaol'un hem antioksidan kapasitesi, hem bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisi, hem de kanserli hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkisi araştırılarak hastalıklara karşı farmakoloji ve gıda sektörlerinde etken madde olarak kullanılabilirliğinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

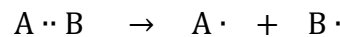
KURAMSAL TEMELLER

Serbest Radikaller

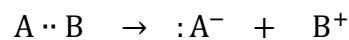
Kararlı atomların orbitallerinde zıt spinli eşleşmiş durumda iki elektron vardır. Bu durumdaki atom ve moleküllerin reaksiyona girme istekleri radikallere göre daha azdır. (Karabulut ve Günay 2016). Kararlı atomlardaki ortaklanmış elektronlar bazı sebeplerle ortaklanmamış hale gelebilir. Bu şekilde ortaklanmamış elektron içeren aktif ve kararsız atom, molekül veya iyonlara “serbest radikaller” denir. Atom veya molekülün sağ üst köşesine nokta konarak gösterilirler. Kararlı duruma gelmek için elektron alma eğilimi gösterirler. Serbest radikallere “oksidan moleküller” de denir. Çok kararsız ve kısa ömürlüdürler fakat çok reaktif olduklarından dolayı çevrelerindeki radikal olmayan atom ve moleküllere saldırarak onları da serbest radikal yaparlar. Bunun sonucunda bir dizi zincir reaksiyonları başlayabilir. Canlı sistemlerdeki ana reaksiyonlardan birisi redoks reaksiyonudur. Bu reaksiyonda elektron bir türden diğerine aktarılır. Eğer elektron akışı sırasında bir kopukluk olursa (örneğin ortaklanmamış tek elektron transferi) serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller yüksek enerjili elektromanyetik dalgaların ve yüksek sıcaklığın kovalent bağları kırması sonucu da oluşabilir. Yine radikal olmayan bir molekül ya da atomun elektron alması veya vermesi ile de oluşabilirler (Kılınç ve Kılınç 2002; Gülçin 2020).

Serbest radikallerin bazı oluşma yolları aşağıda verilmiştir (Wu and Cederbaum 2003):

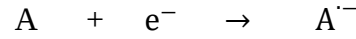
1. Yüksek sıcaklığın tesiri ile ve yüksek enerjiye sahip olan elektromanyetik dalgalara maruz kalma sonucunda kovalent bağlar homolitik olarak kırılabilir. Bağ kırılması ile bağdaki iki elektrondan birisi bir atomda, diğeri diğer atomda kalır. Elektronlar ortaklanmamış hale gelir ve aktiviteleri çok yüksek olan serbest radikaller meydana gelir.



2. Normal bir molekül heterolitik olarak parçalanabilir. Bu durumda bağdaki her iki elektron da aynı atomda kalır ve zıt yüklü iyonlar oluşur.



3. Radikal olmayan normal bir moleküle redoks reaksiyonları sırasında tek bir elektron transfer edilip indirgenme olursa dış orbitalde ortaklanmamış elektron meydana gelir ve radikaller oluşur.



Serbest radikallerin oluşumu dış kaynaklı veya iç kaynaklı olabilir (Annakkaya 2012; Karabulut ve Günay 2016).

Dış kaynaklar:

- Organik bileşiklerin pişirme sırasında yakılması gibi diyet faktörleri,
- Mikrodalga, UV, X-ray gibi zararlı ışınlar,
- Hava kirletici gazlar (O₃, CO, toluen, formaldehit, benzen vb.),
- Alkol, sigara kullanılması,
- Egzoz ve sigara dumanı,
- Su kirleticiler (trihalometan, kloroform vb.),
- Volkanik olaylar, ormanların yanması,
- Boya, tutkal, tiner, bazı temizlik ürünleri gibi kimyasal içerikli ürünler,
- Böcek gibi zararlı organizmaları engellemek için yapılan pestisit karışımları,
- Organik çözücüler.

İç kaynaklar:

• Aerobik solunum sırasında elektron taşıma sistemi (ETS) ile taşınan oksijenler yan ürün olarak serbest radikal üretebilir.

• Stokrom oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi enzim kaynaklı üretilirler.

• Sitokinler (hücreler arası iletişim sağlayan peptid/protein grubu) serbest kaldığında makrofaj ve nötrofiller tarafından üretilirler.

• Lipid peroksidasyonu, araşidonik asit (çoklu doymamış yağ asidi) metabolizması, otooksidasyon reaksiyonları (radikal zincir reaksiyonları), redoks reaksiyonları, plateletler ve düz kas hücreleri üretebilir.

• Bağışıklık sistemi patojenlere karşı üretebilir.

• Yorgunluk ve stres durumlarında üretilirler.

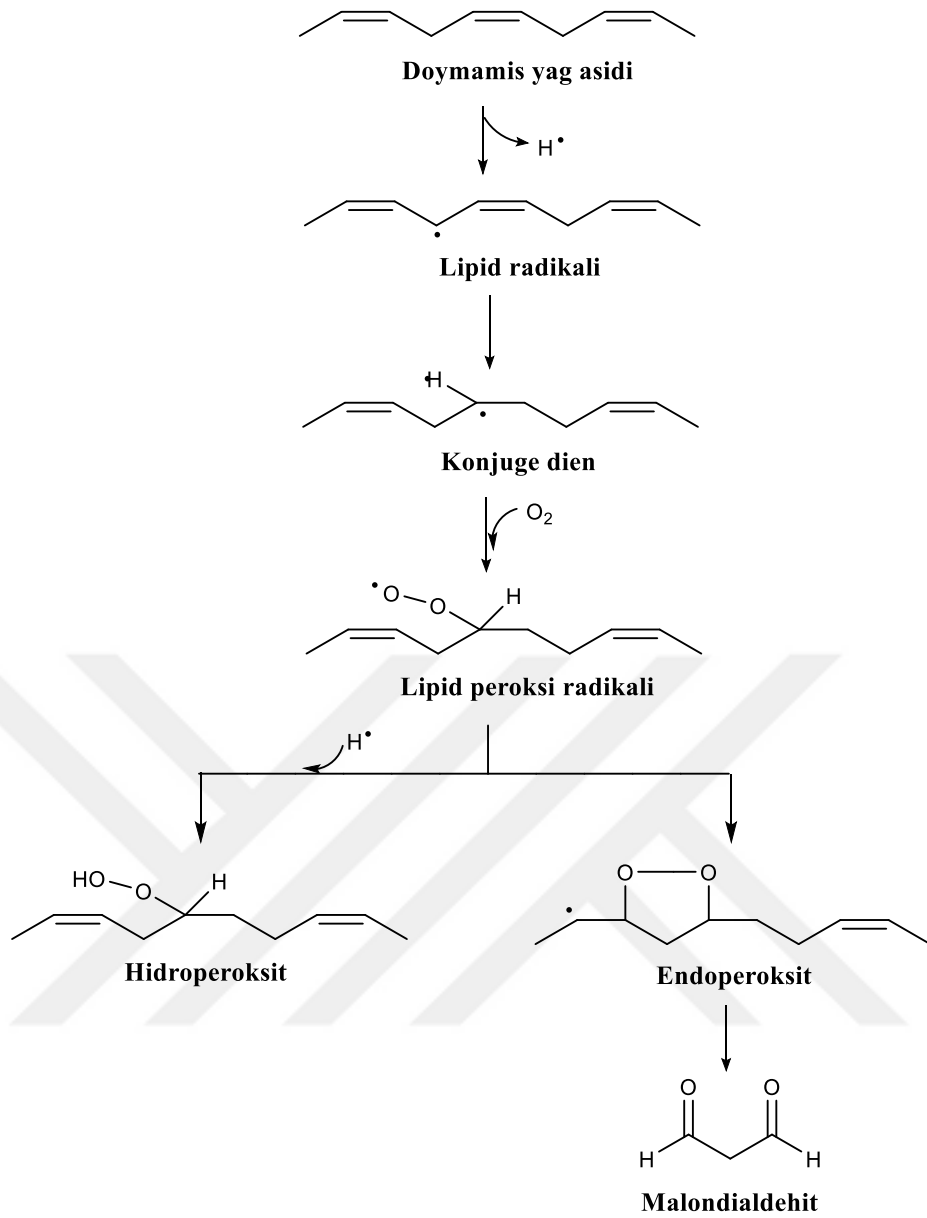
• Kateşolamin ve kortizol gibi hormonlar strese yol açabilirler, bunun yanında kendileri de serbest radikal olabilirler.

• Sitokrom p450 sistemindeki elektron kaçaklarından oluşabilirler.

Normal durumlarda canlı organizmalarda oksidanlar ve antioksidanlar arasında denge vardır. Bu denge herhangi bir sebeple bozulursa serbest radikaller oluşur. Bunlar canlıda bulunan protein, lipid, nükleik asit, karbohidrat gibi biyomoleküllerin hasara uğramalarına sebep olurlar. Bu hasarlar sonucu kanser, sıtma, diyabet, felç, hipertansiyon, bağışıklık sisteminin zayıflaması, ateroskleroz, kronik akciğer hastalığı gibi 100'den fazla hastalığın meydana gelebildiği belirtilmiştir (Forman and Zhang 2021). Serbest radikallerin en büyük zararı hücre zarları üzerindedir. Hücre zarlarından elektron alarak kendileri ortaklanmış hale gelirken hücre zarlarını hasarlı hale getirerek hücre yapısını bozarlar (Gökpınar vd 2006).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranlarında bulunan lipidlerle reaksiyona girdiklerinde meydana gelir ve membranın geçirgenliğinin ve akışkanlığının bozulmasına sebep olur. Bu durum hücrenin normal fonksiyonlarını görmesine ciddi anlamda zarar verir. Ayrıca toksik yan ürünler oluşur. Bu yan ürünler ikinci haberci olarak davranır ve olduğu alandan uzak yerlerde de etkilerini gösterirler. Lipid peroksidasyonu hidroksil radikali (OH[•]) gibi bazı türlerin saldırısı ile metilen grubundan bir H atomu kopmasıyla başlar ve C atomunda ortaklanmamış elektron oluşur. Bu C radikali konjuge dien olarak sabit hale girer. Sonra oksijen molekülü ile reaksiyon verir ve lipid peroksil radikali (LOO[•]) oluşur. Başka H atomlarının da ayrılmasıyla radikaller ile lipidler arasında reaksiyonlar devam eder ve sonuçta lipid hidroperoksitler (LOOH) oluşur. ROS'leri de lipid peroksidasyonuna ve DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerde hasarlara neden olurlar. Hücre bileşenlerinin zarar görmesiyle dokular hasarlı hale gelir. Bu durum kanser, Alzheimer hastalığı, biyokimyasal dengesizlik, dejeneratif bozukluklar gibi birçok hastalığa sebep olur (Ramsarma *et al.* 2003; Devasagayam *et al.* 2004; Valko *et al.* 2007; Abe *et al.* 2022).

Lipid peroksidasyonu sonucunda aldehitler, hidroksi yağ asitleri, alkoller gibi yan ürünler oluşur. Özellikle malondialdehit (MDA) gibi aldehitler, çok uzun ömürlü olmaları ve aktivitelerinin yüksek olmalarından dolayı hücre içi ve hücre dışındaki lipid, protein, nükleik asit gibi biyomoleküllere oksidatif zarar vererek, membran enzimleri ve reseptörlerinin aktivitelerinin kaybolmasına, böylece membran stabilizesinin bozulmasına neden olarak geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara sebep olmaktadır (Canoruç *et al.* 2001; Del Rio *et al.* 2005).



Şekil 1. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonuna en çok sebep olan hidroksil radikalıdır. Bu radikal membran yapısındaki yağ asitleri zincirinden H atomu koparır. Böylece lipid peroksidasyonu başlayarak yağ asitleri radikal olmaya başlarlar. Bu durum zincir reaksiyonu olarak devam eder ve hücre bileşenlerine zarar verir. Hidroksil radikalının yanı sıra buna singlet oksijen (1O_2) de sebep olur. $OH^{\bullet}$, DNA parçalarından pürinlere ve özellikle de pirimidinin $C_4=C_5$ çift bağına saldırarak onlardan H atomu koparır veya onlara H atomu verir. Bunun sonucunda urasil glikol, timin glikol, hidantoin, 5-hidroksideoksisitidin, 5-hidroksideoksiüridin, üre kalıntısı gibi pirimidinin hasar ürünleri oluşur. Radikal saldırıları ADP-riboz enzimini aktive eder. Bu enzim apoptoza (programlanmış hücre ölümü) ve DNA'nın parçalanmasına sebep olur. Yine serbest radikaller karbohidratlara da saldırarak C

radikalleri meydana getirirler ve zincir kırılmalarına yol açarlar (Devasagayam *et al.* 2004; Sarma *et al.* 2010).

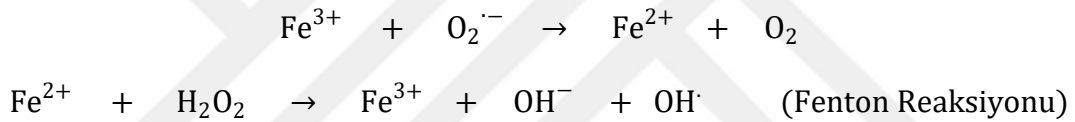
Oksidanlar ve serbest radikaller oksijen, azot ve kükürttten türerler. Oksijenden türeyenler “reaktif oksijen türleri (ROS)”, azottan türeyenler “reaktif azot türleri (RNS)” olarak adlandırılır. Kısa ömürlü moleküller, iyonlar ve radikallerdir. Yarı ömürleri nanosaniyeden saatlere kadar değişir (Gülçin vd 2019). Moleküler oksijen serbest radikallerle kolaylıkla ve radikal olmayan maddelerle yavaş olarak reaksiyon vererek ROS’lerini oluşturur. En önemli reaktif oksijen türleri hidroksil radikali (OH[•]), süperoksit radikali (O₂^{•-}), alkoksil radikali (RO[•]), peroksil radikali (ROO[•]), nitrik oksit (NO[•]) radikalidir. Bunların içinde de hidroksil ve alkoksil radikalleri en reaktif olanlarıdır. Hidroksil radikalının yarı ömrü 10⁻⁹ s, alkoksil radikalının ise 2 s’dir. Diğer radikaller daha az reaktiftir. Bunun yanında hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂), hipoklorit (HOCl), ozon (O₃) gibi radikal olmayan ROS’leri de vardır. Singlet oksijen, moleküler oksijenden daha reaktiftir. Bunlar moleküler oksijene bir elektron transfer edilerek kolaylıkla radikale dönüşebilirler. Hücrelerde solunum zinciri önemli bir ROS kaynağıdır. Radikal olan ve olmayan reaktif oksijen ve azot türleri Tablo 1’de verilmiştir (Apak *et al.* 2022).

Tablo 1. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

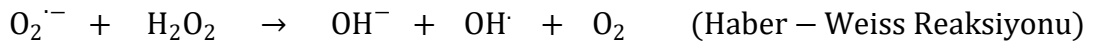
Serbest radikal olanlar		Serbest radikal olmayanlar	
Süperoksit radikali	O ₂ ^{•-}	Ozon	O ₃
Hidroksil radikali	OH [•]	Singlet oksijen	¹ O ₂
Lipid radikali	L [•]	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Lipid peroksil radikali	LOO [•]	Hipoklorit	HOCl
Lipid alkoksil radikali	LO [•]	Lipid hidroperoksit	LOOH
Hidroperoksil radikali	HOO [•]	Nitröz oksit	N ₂ O
Peroksil radikali	ROO [•]	Nitröz asit	HNO ₂
Protein radikali	P [•]	Peroksinitröz asit	ONOOH
Nitrik oksit radikali	NO [•]	Diazot trioksit	N ₂ O ₃
Azot dioksit radikali	NO ₂ [•]	Nitril klorit	NO ₂ Cl
Nitrosil katyon	NO ⁺	Nitroksil anyon	NO ⁻
Tiyil radikali	RS [•]	Peroksinitrit	ONOO ⁻

O_2 molekülünün orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran şekli olan $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit radikali), en kolay ve en çok meydana gelen radikaldir. Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle çok kararsız olan süperoksit radikali meydana gelir. Moleküler oksijene elektron verenler genelde demir, bakır, glukoz, adrenalin, tiyol bileşikleri, flavin nükleotidleridir. Bu radikalın miktarının artması ile radikal zincir reaksiyonları meydana gelerek diğer radikaller oluşur. $O_2^{\cdot-}$ oksidatif zarara fazla neden olmaz. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi hemen H_2O_2 'ye dönüştürür. Süperoksit radikallerinin asıl zararları H_2O_2 'nin oluşumuna sebep olmaları ve metal iyonlarını indirgemeleridir (Halliwell 1991; Naidu 2003; Apak *et al.* 2022).

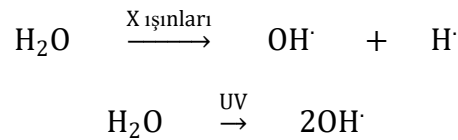
Fe^{3+} , süperoksit radikali ile reaksiyona girerek Fe^{2+} 'ye indirgenir. Fe^{2+} 'de hidrojen peroksit ile reaksiyona girer ve hidroksil radikalini oluşturur. Yani Fe^{2+} iyonu radikal oluşumuna sebep olmaktadır. Bu reaksiyona “fenton reaksiyonu” denir. Fenton reaksiyonu Henry John Horstman Fenton tarafından 1876 yılında bulunmuştur (Torun ve Yardım 1993; Abe *et al.* 2022).



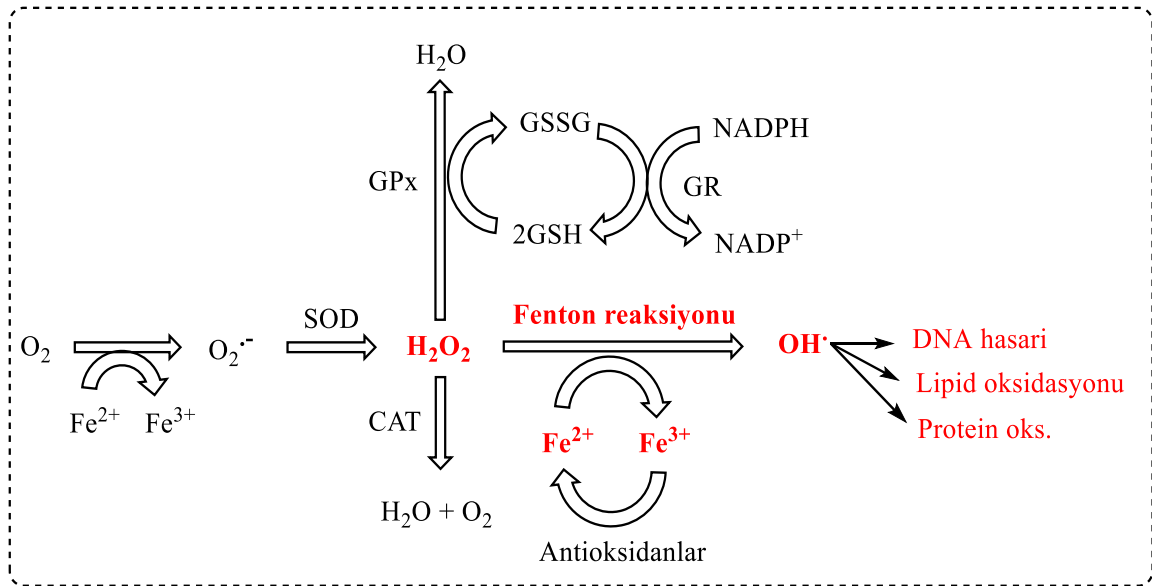
H_2O_2 , süperoksit radikali ile doğrudan da reaksiyona girebilir ve hidroksil radikalini oluşturabilir. Bu reaksiyona ise “Haber-Weiss Reaksiyonu” denir (Wang *et al.* 2022; Chen *et al.* 2023).



$OH^{\cdot}$, hemen hemen tüm maddelerle reaksiyona giren çok aktif bir radikaldir. Suyun X ışınlarına maruz kalmasıyla, H_2O_2 'in dimetilsülfoksit ile reaksiyonu sonucu ve yine H_2O_2 'in UV ışınlarına maruz kalmasıyla da oluşabilir (Apak *et al.* 2022).



Demir elementi, yer kabuğunda en bol bulunan dördüncü elementtir. Metabolizmada çok önemli reaksiyonlar için gerekli bir element olmasına rağmen çeşitli sebeplerle hücrelerde fazla birikmesi halinde reaktif oksijen türlerinin üretilmesine sebep olarak başta kanser olmak üzere, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına neden olur (Şekil 2). Özellikle erkeklerde üreme için potansiyel bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Kocpinar vd 2020; Zhang *et al.* 2022).



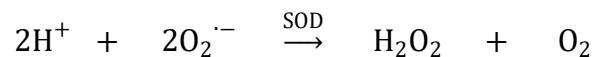
Şekil 2. H₂O₂ oluşumu, giderilmesi ve fenton reaksiyonu yoluyla OH• üretimi

NO•, reaktif bir tür olup oksijen ile ve bakır, demir, kobalt, mangan gibi metallerle reaksiyona girer. NO•, azot monoksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından L-argininin L-sitruiline dönüşümü yoluyla da üretilir. Bağışıklık sisteminin kontrolü ve sinyal iletiminde rolü vardır fakat iltihap ve doku hasarına sebep olabilir. NO•'in miktarı arttığında hücrelere zarar vermeye başlar ve serbest radikallerden süperoksit radikali ile, hidrojen peroksit ile reaksiyon verip NO₂/NO₃ (nitrit/nitrat), ONOO• (peroksi nitrit) moleküllerini oluşturur (Henry *et al.* 1991; Öztürk Sarıkaya 2009).

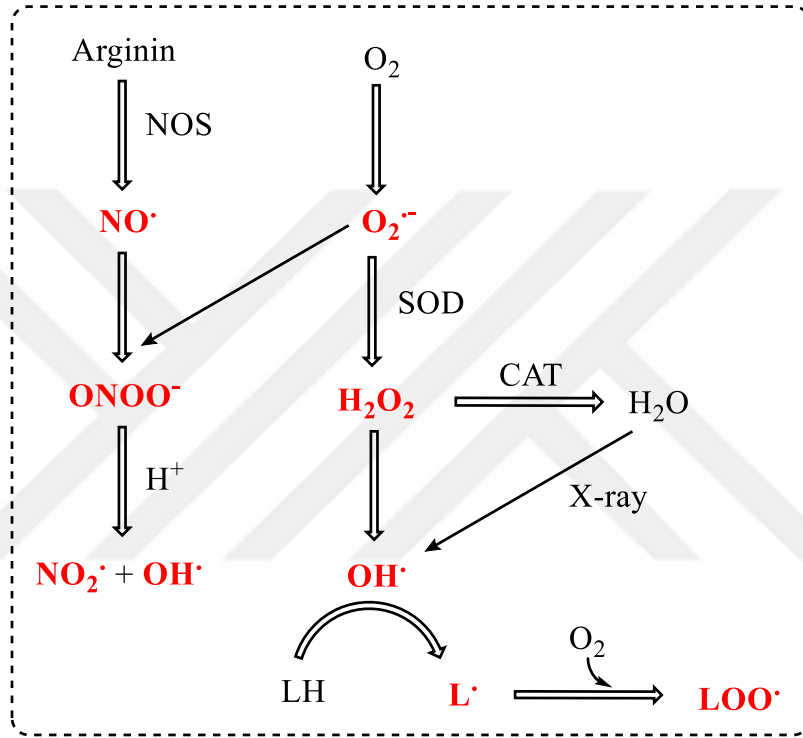
HOO• (hidroperoksil radikali), pH:4,8'de süperoksit radikaline bir H atomunun katılmasıyla oluşur ve kuvvetli oksidan özellik gösterir (Sharp *et al.* 2008).

LO• (lipid alkoksil radikali), lipid hidroperoksitlerin Fe²⁺ gibi geçiş metallerine elektron vermesiyle oluşur. LOO• (lipid peroksil radikali), demir iyonu aracılığıyla lipid hidroperoksitin indirgenmesi ile oluşabildiği gibi alkoksil radikalının peroksil radikaline dönüşümü ile de oluşabilir (Coffey *et al.* 1995; Doğru 2020). Lipid peroksil radikallerini E vitamini giderir.

H₂O₂, serbest radikal değildir. Fakat kolay bir şekilde oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olduğu için radikal sınıfında değerlendirilir. Hidrojen peroksit, süperoksitin bir elektron almasıyla veya oksijen molekülünün iki elektron almasıyla oluşabilir. Ayrıca peroksizomlarda bulunan oksidazlar çok miktarda H₂O₂ üretirler (Wang *et al.* 2021).

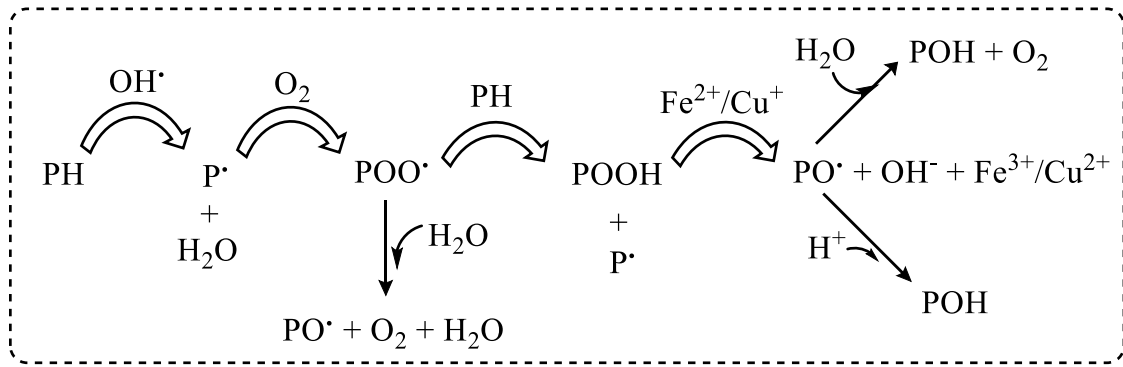


H_2O_2 , bakır ile ve proteinlerin hem gruplarındaki demir gibi metallerle reaksiyona girer ve serbest oksijen radikallerini oluşturur. Reaktif demir türleri güçlü oksitleyicidirler ve membranlarda lipid peroksidasyonunu başlatabilirler. H_2O_2 'nin fagositleri aktive etme, mesajcı molekül olarak davranma gibi faydaları vardır. H_2O_2 'yi katalaz ve peroksidaz enzimleri uzaklaştırır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sentetik olarak üretilen komplekslerin H_2O_2 giderme özellikleri araştırılmıştır. Pirouzmmand ve arkadaşları kobalt bazlı β -siklodekstrin kompleksinin hidrojen peroksiti giderdiğini belirtmişlerdir (Halliwell 1984; Pirouzmmand *et al.* 2022).



Şekil 3. Bazı reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Stahl and Sies 2002)

Serbest radikaller proteinleri direkt etkilerler. Etkilenme seviyesini proteinin amino asit içeriği belirler. Serbest radikaller, sülfür ve doymamış bağ bulunduran moleküllerle yüksek oranda reaksiyon verirler. Bu yüzden tirozin, triptofan, sistein, metiyonin, fenilalanin gibi amino asitleri bulunduran proteinler radikallerle çok kolay reaksiyona girerler. Oksidasyona uğrayan proteinler, son derece reaktif hidroperoksitleri meydana getirirler. Zamanla biriken oksidasyona uğramış proteinler değişik hastalıklara sebep olurlar (Ramsarma *et al.* 2003; Devasagayam *et al.* 2004; Sarma *et al.* 2010). $OH\cdot$, proteinlerin yapılarında modifikasyonların çoğundan sorumlu radikaldir. Serbest radikaller genellikle proteinlerin yan zincirlerinde, seconder ve tersiyer yapılarında değişikliklere sebep olurlar (Manassis *et al.* 2020; Rahman *et al.* 2020)



Şekil 4. Protein oksidasyonu mekanizması. PH: protein, POO•: protein peroksil radikali, POOH: protein peroksit, PO•: protein alkoksil radikali, POH: protein hidroksil türevi, P•: protein merkezli radikal

Yukarıda zararları bahsedilen ROS'leri, aslında normal aerobik canlı tarafından organizmaya yarar sağlamak üzere solunum, bağışıklık, redoksa bağlı sinyal düzenlemeleri için az miktarda ve sürekli olarak üretilirler (Gülçin 2006a; Shivakumar and Kumar 2018). Hasarlı ve kanserli hücrelerin ölümüne, mikroorganizmaların zararsız hale getirilmesine, enfeksiyonlara karşı savunmaya, büyüme sinyallerinin aktive edilmesine, hücre içi depolardan kalsiyum salınımına, ATP gibi moleküllerin biyosentezine yardım ederler (Karabulut ve Günay 2016). Hücre içindeki ROS'lerinin %90'ından fazlası mitokondri iç membranındaki oksijenli solunum reaksiyonları tarafından üretilir (Wei and Pang 2005). Düşük miktarlardaki ROS'leri, temel hücre aktivitelerinin düzenlenmesinde sinyal molekülleri olarak ve hücre büyümesinde, adaptif tepkilerin oluşmasında işlev görürler (Yan *et al.* 2020).

Antioksidanlar

Çeşitli sebeplerle canlı organizmada ortaya çıkan oksidanlara karşı vücutta doğal olarak savunma yapan maddeler vardır. Bu şekilde savunma mekanizmasının içinde olan bileşiklere “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar, serbest radikallerin hem oluşumlarını hem protein, lipid, nükleik asit gibi biyomoleküllere verebilecekleri zararları engellerler. Vücutta kalkan gibi hareket eden antioksidanlar, kendi elektronlarını verip radikalleri nötürleştirirken kendileri serbest radikal haline gelmemektedirler. Antioksidan etki gösterirken yükseltgendikleri için indirgeyici ajan olarak kabul edilirler. Yiyecek, içecek ve ilaçların bozulmasına sebep olan lipid peroksidasyonunu geciktirerek raf ömürlerini uzatırlar. Antioksidanlar, vücut organlarını serbest radikallerin oksidatif hasarından koruyan, oksidatif stresi azaltan, kanseri önleyen ve tedaviye yardım eden bileşiklerdir (Gülçin 2010; Higgins *et al.* 2020, Rahaman *et al.* 2023).

Metabolizmanın normal olarak işlev gördüğü durumlarda mitokondrideki sitokrom sistemi, organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korur. Eğer bu sistem yetersiz kalırsa doğal enzimler yardım eder. Eğer bu da yetersiz kalırsa oksidanlar hücre membranına saldırmaya başlar ve ilk olarak da lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Lipid peroksidasyonu, membranlardaki çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller tarafından aldehitler, alkoller, peroksitler gibi ürünlere parçalanmasıdır. Bunların içinde en çok biyolojik olarak oldukça aktif olan aldehitler oluşur. Ya oldukları yerde ya da difüze olarak hücrenin başka yerlerine gidip orada hasarlara sebep olurlar. Böylece hasarlı duruma gelen hücrelerdeki lipidlerin görünüşleri, besin değerleri ve kaliteleri azalır. Daha da önemlisi ise bu durumda çeşitli hastalıklara giden yol açılmış olur. Eğer yeterli seviyede E ve C vitaminleri gibi antioksidan nitelikteki vitaminler alınırsa lipid peroksidasyonunun ve hücresel hasarların önüne geçilebilir. Antioksidanlar, serbest radikallerden vücudu koruyarak, biyomoleküllerin oksidasyonunu ve oksidatif olarak lipidlerin bozunmasını engelleyerek gıdaların kalitesini artırır. Bu nedenledir ki gıdaların bozulmasını geciktirmek amacıyla katkı maddesi olarak gıda sanayisinde sıklıkla kullanılırlar. Bu katkı maddeleri doğal ve sentetik olabilmektedir. Son zamanlarda sentetik olanların yan etkileri tespit edildiğinden ilgi doğal antioksidanlara kaymıştır. Özellikle bitkilerden hem doğal hem etkili antioksidan bulma ve bunun endüstride kullanılması yönündeki çalışmalar giderek artmaktadır. Çeşitli doğal antioksidanlar sebze, meyve ve tahıllarda bulunmakla birlikte yemeklere katılan baharatlar da iyi birer antioksidan kaynağıdır. Örneğin karabiberin soğuk algınlığı, nefes darlığı, öksürük, dizanteri, aralıklı ateş, basur, boğaz hastalıkları, iştahın artırılması ve sindirim gibi hastalıkların tedavisinde yardımcı olduğu belirtilmiştir. Halen insanlık için antioksidan kaynağı olarak daha çok karada yetişen kiraz, vişne, çilek, domates, kavun, şeftali, portakal, havuç, greyfurt, avokado, karnabahar, zeytinyağı gibi gıdalar kullanılmaktadır. Bunun yanında mikroalg türleri de önemli antioksidan bileşiklere sahiptirler (Halliwell 1991; Prior and Cao 2000; Benzer ve Ozan 2003; Gülçin vd 2005a; Gülçin 2005b; Rahaman *et al.* 2023).

Antioksidanlar farklı mekanizmalarla oksidanlara karşı savunma yaparlar. Bu etki mekanizmaları aşağıdaki gibidir (Opara 2002; Gökpinar vd 2006):

- Baskılayıcı (söndürücü) etki: Oksidanlara H atomu vererek aktifliklerini azaltır ya da durdururlar. Bazı vitaminler, flavonoidler ve mannitol, baskılayıcı etki yaparlar.

- Onarıcı etki: Oksidatif reaksiyonlar sonucu zarar gören biyomolekülleri onararak yenilenmelerini sağlarlar.

•Giderme etkisi (süpürücü etki): Oksidanları başka güçsüz bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirirler. Mikromoleküller ve antioksidan enzimler giderici etki gösterirler.

•Zincir kırıcı etki: Radikalleri kendilerine bağlayıp inaktive ederek zincir kırıcı etki gösterirler. Mineraller, hemoglobin, seruloplazmin bu gruptandır.

•Kinaz kayıplarını önleme: Oksidasyon tepkimelerini durdurarak etki ederler.

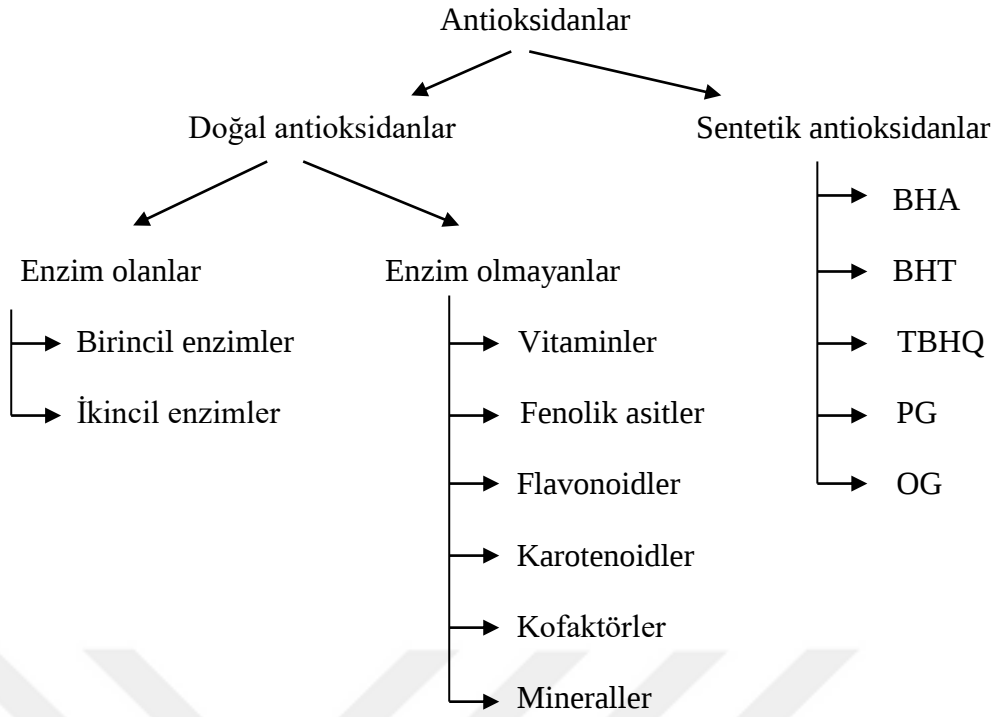
•Enzim etkisi: Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerle antioksidanların bağlanma oranını yükselterek etki gösterirler.

Çeşitli ekstraktların ya da bileşiklerin ne kadar antioksidan kapasiteye sahip olduğunu belirlemek için *in vitro* olarak laboratuvar ortamında antioksidan kapasite belirleme uygulamaları yapılmaktadır. Daha önce test edilip antioksidan etki bakımından yüksek değerlere sahip olduğu belirlenen α -Tokoferol, BHA, BHT, Troloks gibi bileşikler standart olarak kullanılıp farklı numunelerin antioksidan kapasitesi kıyaslanarak özellikle sağlık açısından faydalı olabilecek yönleri ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Antioksidan kapasite metotlarında başlıca iki tür reaksiyon mekanizması vardır (Huang *et al.* 2005; Prior *et al.* 2005):

•Tek elektron transferi yapılan reaksiyonlar (SET)

•Hidrojen atomu transferi yapılan reaksiyonlar (HAT)

Ayrıca her iki mekanizmayı içeren reaksiyonlar da vardır. HAT temelli metotlarda radikal üreten radikal başlatıcı vardır. Reaksiyon ortamına radikalın hedefinde olan molekül ve antioksidan eklenir. Radikalın hedefinde olan molekül yerine, ortamda olan antioksidan madde radikale H atomu verir. Böylece radikalın hedef moleküle vereceği zarar engellenmiş ya da azaltılmış olur. SET temelli metotlarda antioksidan, oksidana bir elektron vererek indirger. Bu reaksiyonlar sonucunda genellikle renk değişimi olur. Bu renk değişimi antioksidan derişimi ile orantılıdır. Sonuçta oluşan renkli bileşik belirli bir dalga boyunda absorbands verir (Huang *et al.* 2005). Antioksidanlar Şekil 5'teki gibi sınıflandırılırlar (Bensid *et al.* 2022).



Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması

Doğal Antioksidanlar

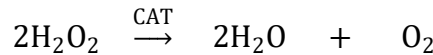
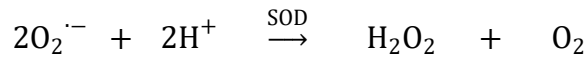
Doğal antioksidanlar, yeşil sebzeler başta olmak üzere kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, baklagillerde, tohumlarda, bitkilerin tohum, gövde ve yapraklarında, köklerde, çiçeklerde bulunurlar. Yine A, B, C ve E vitaminlerini içeren bazı besinlerde de bulunurlar. Doğal antioksidanların ana kaynağı bitki fenolikleridir. Sekonder metabolit olan bu fenolikler; flavonoidler, esansiyel yağlar, alkaloidler, lignanlar, terpenler, terpenoidler, tokoferoller, fenolik asitler, polifonksiyonel organik asitler, peptidlerdir. Bu bileşikler bitkilerin kök, yaprak, kabuk gibi bütün kısımlarında, ayrıca çekirdek, meyve, sebzelerde normal metabolik yollarla üretilir. Bu metabolitler, bitkileri istenmeyen etkilerden korumada etkin rol oynarlar. İnsan diyetinde de antioksidan aktiviteye sahip olan birçok farklı bileşik vardır ve bunların yapısal özelliklerine göre ROS'ni giderdiği öne sürülmüştür. Diyet antioksidanlarının en önemli temsilcileri tokoferoller, C vitamini, flavonoidler ve karotenoidlerdir. C vitamini hariç bu antioksidanların her bir grubu yapısal olarak farklı bileşikler içerir. Örneğin bugüne kadar 600'den fazla farklı karotenoid tanımlanmıştır. Diyetle bu çeşitli diyet bileşiklerinin sinerjik etkileri olabilir. Fakat bu sinerjiyi değerlendirmek zordur. Aslında diyet bir orkestra gibi düşünülebilir ki bireysel özellikleri gerekli olmadan bileşenlerin kendi aralarında etkileşimler meydana gelebilir. Meyve ve sebzelerle beslenmenin katarakt, Alzheimer hastalığı, diyabet, kalp-damar, bazı

kanser türleri gibi hastalıklara yakalanma oranını azalttığı yapılan araştırmalarla desteklenmiştir (Kalkan 2007; Gülçin 2007a; Gülçin 2012).

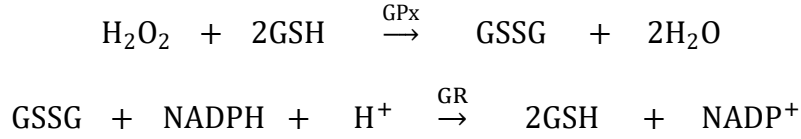
H₂O₂ gideren katalaz (CAT, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon s-transferaz, sitokrom oksidaz, hidroperoksidaz, sitokrom-C-oksidad, ferritin, transferin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürik asit, hemoglobin, albümin, melatonin, laktoferrin, miyogloblin, seruloplazmin, metiyonin, N-Asetil sistein, E vitamini (tokoferoller), C vitamini (askorbik asit), A vitamini, β-Karoten, doğal antioksidanlardır. Bunların içinde en önemlileri glutatyon, katalaz ve süperoksit dismutazdır (Panglossi 2006; Bursal 2009; Higgins *et al.* 2020; Akbari *et al.* 2022).

Doğal antioksidanlar, enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır. Enzim olan antioksidanlar birincil ve ikincil olarak ayrılırlar. Katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz birincil antioksidan enzimlerdir. Bunlar doğrudan ROS'nin inaktif hale gelmelerini katalizlerler. Glutatyon redüktaz (GR), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri ikincil antioksidan enzimlerdir. Bunlar serbest radikalleri hemen gidermezler, fakat diğer antioksidanların aktivitelerini artırırılar (Bensid *et al.* 2020).

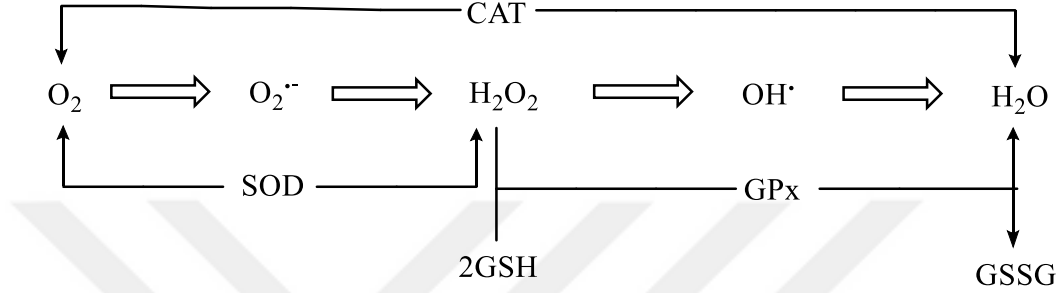
SOD, süperoksiti H₂O₂ ve O₂'ye çevirir. Böylece hücreleri O₂'nin zararına karşı korumuş olur. SOD'un üç sınıfı vardır: 1.Hücrelerarası SOD. 2. MnSOD. 3. Cu/ZnSOD. Cu/ZnSOD, sitozolde bulunur ve daha çoktur. CuSOD, mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. SOD'un sebep olduğu H₂O₂'yi katalaz suya indirger. Katalaz, hidrojen peroksitin hidroksil radikallerini meydana getirmesini engeller ve hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. CAT, Fe atomu içerir ve insanlarda tüm doku ve organlarda bulunur (Arosio *et al.* 2000; Reddi *et al.* 2009; Kandemir vd 2017; Meitha *et al.* 2020).



İndirgenmiş glutatyon (GSH), insan dokularındaki ana antioksidandır. Hücrelerden OH[•], NO[•], ONOO⁻, O₂^{•-} gibi oksidatif türleri giderir. GSH, glutatyon peroksidaz tarafından katalize edilen reaksiyonla H₂O₂'yi suya indirgerken kendisi oksitlenmiş glutatyon (GSSG) haline gelir. GSSG ise GR) katalizörlüğünde NADPH ile reaksiyona girerek yükseltgenmiş formdan (GSSG) indirgenmiş (GSH) forma dönüşür (Goulart *et al.* 2005; Şentürk vd. 2008; Zhang *et al.* 2013).



GPx, H₂O₂'yi, peroksitleri, lipid hidroperoksitleri, suya ve alkollere dönüştürür. Böylece hidroksil radikallerinin oluşumunu engellemiş olur. Başta karaciğer, eritrosit ve böbrek olmak üzere tüm doku ve hücrelerde bulunur (Sen and Chakraborty 2011; Kandemir vd 2017).



Şekil 6. Antioksidan enzimler tarafından reaktif oksijen türlerinin giderilmesi

Vücut içindeki savunma sistemini kuvvetlendirmek için dışarıdan alınan yardımcı antioksidan maddeler ekzojen antioksidanlardır. Bu bileşikler ya elektron vererek ya da geçiş metalleri ile şelat oluşturarak ROS oluşumunu azaltırlar (Zhang *et al.* 2021). Günlük diyetten alınabildikleri gibi ilaçlardan ve vitaminlerden de alınabilirler.

Bazı ekzojen antioksidanlar ve bunların kaynakları aşağıda verilmiştir (Da Costa *et al.* 2012).

E vitamini (tokoferol): Fındık tohumları, sebze yağı.

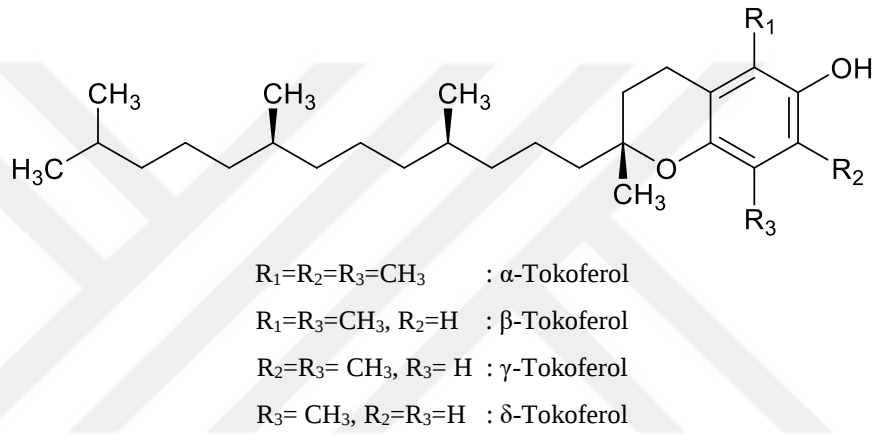
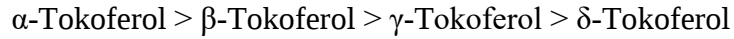
C vitamini (askorbik asit): Brokoli, dolmalık biber, kivi, çilek.

Karotenoidler (α ve β-karotenler): Yeşil yapraklı sebzeler (lahana, ıspanak), kırmızı meyve ve sebzeler (portakal, erik, kayısı, domates, havuç).

Polifenoller (fenolik asitler, flavonoidler): Elma, üzüm, soğan, lahana, kereviz, fasulye, fındık, kakao, çay, kahve.

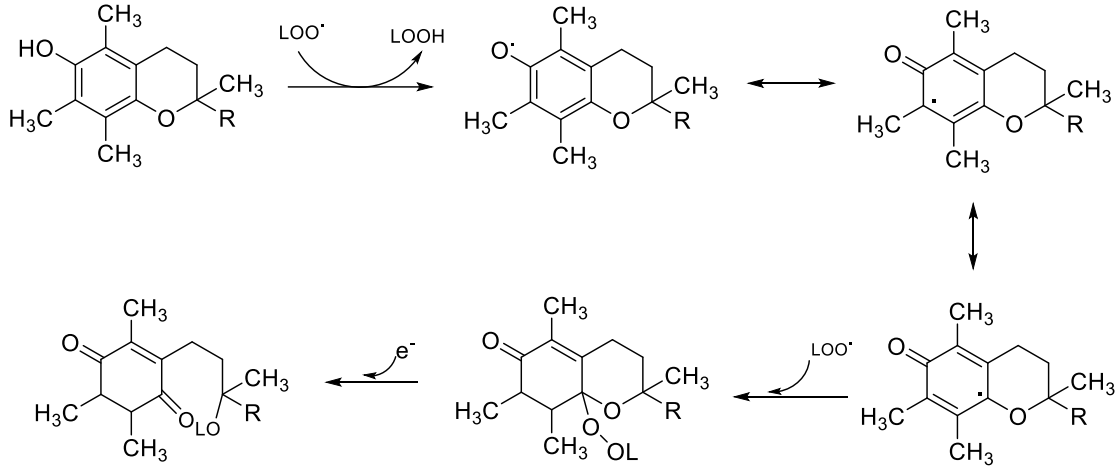
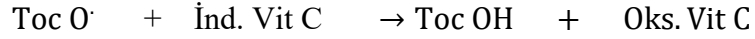
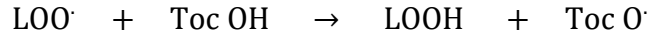
Vitaminler metabolizma için az miktarlarda gerekli olan, doğal gıda maddelerinde bulunan bileşiklerdir. Vitamin eksikliği vücutta çeşitli hasarlara ve hastalıklara sebep olur. Esansiyel yağ asitleri, amino asitler ve eser elementler vitamin olarak adlandırılmazlar. E vitamini (tokoferol), esansiyel olup, insan vücudu için gerekli olan bir besindir. Vücutta sentezlenmediği için dışarıdan alınmak zorundadır. Suda çözünmez, yağda ve organik çözücülerde çözünür. Vücuda alınan tokoferoller, ince bağırsaktan emildikten sonra

plazma lipoproteinlerine bağlanıp lenf sistemi ile dolaşıma girer. 8 izomere sahiptir. İnsan vücuduna en çok α - tokoferol ve ondan sonra da γ - tokoferol alınır. α -Tokoferol en güçlü antioksidan etkiye sahip izomerdir. Tokoferollerin kimyasal yapısı Şekil 7’de verilmiştir (Azzi 2019). Antioksidanların etki mekanizmalarından hem baskılama hem giderme hem onarma etkilerini kullanabilen önemli bir radikal gidericidir. Kalp rahatsızlıklarından, bazı kanser türlerinden, katarakt hastalıklarından korur, kırmızı kan hücrelerini korumaya yardım eder. Singlet oksijeni süpürür. Tokoferollerin, singlet oksijeni süpürme kapasiteleri büyüktür küçüğe doğru şu şekildedir (Chan *et al.* 1994; Van Der Meulen *et al.* 1997; Arai and Kono 2021):



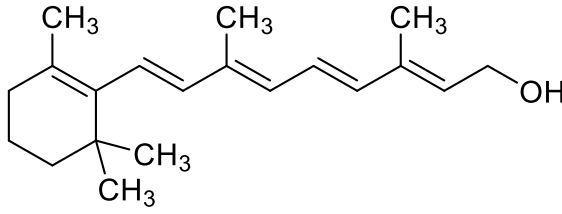
Şekil 7. Tokoferollerin genel kimyasal yapısı

E vitamini, diğer antioksidanlarla etkileşerek çalışabilen bir antioksidandır. Bu etkileşime E vitamininin yapısının uygunluğu; yani aromatik halka, OH grubu ve uzun bir kuyruğa sahip olması imkan verir. Bu etkileşim ile kendisi oksitlenmiş şeklinden normal haline döner veya tamamlayıcı etki ile radikalleri giderir. GPx ile tamamlayıcı etki gösterir. E vitamini peroksit sentezini engellerken glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri giderir. Tokoferolün antioksidan olarak en önemli rolü, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesidir. Lipid peroksil radikallerine hidroksil gruplarının H atomunu verip giderirler. Oluşan tokoferol radikali, aromatik halka üzerinde tek elektronun delokalizasyonu (Şekil 8) ile stabilize edilir (Gülçin 2020). α -Tokoferol, serbest radikallerin üretimini engeller, reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlar. C vitamini ile etkileşerek kararlı şekle gelir. Böylece lipidleri ve membranları korumuş olur. Gıdalarda ise oksidasyonu azaltmak için kullanılır (Packer 1991; Diplock 1998; Saldamlı ve Sağlam 1998; Gök ve Serterer 2003; Anıl 2006; Zhang *et al.* 2020; Liu *et al.* 2021).

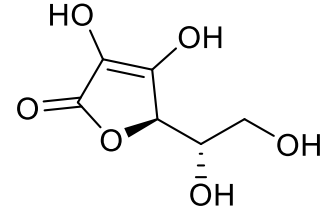


Şekil 8. α-Tokoferol'ün radikal süpürme mekanizması

C vitamini (Şekil 9), esansiyel bir vitamin olup suda çözünür. Yeşil renkli taze meyve, sebze ve turunçgillerde bulunur. Eksikliğinde iskorbüt hastalığı meydana gelir ve halsizlik, yorgunluk, ciltte morluklar, eklem ağrıları, kolay kanayan ve çekilen diş etleri gibi rahatsızlıklar ortaya çıkar. Günlük alınması gereken miktar erkekler için yaklaşık 90 mg, kadınlar için 75 mg olarak ifade edilmiştir. Beyindeki redoks dengesinin korunması için yüksek seviyede antioksidana ihtiyaç vardır. Beyinde bu işlevi gören ve en bol bulunan antioksidan glutatyonla beraber askorbattır. C vitamini, güçlü bir antioksidan ve indirgeyicidir. Kolayca elektron verdiği için ROS ile etkileşerek dehidro askorbat şekline girer. İndirgeyici olarak etki göstererek hidroksilasyon reaksiyonu gerçekleştirir. Midede demir emilirken ferrik demiri (Fe^{3+}), ferröz demire (Fe^{2+}) indirger. Hidroksil radikali, süperoksit radikali, peroksil radikali, hidrojen peroksit, hipoklorit, singlet oksijeni süpürür. Özellikle peroksit radikalini süpürerek lipid peroksidasyonuna engel olur ve membranları oksidatif hasara karşı korur. Elektron transferi ile radikal zincir reaksiyonlarını keser. Yara iyileşmelerinde etkili olup bağışıklık sistemine yardımcı olur. Kanserin ve kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltır. Fakat ferröz demiri oluşturarak fenton reaksiyonu ile hidroksil radikalinin oluşumuna sebep olabilir (Akkuş 1995; Azzi 2019; Kazmierczak-Baranska *et al.* 2020).



A vitamini



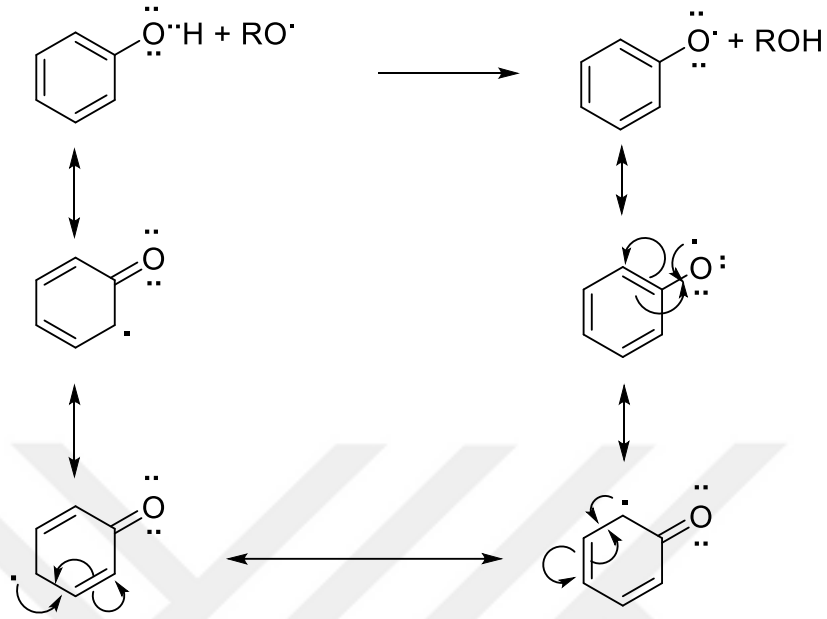
C vitamini

Şekil 9. A ve C vitaminlerinin kimyasal yapıları

A vitamini (retinol), organik çözücülerde ve yağda çözünür, suda çözünmez. Saf halinde iken sarı kristal şeklindedir. A vitamininin öncü bileşikler “retinoidler”dir. Üreme, büyüme, görme ve epitelyum dokunun sağlamlığı için gerekli olan bileşik grubudur. Retinol, retinal, retinoik asit ve β -Karoten bu grupta yer alır. A vitamininin hammaddesi olan β -karoten, bağırsaktaki epitel hücrelerinde A vitaminine dönüşür. Süpürücü etki ile radikalleri gidererek kansere karşı koruma sağlayan genel karotenoid ailesi, kanserin yanında UV ışıklarının, kimyasalların sebep olduğu tümörlere karşı koruma sağlar ve bağışıklık sistemini güçlendirirler. Retinoidler, reaktif oksijen radikallerini ve serbest radikalleri polien zincir atomlarındaki α -karbonundan protonun ayrılmasını sağlayarak süpürürler. Polien zincirinde singlet oksijeni fiziksel bir mekanizma ile giderirler. Singlet oksijenden termal enerjiyi alarak bu enerjiyi polien titreşimi ile serbest bırakırlar (Gökpınar ve Göksan 2002; Frei 2012; Maoka 2020; Gonzales-Peria *et al.* 2023).

Fenolik bileşikler, bitkilere yayılmış çok amaçlı biyoaktif bileşikler olarak bilinir. Sekonder metabolit olarak adlandırılırlar (Rochetti *et al.* 2022). Canlı için birinci derecede gerekli olmayan bileşiklerdir. En az bir aromatik halka ve bu halkanın etrafında bir ya da daha fazla OH grubu içerirler. Bütün bitkilerde ve bitki kaynaklı ürünlerde yapısal olarak farklı olan binlerce fenolik bileşik bulunmaktadır. Sebze, meyve, çiçek, dal, yaprak, gövde, tohumlarda bol miktarda bulunurlar. Fenolik bileşikler bitkilerden başka mikroorganizmalarda, mantarlarda hatta hayvan dokularında da bulunurlar. Bunların çoğu, insan diyetinin ayrılmaz bir parçasıdır. Aynı zamanda ilaç yapımında da kullanılırlar. Bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetini vererek aroma ve tatlarına katkı sağlarlar. Acı ve burukluk veren maddelerdir. Diğer bir kısmı ise renk oluşumuna etki ederler (Coşkun 2006). Fenolik bileşiklerin antioksidan, antikanserojenik, antimutajenik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve diğer biyolojik özellikleri içeren sağlık koruyucu etkileri vardır. Özellikle antioksidan madde olarak etki gösterirler. Serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatör olarak davranırlar (Stevenson and Hurt 2007). Yapılarında bulunan OH gruplarındaki H atomunu hızlıca lipid radikallerine vererek zincir reaksiyonlarını

sonlandırılır (Michalak 2006). Fenolik bileşikler halka yapılarındaki rezonans kararlılığı ile elektron delokalizasyonu sayesinde radikal haline gelmezler ve böylece antioksidan etki gösterirler. Fenolik bileşik sınıfları Tablo 2’de verilmiştir (Gülçin 2020).

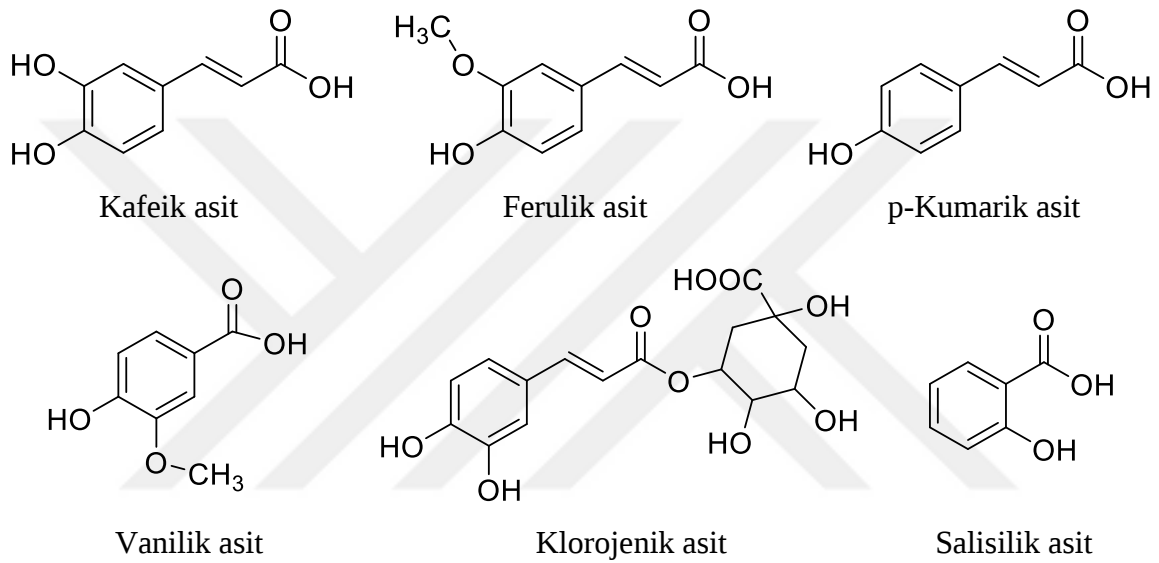


Şekil 10. Fenol radikalının rezonans kararlılığı

Tablo 2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

- | |
|-----------------------------------|
| 1. Fenolik asitler |
| a. Hidroksibenzoik asit türevleri |
| b. Hidroksisinamik asit türevleri |
| 2. Flavonoidler |
| a. Flavonlar |
| b. Flavonoller |
| c. Flavanonlar |
| d. Flavanonoller |
| e. İzoflavonlar |
| f. Flavanoller |
| g. Antosiyanidinler |
| 3. Karotenoidler |
| 4. Stilbenler |
| 5. Kumarinler |
| 6. Lignanlar |
| 7. Taninler |

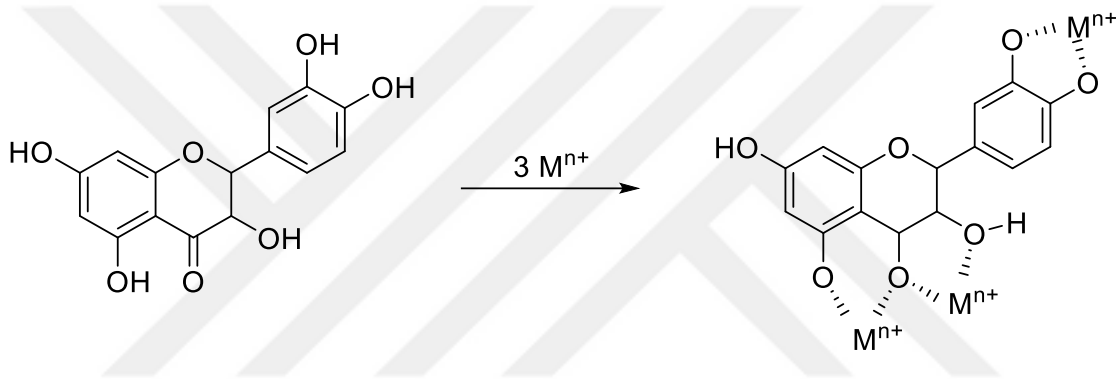
Fenolik asitler, benzoik asit ve sinnamik asit gruplarından ortaya çıkan aromatik karboksilik asitlerin hidroksi türevleridir. Ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, vanilik asit, salisilik asit, gallik asit, rosmarinik asit, sirinjik asit, sinapik asit, p-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit gibi fenolik asitler bitkilerde yaygın olarak bulunurlar (Öztürk Sarıkaya vd 2010). İnsan diyetinin önemli bir kısmını teşkil ederler. Bitki kaynaklı gıdalarda ve hemen hemen bütün bitkilerde bulunurlar. Bitkilerde serbest ve bağlı olarak bulunan diyet fenoliklerinin yaklaşık %30'unu oluştururlar (Robbins 2003). İnsan diyetindeki ortalama fenolik asit alımının diyet alışkanlıklarına ve tercihlere bağlı olarak günlük 200 mg olduğu rapor edilmiştir (Clifford and Scalbert 2000).



Şekil 11. Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapıları

Fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri, aromatik halkaya bağlı hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna bağlıdır. Hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit olmak üzere iki ana grubu vardır. Sinnamik asit türevleri, benzoik asit türevlerinden daha etkili antioksidanlardır. Sinnamik asitteki aromatik halkaya bağlı $-\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$ grubunun varlığı, benzoik asitteki $-\text{COOH}$ grubundan daha büyük bir antioksidan kapasite sağlar (Cuppett *et al.* 1997). Fenolik asitler, serbest radikal oluşumunu önlerler, oksidatif hasara, ve çeşitli hastalıklara karşı koruma yaparlar. Bir fenolün omurga yapısında farklı substitüentlerin varlığı, onların antioksidan özelliklerini bilhassa da H atomu verme kapasitesini değiştirir. Monofenol, polifenolden daha az etkili antioksidandır. Orto veya para pozisyonundaki elektron veren grup, örneğin hidroksil grubu fenolün antioksidan aktivitesini artırır (Chimi *et al.* 1991; Kiokias *et al.* 2020; Rashmi and Negi 2020).

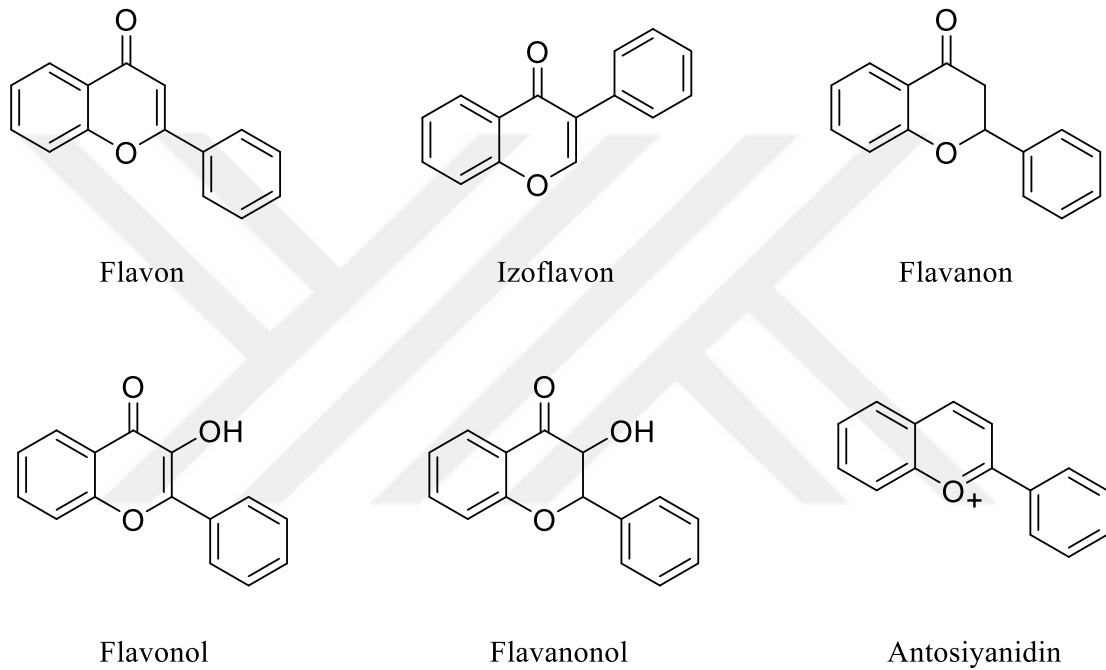
Flavonoidler, gıdalarda yaygın olarak bulunan, genellikle renk oluşumuna sebep olan 15 karbonlu polifenolik bileşiklerdir. Temel yapılarında C6-C3-C6 halka yapısı vardır (Formica and Regelson 1995; Shen *et al.* 2022). 5000'den fazla flavonoid olduğu belirtilmiştir (Bronze *et al.* 2012; Liu *et al.* 2021). Etkili antioksidan sınıfidırlar. Peroksil, süperoksit, alkoksil, nitrik oksit gibi radikalleri giderirler. Özellikle otooksidasyon reaksiyonlarını önlerler. Demir ve bakır elementleri ile şelat oluştururlar, α -tokoferol rejenerasyonu işlevini görürler. Bunun yanında antiinflamatuvar, antitümör, antiviral, antialerjik, antitrombotik etki de gösterirler. Kozmetik sanayisinde güneş kremlerine ve merhemlere katılırlar. Dericilikte tabaklama bileşeni olarak, et konserve ürünlerinde hızlandırıcı olarak kullanılırlar. Uranyum, zirkonyum, titan metallerinin analitik tayeinlerinde kullanılırlar (Sağıroğlu ve Özcan 2007).



Şekil 12. Flavonoidlerin metal şelatlama mekanizması

Flavonoidlerin, flavon, izoflavon, flavonol, flavanon, flavanol, flavanonol, antosiyanidin, kalkon olarak isimlendirilen alt sınıfları vardır. Flavonlar, domates, kırmızıbiber, karabuğday, kereviz, çay ve bazı meyve çeşitlerinde bulunurlar. Rutin, apigenin, luteolin, krisin bileşikleri bu gruptandır. İzoflavonlar, baklagillerde, soya fasulyesinde bulunurlar. Genistin, genistein, daidzin, daidzein, formononetin, biochanin A bileşikleri bu gruptandır. Flavanonlar, doymuş C halkasına sahiptirler, flavonların orta halkasında bulunan çift bağ flavanonların yapısında yoktur. Turunçgillerde ve limonda bulunurlar. Naringenin, naringin, hesperetin, erodiktiyol bileşikleri bu gruptandır. Flavanonol grubunda ise taxifolin bileşiğı vardır. Flavanoller, flavan-3-ol olarak isimlendirilirler ve kiraz, elma, kayısı, erik, çilek gibi çeşitli meyvelerde bulunurlar. Flavonoller, 3-hidroksiflavon olarak da isimlendirilirler ve diğer flavonoidlerden daha fazla OH grubu içerirler. Zeytinyağı, greyfurt, soğan, dut gibi gıdalarda bulunurlar. Kaemferol, kuersetin, tamarixetin, mirisetin, isoramnetin, morin, datiscetin bileşikleri bu gruptandır. Antosiyanidinler, çilek, dut, kiraz gibi meyvelerde bulunan doğal renk bileşikleridir. 650'den fazla antosiyanidin bileşiğı tanımlanmıştır. Meyve, sebze,

yaprakların mavi, kırmızı, mor, pembe renklerini verirler. Apigenidin, peonidin, petunidin, siyanidin, malvinidin, delfinidin, pelargonidin antosiyanidin grubunda olan bileşiklerdir. Proantosiyaniidinler polimerik bileşik grubudur. Kateşin-epikateşin etkileşiminden oluşanlar “prosiyanidin”; kateşin-gallokateşin etkileşiminden oluşanlar ise “prodelfinidin” olarak adlandırılır. Kateşinler, meyve çeşitlerinde, çayda bol miktarda bulunurlar. Enzimatik ya da kimyasal reaksiyonlarda oksijen ile birleşerek proantosiyaniidinleri meydana getirirler. Kalkonlar, flavonoidlerin öncü bileşikleri sayılırlar. Çeşitli bitkilerde bulunurlar (Shahidi and Naczk 1995; Göğüş ve Fadiloğlu 2006; Castaneda-Ovando *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Shen *et al.* 2022).

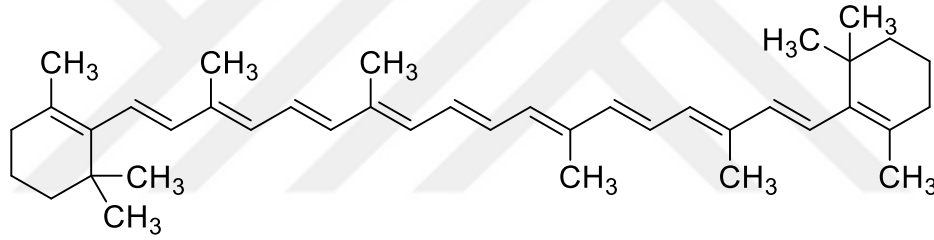


Şekil 13. Flavonoidlerin kimyasal yapıları

Karotenoidler, fenolik bileşiklerin alt sınıfında yer alırlar. 800’den fazla lipofilik pigmente sahip karotenoid bulunmuştur. Bitkiler, algler, bazı mantarlar, bakteriler ve fitoplanktonlar tarafından üretilirler. Portakal, domates, havuç, ıspanak, greyfurt gibi meyve ve sebzelerin turuncu, sarı, kırmızı, yeşil renklerini veren bileşiklerdir. Bunlardan yaklaşık 50 tanesi insan diyetinde yer almaktadır ve bunların en yaygın olanları β -karoten, α -karoten, likopen, lutein, β -kriptoksantin, zeaksantindir. Vücutta ince bağırsaktan pasif difüzyon ile emilirler. Hücreler arası iletişimde, hastalıkların önlenmesinde, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde görev alırlar. Hem hidrofilik hem de hidrofobik grup içerirler. Antikanserojen etkilerinden dolayı gıda sanayisinde kullanılırlar. Güçlü antioksidan sınıfından olup moleküler oksijeni ve peroksil radikallerini giderirler. Yapılarındaki konjuge çift bağların etkisiyle H_2O_2 oluşum hızını azaltırlar, serbest

radikalleri giderirler, singlet oksijeni bastırırlar, hücreyi oksidatif streten korurlar. Antioksidan kapasiteleri yapıdaki çift bağ sayısı arttıkça artmaktadır. Süper karotenoid olarak adlandırılan astaksantin, güçlü bir antioksidan olup *Haematococcus pluvialis*'ten elde edilmektedir (Gök ve Serteser 2003; Anıl 2006; Rowles and Erdman 2020; Liu *et al.* 2021).

En çok bilinen ve üzerinde en çok araştırma yapılan karotenoid, β -karoten'dir. β -Karoten (Şekil 14), havuç, mango, lahana, bal kabağı, portakal, sarı/turuncu meyvelerde, yeşil yapraklı bitkilerde bulunur. Karaciğerde palmitat esteri şeklinde depolanır. Etkili antioksidanlardan olup, süperoksit radikalini giderir, singlet oksijeni bastırır, peroksil radikalleriyle doğrudan reaksiyona girer. Zararlı ışınlara ve kansere karşı koruma yaptığı, immün sistemi desteklediği, tümörü inhibe ettiği, kardiyovasküler hastalıkların meydana gelme riskini azalttığı belirtilmiştir. Gıda ve ilaç endüstrisi için önemli bir antioksidan olup margarinlere ve peynir ürünlerine katılmaktadır (Akkuş, 1995; Kahyaoğlu ve Kıvanç 2007; Gülçin 2012).



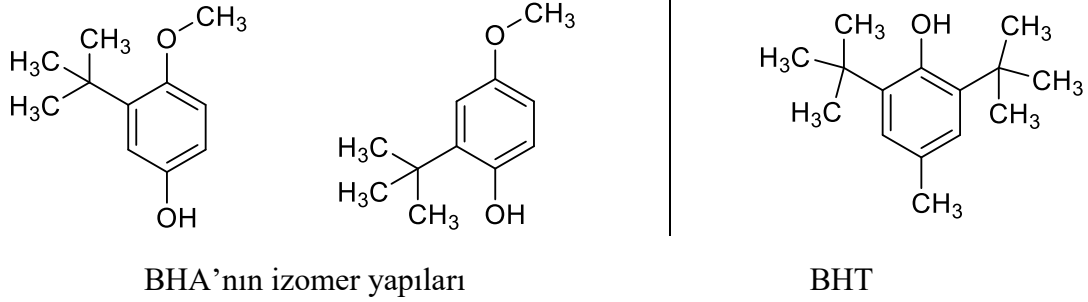
Şekil 14. β -Karoten'in kimyasal yapısı

Rezveratrol (Gülçin 2010), L-Adrenalin (Gülçin 2009), L-Karnitin (Gülçin 2006b), propofol (Gülçin vd 2005a), morfin (Gülçin vd 2004a), serotonin (Gülçin 2008), melatonin (Gülçin vd 2008), kurkumin (Ak ve Gülçin 2008), L-Tirozin, L-Dopa (Gülçin 2007), psoromik asit, usnik asit, vulpinik asit (Çetin Çakmak 2017), rutinhidrat (Koç 2019), olivetol (Taslimi 2017), filoretin (Teke 2016), izolikuritigenin (Çetinkaya 2016), tangeretin, genistein, formononetin, scopoletin, delphinidin chloride, pelargonidin chloride (Durmaz 2015), kapsaisin (Arabacı 2015), sinefrin, fenilefrin (Göçer 2014), oktopamin (Çağlayan 2013), apomorfin, timol, humik asit (Şehitoğlu 2012), rozmanirik asit (Nar 2011), elajik asit, gallik asit, ferulik asit, kuersetin, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, sirinjik asit (Öztürk Sarıkaya 2009) gibi fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi olduğu belirtilmiştir.

Sentetik Antioksidanlar

Gıda ve ilaç sektörlerinde kullanılırlar. Gıdaların raf ömrünü ve bozunmaya karşı dayanıklılıklarını artırmakla birlikte katı ve sıvı yağların çözünürlüğünü de artırır. Düşük maliyetli, yüksek performanslı olduklarından dolayı gıda endüstrisinde 70 yıldır kullanılmaktadırlar. Özellikle ürünlerin işleme ve depolama sırasında lipid peroksidasyonunun başlamasını geciktirmek veya önlemek, hayvansal katı yağ, bitkisel sıvı yağ, et, balık, patates vb. ürünlerde antioksidan olarak ve renk stabilizesinin sağlanması amacıyla kullanılırlar. Fakat aşırı kullanılmaları insan sağlığı açısından zararlıdır. En çok kullanılanlar, fenolik bileşik sınıfında olan Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT), Tersiyer Bütıl Hidrokinon (TBHQ), Propil Gallat (PG), Oktil Gallat (OG)'tır (Kim *et al.* 2016; Xu *et al.* 2021). Sentetik antioksidanlar, standart antioksidanlar olarak doğal numunelerin antioksidan aktivitelerinin ölçümünde de kullanılırlar.

BHA ve BHT (Şekil 15), gıda ve farmakolojik uygulamalar için yaygın bir şekilde kullanılır. BHA, özellikle kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmekte etkilidir. Et ve et ürünlerinin stabilizasyonunda askorbik asit ve gallatlarla beraber BHA da kullanılır (Lee *et al.* 2005; Jittrepotch *et al.* 2006). BHT, antioksidan ve antikanserojen olarak etki eder. Patates ürünleri ve kızartma yapılan işlemlerde BHA ve BHT kullanılır (Habib and Shah 2004). Yalnız her ikisinin de karaciğer hasarına ve yüksek seviyelerde kullanıldıklarında kansere sebep olduklarından şüphelenilmektedir. Bundan dolayı sentetik antioksidanlar hakkında güvenlik endişeleri artmış durumdadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, sentetik antioksidanların bu potansiyel toksik ve kanserojen etkilerinden dolayı gıda katkı maddelerindeki kullanımları sıkı bir şekilde denetlenmektedir ve gıda koruyucu olarak kullanılmaları yasal kurallarla sınırlandırılmıştır. Gıda ve ilaç sektörlerinde etkili doğal antioksidanlar, sentetik antioksidanların yerine kullanılarak sentetiklerin bu zararlı etkilerinin önüne geçilebilir. 1980'den beri doğal antioksidanlar sentetiklere alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Doğal antioksidanların faydalı etkilerinden dolayı gıda uygulamalarında doğal antioksidanlara karşı artan bir ilgi vardır ve müşterilerin tercihi doğal antioksidanlara doğru artma eğilimindedir. Bundan dolayı antioksidanların doğal kaynaklardan keşfi için araştırmalara hız verilmiştir ve artık antioksidanlar kökenlerine dayalı olarak doğal ve sentetik olmak üzere iki grup halinde sınıflandırılmaktadır (Gülçin 2020).

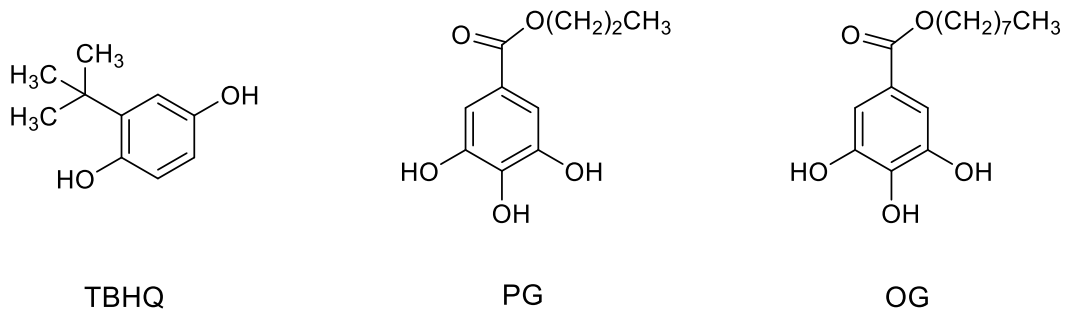


Şekil 15. BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları

TBHQ, et ürünleri, hayvansal yağlar, doymamış bitkisel yağlar için oldukça etkili bir koruyucudur. Hayvansal gıda ürünlerinin rengini, tazeliğini, besleyici değerini korur ve stabilize eder. Demirin varlığında bile renk bozulmasına neden olmaz. Ayrıca eklendiği maddenin tadını ve kokusunu değiştirmez. Bazı çalışmalarda BHA ve BHT'den daha etkili bir antioksidan olduğu rapor edilmiştir. TBHQ'daki iki para-hidroksil grubu antioksidan aktivitesinin ana ajanlarıdır.

PG, yağları ve yağ içeren gıdaları, peroksit kaynaklı acılaşmadan koruyan bir antioksidan olarak kabul edilir. Gıda ve kozmetik ambalaj malzemeleri, yenilebilir yağlar, mayonez, basınca dayanıklı yapıştırıcılar, fırınlanmış ürünler, yağlama yağı katkı maddelerinin stabilizasyonu için 1948'den beri kullanılmaktadır. Ancak karaciğer toksisitesi ve kansere neden olduğu rapor edilmiştir.

OG, 1-oktanol ve gallik asidin esteri olan bir antioksidan ve gıda koruyucudur. BHA, TBHQ, PG'nin nükleik asit ile moleküler kompleks oluşturduğu ve DNA'nın çift sarmal yapısına zarar verdiği rapor edilmiştir. BHT ve PG, kanserojen ve toksiktir. Bu bileşiklerin vücutta, organlarda, dokularda, hücrelerde birikmeleri gibi metabolizmaları ile ilgili artan güvenlik endişelerinden dolayı müşteriler için kabul edilebilirlikleri azalmıştır (Liu and Mabury 2020; Xu *et al.* 2021).



Şekil 16. TBHQ, PG ve OG'nin kimyasal yapıları

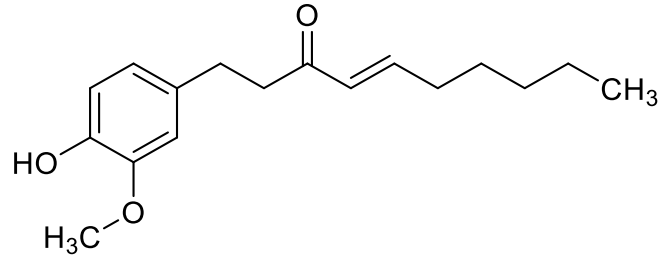
Oksidatif Stres

Canlı sistemlerde normal işleyişte oksidanlar ile antioksidanlar arasında denge vardır. Bu dengenin çeşitli sebeplerle bozulması sonucu oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidasyona sebep olan reaktif türlerin hücre içerisinde konsantrasyonunun artması ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasıyla oluşan durum “oksidatif stres” olarak tanımlanır. Serbest radikaller ($\text{OH}^\cdot$, $\text{ROO}^\cdot$, $\text{RO}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$ vb.), radikal olmayan reaktif oksijen türleri (HOCl , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 vb.), radyasyona ve UV ışınlarına maruz kalma, ilaç kullanımı, alkol ve sigara kullanımı, immunolojik reaksiyonlar ve yağların oksidasyonu sonucu oksidatif stres meydana gelebilmektedir. Oksidatif stres durumunda hücrelerin normal düzeni bozulur. Özellikle ROS’leri antioksidan savunma sistemini alt edip lipid, protein, karbohidrat, DNA gibi biyomoleküllerin oksidatif olarak değişmesine, dokuların hasar görmesine, toksik etkilere, sinyal iletilerinde aksaklıklara sebep olarak sonuçta kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, diyabet, parkinson, kanser, ateroskleroz, zihnin ve bedenin erken yaşlanması gibi birçok hastalığın oluşumuna yol açarlar. Radyasyon, ağır metaller, yüksek basınç ortamı, oksidatif stresi artırmaktadır. Artan oksidatif stres sonucu koroner kalp hastalığı, obezite, tip 2-diyabet, katarakt, hipertansiyon gibi birçok hastalık ortaya çıkar (Apak vd 2016; Üner ve Yılmaz 2021, Apak *et al.* 2022; Konovalov *et al.* 2022).

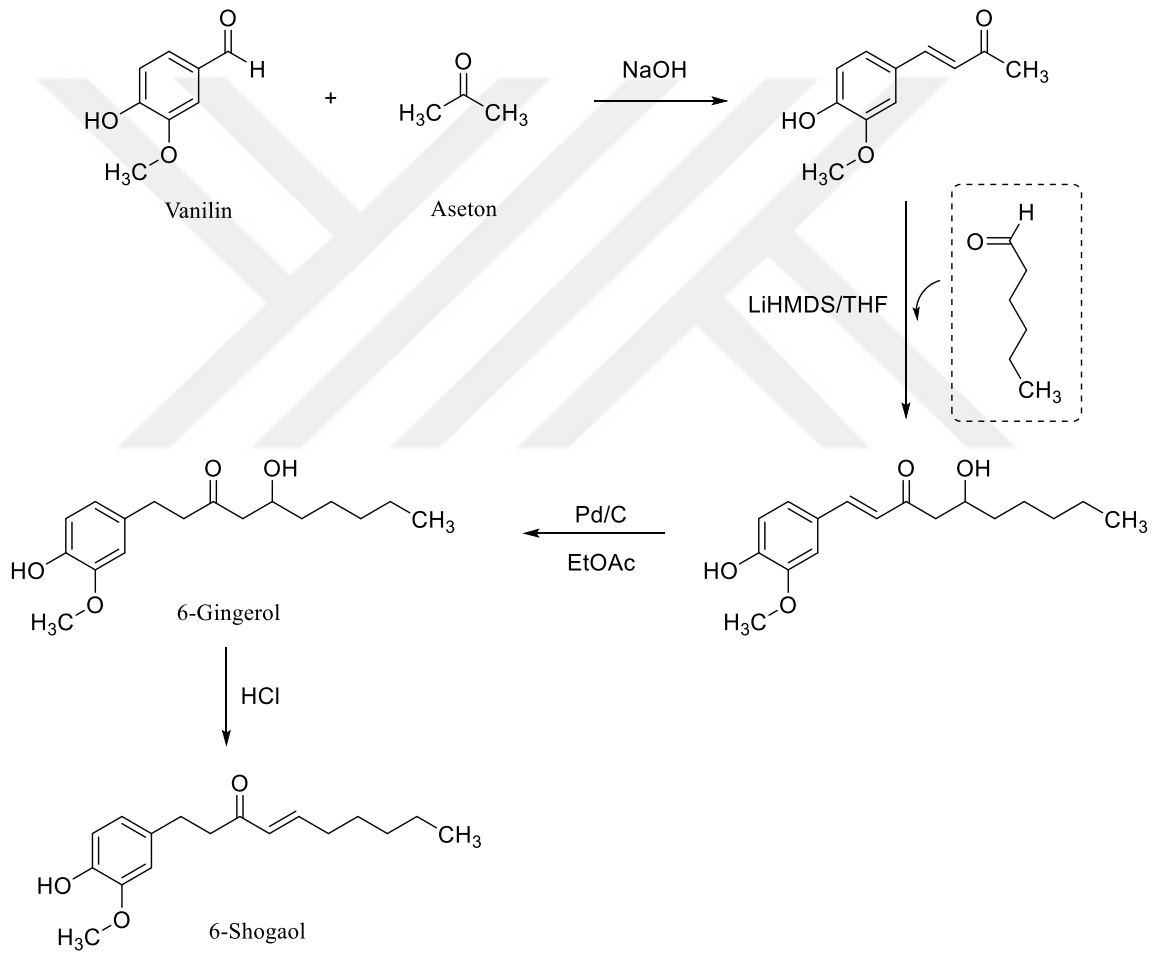
6-Shogaol

Tercih edilen IUPAC adı 1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4-deken-3on olan 6-Shogaol (Şekil 17), $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$ kapalı formüle sahip, molekül ağırlığı 276,37 g/mol olan fenolik bir bileşiktir. Yapısında bir adet aromatik halka vardır. Aromatik halkaya bağlı, bir karbonil grubu ve bir çift bağ içeren on karbonlu alifatik zincir vardır. Alifatik zincirde karbonil grubu üçüncü karbondan, çift bağ ise dördüncü karbondadır. Bu alifatik zincire meta pozisyonunda bir metoksi grubu, para pozisyonunda ise bir OH grubu bulundurulur. Uçucu bir bileşik değildir. 6-Gingerol’ün dehidratasyona uğramış şeklidir. 6-Shogaol’ün yanı sıra homolog şeklinde 8-Shogaol, 10-Shogaol formları da vardır (Şekil 19). 6-Shogaol’ün, vanilin ve asetondan başlanarak sentezi yapılabilir (Shih *et al.* 2014). Shogaoller, gingerollerle beraber zencefil (*Zingiber officinale*)’in kök ve gövdesinin ana biyoaktif bileşikleridir (Demirpolat 2014; Ghasemzadeh *et al.* 2015). Keskin aromaya sahiptirler. Shogaollerin antioksidan ve antikanser aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir. 6-Shogaol antioksidan (Li *et al.* 2012), antikanser (Haniadka *et al.* 2012), antiinflamatuvar (Shim *et al.* 2011) özelliklerinden dolayı çok ilgi görmektedir. Akciğer kanseri (Hung *et al.*

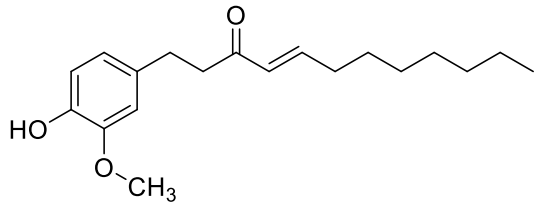
2009), kolorektal kanser (Pan *et al.* 2008), hepatokarsinoma (Weng *et al.* 2012), göğüs kanseri (Ling *et al.* 2010), A-549 (Demirpolat 2014) gibi kanserli hücrelere karşı apoptozu indüklediği belirtilmiştir.



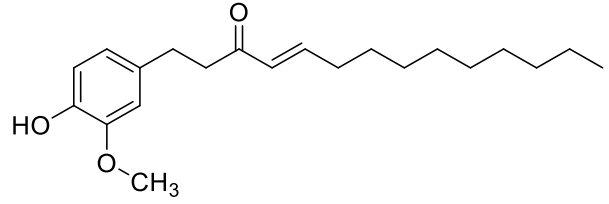
Şekil 17. 6-Shogaol'ün kimyasal yapısı



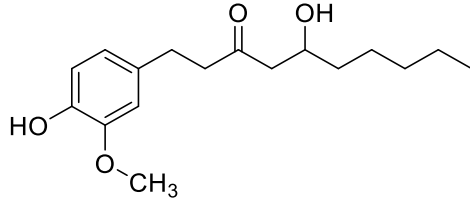
Şekil 18. 6-Shogaol'ün sentezi



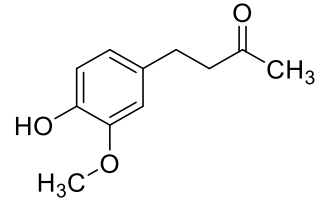
8-Shogaol



10-Shogaol



6-Gingerol



Zingeron

Şekil 19. 8-Shogaol, 10-Shogaol, 6-Gingerol ve Zingeron'un kimyasal yapıları

Zencefil (*Zingiber officinale*) (Şekil 20), dünya genelinde hem gıda hem ilaç olarak kullanılan bir bitkidir. Gıdaların tadına ve lezzetine katkı sağlayan yaygın bir diyet faktörüdür. 2000 yıl öncesinden beri baharat olarak kullanılmaktadır. Mide bulantısı, kusma, baş ağrısı, soğuk algınlığı, özellikle de gastrointestinal hastalıkların tedavisinde eskiden beri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda zencefilin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikanserojen, antiapoptotik, immünomodülatör, antihiperglisemik, analjezik etki gösterdiği belirlenmiştir. Zencefil üreten başlıca ülkeler Endonezya, Hindistan, Çin ve Nijerya'dır. Zencefilde ayrıca paradol, zingerone, zerumbone, 1-dehidro-(10) gingerdion, terpenoid, flavonoidler de vardır (Bhattarai *et al.* 2007; Rahmani 2014; Li *et al.* 2016; Rahaman *et al.* 2023).



Şekil 20. Zencefil bitkisi

Enzimler

Enzimler, canlılardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeyen biyolojik katalizörlerdir. Katalizledikleri reaksiyonları 10^8 - 10^{20} kat arasında hızlandırırlar. Katalizör olmalarının yanında DNA'daki şifrelerin aktarımı görevinde de bulunurlar. Enzimlerin çok büyük bölümü protein yapısındadır. Çok az bir kısmı ise ribozimdirler. Canlı hücrelerindeki bütün kimyasal reaksiyonlar enzimler vasıtasıyla gerçekleştirilir. Enzimi olmayan reaksiyon hemen hemen meydana gelmez.

2000'den fazla enzimin varlığı tanımlanmıştır. Fakat genetik çalışmalar bu sayıdan çok daha fazla enzimin var olduğunu göstermektedir. Enzimler uluslararası enzim komisyonu (E.C.) tarafından katalizledikleri reaksiyon türleri ve reaksiyonların mekanizmalarına göre sınıflandırılmıştır. Bunun sonucunda enzimler 6 sınıfa ayrılmıştır (Bastem 2019):

1. Oksidoredüktazlar: İndirgenme-yükseltgenme (redoks) reaksiyonlarını katalizlerler.
2. Transferazlar: Bir substrattan diğer substrata hidrojen dışındaki grupların transferini katalizlerler.
3. Hidrolazlar: Peptid, glikozid, ester, anhidrit gibi bağların bir su molekülünün katılarak hidroliz edilmesini katalizlerler.
4. Liyazlar: Hidroliz mekanizması kullanılmadan substratlardan grupların ayrılması ve çift bağların oluşması reaksiyonlarını katalizlerler.
5. İzomerazlar: Yapısal, geometrik ve optik izomerlerin birbirlerine dönüştürülmesi reaksiyonlarını katalizlerler.
6. Ligazlar: Yüksek enerjili olan ve yapılarında fosfat grubu bulunan ATP (adenozin trifosfat), GTP (guanozin trifosfat) gibi bileşiklerden fosfat bağının kopması sonucunda açığa çıkan enerji ile iki molekülün bir birine bağlanması reaksiyonlarını katalizlerler.

Enzimlerin bu sistematik adlandırılmasının yanında biyokimyacılar, pepsin, tripsin, katalaz gibi enzimlerin geleneksel isimlerini hala kullanmaktadırlar. Yayınlarda sistematik isim de parantez içinde verilmektedir. Örneğin karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü katalizleyen karbonik anhidraz enziminin sistematik adı “karbonat hidroliyaz”dır. Fakat enzimin geleneksel adı olan karbonik anhidraz ismi daha çok kullanılmaktadır.

Kimyasal reaksiyonlarda aynı reaksiyonu katalizleyen fakat farklı kimyasal yapıda olan enzimler vardır. Bu enzimlere “izoenzimler” denir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı, substrat, kofaktör, inhibitörlere karşı ilgileri farklıdır. Laktat dehidrogenazın 5 farklı, karbonik anhidrazın ise 16 farklı izoenzimi vardır. İzoenzimlerin aminoasit sayıları ve dizilişleri, genleri, izoelektrik noktaları ve elektrik alanda hareketleri farklıdır.

Bazı enzimler katalizlemeyi sadece protein yapılarıyla yapabilirken bazıları ise ek gruplara ihtiyaç duyarlar. Protein yapısında olmayan bu gruplara “kofaktör” denir. Kofaktörler “metal iyonu” olabildiği gibi “koenzim” olarak adlandırılan organik bir bileşik de olabilir. Kofaktörsüz enzimlere “apoenzim” denir ve böyle bir enzim katalitik olarak aktif değildir. Enzimlerin yapısında bulunan metal iyonlarına çinko, magnezyum, mangan, demir, potasyum, sodyum, bakır örnek olarak verilebilir. Zn^{2+} iyonu karbonik anhidraz, alkol dehidrogenaz, karboksipeptidaz; Mg^{2+} iyonu fosfohidrolaz, fosfotransferaz; Mn^{2+} iyonu arginaz, fosfotransferaz; Fe^{2+}/Fe^{3+} iyonları peroksidaz, katalaz, ferredoksin; Cu^{2+}/Cu^{+} iyonları tirozinaz, sitokrom oksidaz; K^{+} iyonu piruvat fosfokinaz; Na^{+} iyonu plazma membran ATP-azı enzimlerinin yapısında bulunur. Kofaktör olarak görev yapan metal iyonları katalizlemede iki görev alabilir:

1. Enzim ile substrat arasında köprü olup kompleks oluşumunu sağlar.
2. Metal iyonunun kendisi katalitik görev görebilir.

Enzimlerin yapısında bulunan koenzimlere NAD^{+} (nikotinamid adenin dinükleotid), $NADP^{+}$ (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat), FAD (flavin adenin dinükleotid), FMN (flavin mononükleotid), koenzim Q (CoQ), koenzim A (CoA), TPP (tiamin pirofosfat), piridoksal fosfat örnek olarak verilebilir. Koenzimler genellikle atom veya fonksiyonel grup transferinde görev alırlar. NAD^{+} , $NADP^{+}$, koenzim Q, FMN, FAD koenzimleri H atomlarını (elektronları) taşır. TPP koenzimi aldehitleri taşır. Koenzim A ve lipoamid koenzimleri açıl gruplarını taşır. Kobalamin koenzimleri alkil gruplarını taşır. Piridoksal fosfat koenzimi amino gruplarını taşır. Biyositin koenzimi CO_2 'yi taşır. Tetrahidrofolat koenzimleri metil-metilen-formil gruplarını taşır. (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Enzimler hücre içinde ve hücre dışında etkilerini gösterebilmektedirler. Bazı enzimler hücrede sentezlendikten sonra katalizlemeyi yine aynı hücrede gerçekleştirirler. Bunlara “hücre içi enzimler” denir. Bazıları ise sentezlendikleri hücrenin dışına salınarak katalizlemeyi yaparlar. Bunlara da “hücre dışı enzimler” denir. Enzimlerin büyük bir kısmı hücre içi enzimleridir. Proteolitik bazı enzimler (pepsin ve tripsin vb.) hücre dışı

enzimlerdir. Bu enzimler sentezlendikleri hücreye zararlı olmamaları için katalitik olarak aktif olmayan “zimojen” veya “proenzim” şeklinde sentezlenip daha sonra zimojen aktifleşmesi ile aktif hale gelirler.

Enzimlerin katalizlemeyi yapıp ürüne dönüştürdükleri moleküllere “substrat” denir. Enzimler yapılarında bulunan aktif bölgedeki rezidülerle substratı bağlar ve enzim-substrat kompleksi oluşur. Katalizleme sonucunda substrattan ürün oluşur, enzim yapısı bozulmadan aynı kalırken reaksiyon sonlanır.



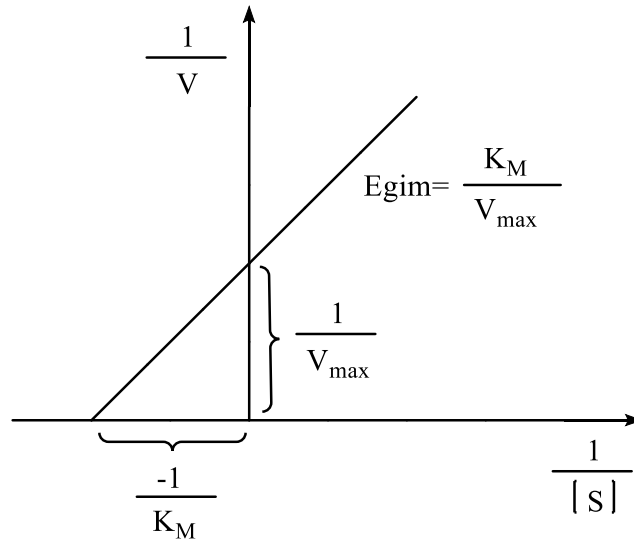
Enzimler, reaksiyonları yüksek oranda hızlandırdıklarından dolayı katalitik aktivitelerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Bir enzim hakkındaki katalitik bilgiler K_M ve V_{max} değerleri deneysel olarak bulunarak elde edilir. K_M , enzimin substrata olan ilgisini gösterir. Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu andaki substrat konsantrasyonudur. V_{max} ise enzimin katalitik olarak ne kadar aktivite gösterdiğini belirtir. Enzim kinetiği hakkındaki kantitatif bilgilerin elde edildiği denklem “Michaelis-Menten denklemi”dir. Farklı substrat konsantrasyonları için hızlar bulunur. Bulunan değerler denklemde yerine konarak K_M ve V_{max} değerleri belirlenir. Deneysel işlemler sırasında bazı hız değerleri yanlış hesaplanmış olabilir. Bu durum substrat konsantrasyonu-hız eğrisi grafiğindeki eğri üzerinde fark edilemeyebilir. Bu da K_M ve V_{max} değerlerini etkiler. Ayrıca her enzim için doygun substrat konsantrasyonu hazırlanamayabilir ve bu da eğrideki her noktanın hesaplanamamasına neden olabilir. Sonuçta K_M ve V_{max} değerleri hesaplanamaz. Bu sebeplerden dolayı Michaelis-Menten denklemi doğru denkleme dönüştürülür. Ortaya çıkan denkleme “Lineweaver-Burk denklemi” denir. Bu denklem $y=mx+n$ doğru denklemine benzer. x eksenini $1/[S]$, y eksenini $1/v$ ’dir. Doğrunun eğimi $m=K_M/V_{max}$ ifadesini verir. x ekseninin kesildiği nokta $-1/K_M$ ’ye, y ekseninin kesildiği nokta $1/V_{max}$ ’a eşittir. Bu denklem grafik halinde çizildiğinde ortaya çıkan grafiğe “Lineweaver-Burk grafiği” denir (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Michaelis-Menten Denklemi

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Lineweaver-Burk Denklemi

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Şekil 21. Lineweaver-Burk grafiği

Enzim aktivitesi birimi “enzim ünitesi” ile ifade edilir. 1 enzim ünitesi, 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarıdır ve EÜ ile gösterilir. Bazı enzimler için ise “spesifik aktivite” terimi kullanılır. Spesifik aktivite, enzim saflığının ölçüsüdür ve 1 mg proteindeki enzim ünitesidir (EÜ/mg protein). Ayrıca enzimlerin aktiviteleri için, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak ifade edilen “turnover sayısı” terimi de kullanılır.

Enzimin aktifliğine pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, inhibitör konsantrasyonu, aktivatör konsantrasyonu, kofaktör konsantrasyonu, iyonik şiddet etki eder. Her enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri vardır ve bu pH’nın altında ve üstünde enzim aktivitesi düşer. Örneğin katalaz için optimum pH 7,6’dır. Piruvat karboksilaz için optimum pH 4,8’dir. Enzimler belirli sıcaklıklar arasında aktivite gösterirler. Sıcaklık 50-60 °C’nin üzerine çıktığında enzim yapısında değişim olacağından dolayı aktivite düşer.

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından düşürülmesi ya da sonlandırılmasına “inhibisyon”, bu şekilde etki eden bileşiklere “inhibitör” denir. İnhibitörler iyon olabildiği gibi molekül ağırlığı düşük bileşikler de olabilir. Enzim inhibisyonu canlı sistemlerde önemli kontrol mekanizmasıdır. Zehirli bileşikler ve birçok ilaç, enzim inhibisyonu yolu ile etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Enzim inhibisyonu “dönüşümlü” ya da “dönüşümsüz” olabilir. Dönüşümsüz inhibisyonunda, inhibitör enzime ya kovalent bağlanıp ya da çok zor ayrışabilen bir kompleks oluşturarak enzimi inhibe eder. Örneğin zehirli bir sinir gazı olan diizopropilfluorofosfat,

asetilkolinesteraz enziminin aktif bölgesindeki serin amino asidi ile reaksiyon verir, enzim-diizopropilfosfo kompleksi oluşur ve enzim aktivitesini kaybeder.

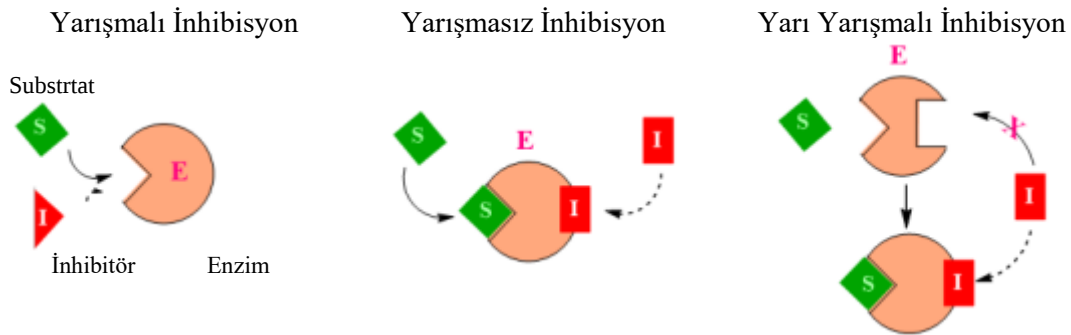
Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir:

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Yarışmalı inhibitörün yapısı substrata benzer ve inhibitör, enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substratla yarışır. Yarışmalı inhibisyonda substrat konsantrasyonu artırılırsa inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Böylece enzimin V_{max} değeri değişmez fakat yarışmalı inhibitör ES kompleks oranını azaltarak kataliz hızını düşürür, yani enzimin K_M değeri artar.

Yarışmasız inhibisyonda inhibitör substratla yarışmaz. Substrat konsantrasyonu artırılarak inhibisyon kaldırılamaz. İnhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı yere değil başka bir bölgeye bağlanır. Bundan dolayı ürün oluşur fakat katalizleme yavaşlar. Enzimin turnover sayısı düşer ve katalitik aktivite azalır. Enzim için K_M sabit kalırken V_{max} düşer.

Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör enzime değil enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. ES kompleksi sürekli olarak ortamdan uzaklaşacağı için K_M düşer. Ortamda sürekli enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi olacağı için V_{max} da düşer (Bastem 2019).



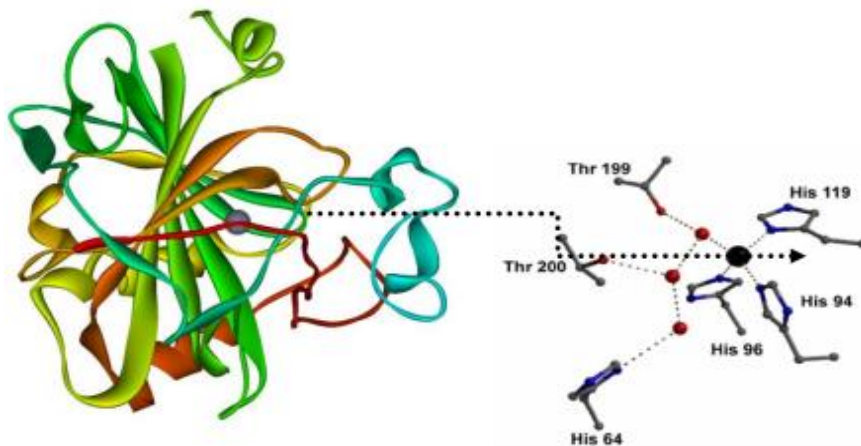
Şekil 22. Dönüşümlü inhibisyon türleri

Karbonik anhidraz

Sistematik adı karbonat hidrolizaz olan karbonik anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1), solunum olayında yer alan ve yapısında Zn^{2+} içeren bir metaloenzimidir. Molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa'dur. İlk olarak 1932 yılında keşfedilmiş ve yine ilk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Çinko iyonu içerdiği 1942 yılında bulunmuştur. Bu metal iyonu, aktiviteyi artırıcı rol oynamaktadır. CA, doku kılcal damarlarında karbondioksitin bikarbonata, akciğer pulmoner kapillerde ise bikarbonatın karbondioksite dönüşümünü katalizler. Eğer bu reaksiyon katalizörsüz olsa oldukça yavaştır. Enzimin katalitik bölgesinde yer alan Zn^{2+} iyonuna OH grubu bağlandığında enzim aktif hale gelir. Bu aktif form, CO_2 molekülü ile güçlü bir şekilde reaksiyona girer ve Zn^{2+} iyonuna bikarbonat bağlanmış olur. Sonra bikarbonat iyonu H_2O ile yer değiştirerek çözeltiye geçer. Karbonik anhidrazın bu reaksiyondaki rolünün haricinde asit-baz dengesini sağlama, kardiyovasküler düzenlemeler, iyon değişimleri ve CO_2 'nin suda çözünüp taşınması ve vücuttan atılması gibi rolleri de vardır (Göçer ve Gülçin 2011). Memelilerin eritrositlerinden izole edildikten sonra CA I ve CA II izoenzimleri şeklinde insan, balık ve fare eritrositleri, fare tükürüğü, tükürük bezleri, kas, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, endometrial dokular, sığır kemiği, sığır lökositleri, bakteri ve bazı bitki kaynaklarından saflaştırılmıştır (Göçer vd 2015a). Poliaminler, kumarinler, sülfonamidler gibi bileşikler karbonik anhidraz enzimin aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlanırlar ve aktiviteyi azaltırlar (Akıncıoğlu vd 2015).

Tablo 3. Karbonik Anhidraz Enziminin Çift Yönlü Etki Mekanizması

$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$	(Doku kılcallarında)
$H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O$	(Akciğer kılcallarında)



Şekil 23. Karbonik anhidraz enziminin katalitik bölgeleri (Göçer 2014)

Şekil 23'te görülen His 94, His 96 ve His 119 katalitik bölgenin elemanlarıdır. Ortadaki siyah büyük küre Zn^{2+} iyonunu, bu kürenin sol tarafındaki küçük küreler ise kristal yapıdaki H_2O moleküllerini belirtmektedir.

Karbonik anhidraz enziminin 16 izoenzimi vardır. CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII izoenzimleri sitozolde bulunur. CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV izoenzimleri membrana bağlı, CA V mitokondri matriksinde, CA VI tükrük salgısında bulunur. CA VIII, CA X, CA XI izoenzimlerinin katalitik olmadığı belirtilmiştir (Beydemir ve Gülçin 2004). En çok araştırma yapılan izoenzimler CA I ve CA II'dir. CA II'nin saflaştırılması daha kolaydır. Bundan dolayı hem ucuzdur hem de çok yaygın olarak kullanılır. CA II'nin turnover sayısı $25^{\circ}C$ sıcaklıkta $10^6 s^{-1}$ olduğu, CA I'in turnover sayısının ise $2,5 \times 10^5 s^{-1}$ olduğu belirtilmiştir. CA VI izoenzimi tükrük salgısının pH dengesini ayarladığı belirtilmiştir. CA VII tükrükte bikarbonatın salgılanmasına katkıda bulunur (Göçer 2014). Karbonik anhidrazlar sadece karbondioksitin bikarbonata dönüştürülmesi reaksiyonunu değil başka birçok reaksiyonu da katalizlemektedirler. Bu reaksiyonlar Tablo 4'te verilmiştir (Supuran and Scozzafava 2001).

Tablo 4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

1.	$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
2.	$NH=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
3.	$NH=C=O + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
4.	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
5.	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
6.	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
7.	$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$
8.	$PhCH_2OCOCl + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9.	$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$

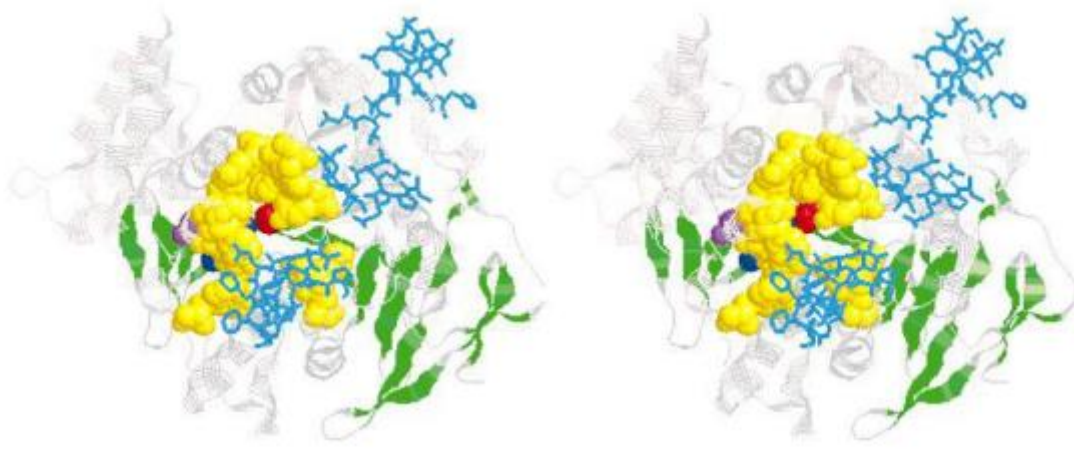
Karbonik anhidraz enzimi inhibe edilerek epilepsi, glukom gibi hastalıklar tedavi edilmektedir (Akıncioğlu vd 2013). CA'nın inhibisyonu veya aktivasyonu kanser, epilepsi, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavi edilebilmesi açısından önemlidir (Aslan vd 2019). Ayrıca CA'nın ilgili olduğu başka hastalıklar da vardır (Alterio *et al.* 2012). Bu hastalıklar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin İlgili Olduğu Hastalıklar

CA izoenzimleri	İlgili olduğu hastalık
CA I	Beyin ve retinal ödemi
CA II	Epilepsi Ödem Mide bulantısı Glukoma
CA III	Oksidatif stres
CA IV	Felç Glukoma
CA V	Obezite
CA VI	Karsinogenez
CA VII	Epilepsi
CA VIII	Kanser Nörodejenerasyon
CA IX	Kanser
CA XII	Glukoma Kanser
CA XIII	Kısırlık
CA XIV	Epilepsi Retinopati

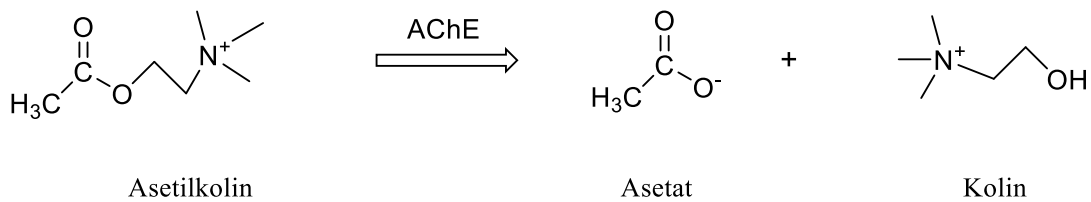
Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE; E.C.3.1.1.7), kütlesi yaklaşık olarak 70-80 kDa olan, glikoprotein yapısındaki bir enzimdir (Massoulie and Pezzementi 1993). Asetilkolinesteraz enzimi, beyin, kas, eritrosit ve sinir hücrelerinde bulunur. Sağlıklı bir insanda en çok beyinde bulunmaktadır. Sinaptik boşluklardaki asetilkolini, kolin ve asetata parçalayan enzimdir (Gezici ve Koçum 2021). Sinir uçlarında biriken kimyasalları parçalar. İlk olarak elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik üreten dokusundan 1938 yılında saflaştırılmıştır (Philips 1996). Üç boyutlu yapısını ise Oakeshott ve arkadaşları ortaya çıkarmışlardır (Şekil 24). Enzimde α -heliks ve β tabakaları vardır. Temel β tabaka yeşil renkli alanlardır. Aktif merkezinde katalitik grup olarak glutamat (eflatun), serin (turuncu) ve histidin (mor) amino asitleri vardır. Aktif merkezin etrafını ise 14 aromatik rezidü (sarı) çevrelemiştir. Molekülün yüzeyinde üç substratı bağlama alanı (mavi) vardır (Oakeshott *et al.* 1999; Gülçin vd 2019).



Şekil 24. Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı

Asetilkolin, sinir ucundan başka bir sinir hücresine sinir impulsu taşır. Ayrıca sinir hücrelerinin ve kas liflerinin olduğu bölgelerde biyoelektriksel akımın oluşmasını sağlar. AChE'nin en önemli fizyolojik rolü sinir uçlarından salınıp sinaps içerisinde nöral impulsun iletimini sağlayan asetilkolinin hidrolizini katalizlemektir. Hidroliz reaksiyonu iki basamaklıdır. Enzim ilk basamakta elektron vererek nükleofil görevi görür. Daha sonra enzim, serin rezidüsünün OH grubu aracılığıyla asetilkolini parçalar (Demir ve Turkoglu 2005). Bu hidroliz sonucu sinir iletileri sonlanır. Eğer sinaptik ortamlardaki asetilkolin molekülünün aktivitesi çok azalırsa sinir iletimi bloke olur ve insanlarda Alzheimer hastalığına sebep olur. Nörolojik bir hastalık olan Alzheimer hastalığında beyindeki asetilkolin miktarının azalması sonucu beyin dokuları zarar görür. Bu durum hafızayı ve yaşlı insanların davranışlarını etkiler. Kolinesterazlar ayrıca, hücre yenilenmesinde ve stresi azaltmada da rol oynarlar (Pope *et al.* 2005; Koçancı ve Aslım 2016; Gülçin vd 2019).

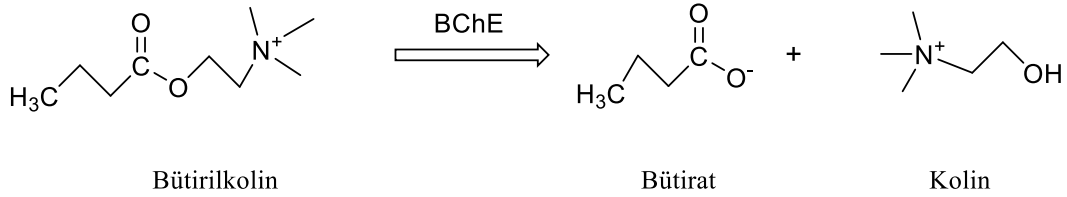


Şekil 25. Asetilkolin'in asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidrolizi

Bütirilkolinesteraz

Bütirilkolinesteraz (BChE; E.C.3.1.1.8), kütlesi yaklaşık 342 kDa, tetramerik glikoprotein yapısında olan bir enzimdir (Barta *et al.* 2001). Bütirilkolini (BCh), bütirat ve koline hidrolizleyen enzimdir (Koç 2019; Gezici ve Koçum 2021). Karaciğerde sentezlenir ve kana karışır. Yağ dokusu, ince bağırsak, akciğer, kas, kalp ve beyin gibi dokularda da

bulunur (Dave *et al.* 2000). Toksik bileşikleri asetilkolinesteraza ulaşmadan detoksifiye etme özelliği vardır. Asetilkolinin hidrolizine katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur. Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine kolinesterazlar denir. Fizyolojik pH'da aktivite gösterirler. Bu iki enzim kolinerjik sistemin kontrolünü sağlar. Asetilkolinesterazın bu kontroldeki rolü bütirilkolinesterazdan daha açık olarak ortaya çıkarılmıştır (Massoulie *et al.* 1993). Bu iki enzimin çok benzer yapıda olmalarından dolayı spesifik inhibitör geliştirme çalışmaları zorlaşmaktadır (Gülçin *et al.* 2020).



Şekil 26. Bütirilkolin'in bütirilkolinesteraz tarafından hidrolizi

α -Glikozidaz

α -Glikozidaz'ın (E.C.3.2.1.20) sistematik adı α -D-Glikozid glikohidrolaz'dır. Genelde molekül ağırlıkları düşük olan oligosakkarit ve α -D-glikozitler gibi substratların α -1,4-glikopiranoz birimlerini hidrolizler. α -Glikanlar olarak bilinen nişasta ve glikojen moleküllerinin parçalanmasında rol alan α -Glikozidazlar, spesifik olarak substratın indirgeyici olmayan terminal ucundan bir D-Glukoz molekülünü hidroliz eder. Nişasta sindiriminin son basamağını α -glikozidaz enzimi gerçekleştirir (Taslimi and Gülçin 2017). α -Glikozidaz, bağırsak hücrelerinin fırçası kenar yüzey zarlarında bulunur. Buradaki α -glikozidaz, kompleks yapıdaki karbohidratların parçalanmasını gerçekleştirir. Ayrıca bağırsak mukoid hücrelerinden de salgılanır. Buradaki α -glikozidaz ise polisakkarit ve oligosakkaritleri, glukoz ve fruktoz birimlerine parçalar. Bu monosakkaritler bağırsak duvarından kolay bir şekilde emilerek kana geçerler (Gülçin vd 2018). α -Glikozidaz enzimleri bir grup enzimlerdir. Bu enzimlere maltaz, izomaltaz, laktaz, sukraz, glukoamilaz örnek olarak verilebilir (Üç 2022).

Diyabet mellitus (DM), kandaki glukoz miktarının anormal seviyelere çıkmasıyla ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Kan şekerinin yüksek olduğu hiperglisemi durumunda aşırı glukoz yüklenmesi sonucu mitokondride ROS üretimi tetiklenir ve mitokondriyal işlevler bozulur. ROS'leri ile beraber oksidatif stresinde diyabet hastalığına sebep olduğu rapor edilmiştir. İnce bağırsak hücrelerinden salgılanan ve polisakkaritleri monosakkaritlere kadar parçalayan α -glikozidaz ve α -amilaz sindirim enzimlerinin inhibe edilmesi, diyabet mellitus hastalığının tedavisi için kullanılan yöntemlerdendir. Bu

yöntemle diyabet ve hipergliseminin kontrol altına alınması oldukça önemlidir (Gülçin vd 2019).

α -Amilaz

α -Amilaz (E.C.3.2.1.1), tükürükte ve pankreas salgısında bulunur. Nişastadaki α -1,4-Glikozid bağlarını hidroliz eder. Yaşayan tüm organizmalarda bulunur. Ekmeğin bayatlamasını geciktirmesi ve raf ömrünü uzatmasından (2-3 gün) dolayı gıdada yaygın olarak kullanılır. Elma ve armut sularının berraklaştırılmasında da kullanılmaktadır. α -Amilaz enziminin ticari olarak kullanılan ilk enzim olduğu bildirilmiştir (Taslimi 2017).

Sinefrin, fenilefrin (Göçer 2014), oktopamin (Çağlayan 2013), apomorfin, timol, humik asit (Şehitoğlu 2012), rozmanirik asit (Nar 2011), elajik asit, gallik asit, ferulik asit, kuersetin, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, sirinjik asit (Öztürk Sarıkaya 2009) gibi fenolik bileşiklerin hCA I ve hCA II enzimlerine karşı inhibisyon kapasitesinin olduğu belirtilmiştir.

Benzensülfonamid bileşikleri (Güngör 2020), floretin, eupatorin, eupatilin, gardenin A (Gülçin vd 2018), tetrakis, p-kumarik asit, curcumin, rosmanirik asit, resveratrol, kafeik asit fenil ester (CAPE), isoliquiritigenin (Taslimi and Gülçin 2017), bitki çayı ekstraktları (Çallıoğulları 2016), şiraz üzümü ekstraktları (Dinçer 2019) gibi bileşik ve ekstraktların α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerine karşı inhibisyon kapasitesinin olduğu belirtilmiştir.

Rutinhidrat (Koç 2019), 7-hidroksiflavon, 5-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, 4,5-dihidroksiflavon, 5,7-dihidroksiflavon, 3,4-dihidroksiflavon (Kalın 2017), secoisolariciresinol (SECO), secoisolariciresinoldiglicoside (SDG), dietilstilbestrol, enterodiol (END), enterolakton (ENL), nordihidroguaretik asit (NOR) ve α -Conidendrin (α -CON) (Köse 2016), filoretin (Teke 2016), izoliquiritigenin (Çetinkaya 2016), tangeretin, genistein, formononetin, scopoletin, delphinidin chloride, pelargonidin chloride (Durmaz 2015), kapsaisin (Arabacı 2015) gibi fenolik bileşiklerin hCA I, hCA II, AChE, BChE enzimlerine karşı inhibisyon kapasitesinin olduğu belirtilmiştir.

Krisin, karvakrol, naringin, hesperidin, zingeron (Taslimi *et al.* 2017), olivetol (Taslimi 2017), usnik asit, vulpinik asit, psoromik asit (Çakmak 2017) gibi fenolik bileşiklerin hCA I, hCA II, AChE, BChE, α -glikozidaz ve α -amilaz enzimlerine karşı inhibisyon kapasitesinin olduğu belirtilmiştir.

Kanser

KontROLSÜZ hücre çoğalması olarak tanımlanan kanser, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Her beş kişiden yaklaşık ikisinin kansere yakalandığı ifade edilmektedir. Vücuttaki birçok doku ve organlarda gelişebilen bu hastalığın 200’den fazla türü vardır. Kalıtsal faktörler, zararlı ışınlar, sigara, çevre kirliliği, yanlış beslenme, çevresel faktörler kanserin oluşum ve gelişmesine etki ederler (Yıldız 2008; Rowles and Erdman 2020).

Normal durumlarda hücrelerin gelişimi ve ölümü bir düzen içindedir. Kanserde ise bozulan genlerin etkisiyle kontrolden çıkıp hücreler anormal şekilde çoğalır. Fazla çoğalan hastalıklı hücrelere “tümör” denir. Tümörler iyi veya kötü huylu olabilir. İyi huylu olanlar vücudun başka taraflarına yayılmazlar, cerrahi müdahale ile alınır ve tekrarlanmazlar. Kötü huylu olanlar ise anormal hücrelerdir, düzensiz bölünürler, doku içine girip tahrip yaparlar. Kan dolaşımı ile vücudun başka tarafına gidip çoğalabilirler ki bu duruma “metastaz” denir. Metastazda tümör hücreleri yeni bir damar için uyarı yaparak komşularındaki hücrelerden bağlarını koparırlar. Böylece primer tümör dokusundan ayrılmış olurlar. Sonra hücrelerarası matriks veya dolaşım sistemi aracılığıyla çevredeki farklı dokulara ulaşırlar. Buralarda çoğalarak yaşamlarını sürdürürler (Güllü ve Akalın 2005; Bergers and Fendt 2021; Majidpoor and Mortezaee 2021).

Kanser sebepleri çok faktörlüdür. Ana faktörler çevresel, genetik, davranışsal ve biyolojik sebepler olarak gruplandırılır (Uçak ve Kızıltan 2021). Genetik faktörler, kalıtsal olarak gelen genlerdir. Bütün kanserlerin temelinde iç ya da dış etkenler sonucu DNA’da meydana gelen hasarın olduğu bildirilmiştir (Futreal *et al.* 2001). Hasar alıp değişikliğe uğrayan genler hücre büyümesinde önemli işlev gören apoptosis, diferansiasyon, hücre siklusu yollarını etkiler. Birisindeki hasar diğerini etkiler, bu da tümör hücrelerinin oluşmasına neden olur (Com *et al.* 2002).

Çevresel faktörler, radyasyon, hava kirliliği, kimyasal maddeler, serbest radikaller, ROS’leri, bakteri, virüs, UV ışınları gibi sebeplerdir. Biyolojik faktörler, ırk, cinsiyet, yaş gibi sebeplerdir. Davranışsal faktörler, yanlış beslenme, sigara-alkol kullanımı gibi sebeplerdir. Kalıttan gelen genlerin kansere sebep olma olasılığı çevresel faktörlerden düşüktür. Çevresel faktörlerden özellikle zararlı kimyasallar (benzen, zift, kömür tozu, hardal gazı, naftalin, madeni yağlar, asbestos vb.), radyasyon, güneş ışığı kansere sebep olmaktadır. Yanlış beslenme, çeşitli ilaçlar, yağlı yemekler, yanmış yağlar, alfatoksinler, sigara-alkol kullanımı kansere sebep olmaktadır. Sigara içildiğinde akciğerlerde

benzopiren bileşiği birikir. Bir epoksit olan benzopiren hücre içine girer. Burada DNA'nın dört bazından birisi olan guanine bağlanır. Oluşan bu yapı replikasyon sırasında guaninin timin olarak algılanmasına yol açar. Bunun sonucunda karşısındaki eşlenik baz sitozin olacakken adenin olur. Bu şekilde ortaya çıkan mutasyonlar eğer onkogende ve hücre bölünmesinde çok önemli işlev gören p53 genlerinde olursa durmaksızın bölünen hücreler oluşur. Bu da tümörleri meydana getirir (Yokuş ve Çakır 2012).

Ultraviyole ışınlarında, gama ışınlarında, nükleer emisyonlarda vücuttaki protein, lipid, nükleik asit gibi makromoleküllerin yapılarına direkt etki edebilecek quantum enerjisi vardır. Bu enerji ile biyolojik moleküllerden elektron koparabilirler (Yokuş ve Çakır 2002). Elektronun ayrılması DNA'nın yapısında değişikliğe, tek ve çift zincir kırıklarına, ayrıca DNA'teki bazlarda ve şekerlerde modifikasyonlara neden olur. Bir çalışmada düşük frekanslı elektromanyetik alanın lökositlerdeki DNA'te 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin miktarını artırdığı belirtilmiştir. Bu artış DNA'te guanine-sitozin eşleşmesi yerine adenin-timin eşleşmesine sebep olur. Bu da DNA'teki bazlarda çeşitli hasarlara sebep olur. Hasar gören DNA eğer onarılmazsa mutasyonlar başlar. Eğer mitoz bu hasarlı DNA ile devam ederse, düzensiz gen ekspresyonuna ve RNA'larda modifikasyonlara neden olarak tümör hücrelerinin oluşumuna sebep olur, kanser hastalığı baş gösterir.(Yokus vd 2005; Goodall and Wickramasinghe 2021).

Serbest radikaller ve ROS'leri, farklı mekanizma ile kanser oluşumuna sebep olurlar. Özellikle hidroksil radikali gibi radikaller DNA'te zincir kırılmasına, bazların modifikasyona uğramasına, deoksiribozun parçalanmasına sebep olurlar. Vücuttaki oksidan-antioksidan dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, endonükleazın inaktive olmasına, bu da DNA'nın hasar görmesine sebep olur. Ayrıca reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Protein-protein kinaz gibi biyomoleküllere, büyüme faktörlerine hasar verirler. Reseptörlere zarar vererek sinsal iletimini bozarlar. Böylece plazma membranındaki hücre işleyişine etki ederek yapısal değişikliklere ve onkogen aktivasyonuna sebep olurlar (Halliwell and Aruoma 1991; Yokus vd 2008).

Kanser hastalığının tedavisi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; kemoterapi, cerrahi müdahale, radyoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi gibi yöntemlerdir. Cerrahi müdahale yönteminde, kanserli doku vücuttan kesilip çıkarılır. Pek çok kanser türünde başvuru alan ilk yöntemdir. Kemoterapi yöntemi, normal hücrelere en az zararı verecek şekilde kanser hücrelerinin ilaç ile öldürülmesidir. Yine de normal hücreler zarar görebilir. Radyoterapi yöntemi, ışınlı tedavi yöntemidir. İmmünoterapi yöntemi,

kanserle savaşmak için ilaçlarla bağışıklık sisteminin güçlendirilmesidir. İmmunoterapi, kötü huylu hücrelere karşı vücut bağışıklığının artırılarak kanser hastalığının tedavisi için umut verici bir yöntemdir. Hormon tedavisi, kanserin gelişimine sebep olan hormonların salınımının engellenmesidir. Bu engelleme ilaçla yapılabilir veya hormon üreten bezler ameliyatla alınabilir. Bu yöntemler tek başına yeterli olmadığında hastalığın tedavisi için birden fazla yöntem uygulanabilir. Fakat bu yöntemlerin birçok yan etkisi bulunmaktadır. Örneğin ışınlı tedavi yöntemi olan radyoterapide, kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücreler de zarar görmektedir. Bundan dolayı kanser tedavisinde yukarıdaki yöntemlere ek olarak yeni yöntemler araştırılmaktadır. Bu konuda son zamanlarda umut verici bazı gelişmeler olmuştur. Bu gelişmelerden birisi “sıvı biyopsi” yöntemidir. Bu yöntem daha verimli tarama, teşhis ve terapötik izlemeye olanak tanımaktadır. Diğer bir yöntem “kişiselleştirilmiş tıp”tır. Kanser bireyler arasındaki değişkenliği incelenerek daha etkili tedaviye katkı sağlayan bir yöntemdir. Bir diğer yöntem “dijital epidemiyoloji”dir. Hastalıkların belirtiçileri, görülme sıklıkları gibi konularda hastalıklarla ilgili ön bilgilere, geleneksel sağlık istatistiklerine göre daha erken ve güvenli erişim olanağı sunan bir yöntemdir (Ertürk 2006; Mattiuzzi and Lippi 2019).

6-Shogaol (Ray *et al.* 2015; Wu *et al.* 2015; Bawadood *et al.* 2020; Hung *et al.* 2009; Qi *et al.* 2015; Liu *et al.* 2012; Chen *et al.* 2010), 6-Gingerol (Jeong *et al.* 2009; Park *et al.* 2006; Lee *et al.* 2008; Radhakrishnan *et al.* 2014; Rastogi *et al.* 2015; Al-Abbasi *et al.* 2016), kuersetin (Vafadar *et al.* 2020; Gulati *et al.* 2006; Shafabakhsh and Asemi 2019), p-kumarik asit (Jaganathan *et al.* 2013; Peng *et al.* 2015), kaemferol (Yoshida *et al.* 2008; Luo *et al.* 2011; Choi and Ahn 2008), sumak (Tohma *et al.* 2019), dört endemik *Gysophilata* sonu: *G.pallida*, *G.arrosti*, *G.tuberculosave* *G.eriocalyx* (Altay *et al.* 2019), *Tanacetum erzincanense* (Yapıcı *et al.* 2021) gibi pek çok fenolik bileşik ve ekstraktın çeşitli kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Kimyasallar

6-Shogaol, DPPH, ABTS, DMPD, TCA, EDTA, TPTZ, Troloks, BHA, BHT, DTNB, PNF, aseton, CuCl₂, neokuprin, FeCl₃, K₃[Fe(CN)₆], ferrozin, L-Tirozin, serum albümin, asetilkolin iyodat, bütirilkolin iyodat Sigma-Aldrich GmbH (Sterheim, Germany)'den satın alındı. trihidroksimetil aminometan (Tris), hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, sodyum sülfat, sodyum asetat, sülfanilamid, akrilamid, bisakrilamid, etanol, glisin, coomassie brilliant blue G-250 Merck'ten satın alındı.

Yararlanılan Cihaz ve Aletler

1. pH metre	Mettler Toledo
2. Vorteks	Fisons WhirliMixer
3. Otomatik pipetler	Eppendorf, Socorex, Biohit
4. Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
5. Manyetik karıştırıcı	Jeio Tech
6. Santrifüj cihazı	Hermle Z 323 K
7. -80 Derin dondurucu	Thermo
8. +4 Buzdolabı	Siemens
9. UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV-1208
10. UV Spektrofotometre küveti	1 cm ³ ve 3 cm ³ lük kuartz küvet
11. Isıtıcı	Daihan WiseStir
12. Çalkalayıcı	Benchmark
13. Peristaltik pompa	Ismatec
14. Steril kabin	Class II
15. İnkübatör	Nüve CO ₂
16. Mikroskoplar	Nikon Eclipse E100, Nikon Eclipse Ti
17. Sıvı azot tankı	Liquide Arpege 40
18. Hemositometre (Toma lamı)	Thoma Marienfeld Germany
19. Çoklu mikropipet	Eppendorf 100
20. Flask	T75

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Stok numune çözeltisi

1. 50 mg 6-Shogaol 50 mL etanolde çözöldü.

Stok standart çözeltileri

1. 10'ar mg BHA, BHT ve Trolox 10'ar mL etanolde çözöldü.

DPPH[•] giderme metodu çözeltileri

1. 10⁻³ M'lık DPPH[•] çözeltisi: 39,43 mg DPPH[•] 100 mL etanol ile 16 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözöldü.

Fe³⁺ indirgeme metodu çözeltileri

1. 0,2 M Fosfat tamponu (pH:6,6): 3,12 g Na₂HPO₄ yaklaşık 80 mL saf suda çözöldü. pH 6,6'ya ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
2. % 1'lik K₃Fe(CN)₆ çözeltisi: 1 gK₃Fe(CN)₆ 100 mL saf suda çözöldü.
3. % 10'luk TCA çözeltisi: 5 g TCA 50 mL saf suda çözöldü.
4. % 1'lik FeCl₃ çözeltisi: 165 mg FeCl₃.6H₂O 100 mL saf suda çözöldü.

ABTS^{•+} giderme metodu çözeltileri

1. 0,1 M Fosfat tamponu (pH:7,4): 2,4 g Na₂HPO₄ yaklaşık 180 mL saf suda çözöldü. pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. 2 mM ABTS^{•+} çözeltisi: 0,110 g ABTS 100 mL fosfat tamponunda 10-15 dk karıştırılarak çözöldü. Bunun üzerine 0,06623 g K₂O₈S₂ kısım kısım eklenerek çözöldü. 1-1,5 saat karıştırıldı.

Cuprak metodu çözeltileri

1. 1 M CH₃COONH₄ tamponu (pH: 6,5): 3,85 g CH₃COONH₄ yaklaşık 40 mL saf suda çözöldü. pH 6,5'e ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
2. 0,01 M CuCl₂ çözeltisi: 0,067 gCuCl₂ 50 mL saf suda çözöldü.
3. 7,5.10⁻³ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi: 0,0039 g neokuprin 25 mL etanolde çözöldü.

DMPD⁺ giderme metodu çözeltileri

1. 0,1 M CH₃COONa tamponu (pH: 5,25): 0,82 g CH₃COONa yaklaşık 80 mL saf suda çözüldü. pH 5,25'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M DMPD çözeltisi: 0,105 g DMPD 5 mL saf suda çözüldü.
3. 0,05 M FeCl₃ çözeltisi: 0,0675 g FeCl₃.6H₂O 5 mL saf suda çözüldü.
4. 0,01 M DMPD⁺ reaktifi: 100 mL 0,1 M sodyum asetat tamponuna (pH: 5,25) 1 mL 0,1 M DMPD çözeltisi ve 0,2 mL 0,05 M FeCl₃ çözeltisi eklenerek çözüldü.

FRAP indirgeme metodu çözeltileri

1. 0,3 M CH₃COONa tamponu (pH: 3,6): 2,46 g CH₃COONa yaklaşık 80 mL saf suda çözüldü. pH 3,6'ya ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
2. 40 mM HCl çözeltisi: 0,334 mL %37'lik HCl alındı, 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
3. 10 mM TPTZ çözeltisi: 0,312 g TPTZ 40 mM'lık HCl çözeltisinde çözüldü.
4. 20 mM FeCl₃ çözeltisi: 0,54 g FeCl₃.6H₂O 100 mL saf suda çözüldü.
5. FRAP reaktifi: 10 hacim asetat tamponu, 1 hacim TPTZ çözeltisi, 1 hacim FeCl₃ çözeltisi karıştırıldı.

hCA I ve hCA II izoenzimleri saflaştırma çözeltileri

1. Afinite jeli tamponu (200mM NaHCO₃): 16,8 g NaHCO₃ tartıldı. 950 mL saf suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 8,8'e ayarlandı, son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. Jeli dengeleme tamponu (25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄): 3,028 g Tris, 14,2 g Na₂SO₄ tartıldı. 950 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8,7'ye ayarlandı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
3. Jeli yıkama tamponu (25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄): 3,028 g Tris, 3,214 g Na₂SO₄ tartıldı. 950 mL saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 8,7'ye ayarlandı. Son hacim 1 L'ye saf su ile tamamlandı.
4. hCA I izoenzimi elüsyon tamponu (25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl): 2,2 g Na₂HPO₄, 14,63 g NaCl tartıldı. 200 mL saf suda çözüldü. pH 6,3'e ayarlandı. Son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

5. hCA II izoenzimi elüsyon tamponu (0,1 M CH_3COONa /0,5 M NaClO_4): 2,04 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 9,187 g NaClO_4 tartıldı. 120 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya ayarlandı. Son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.

6. Diyaliz tamponu: 6 g Tris 900 mL saf suda çözüldü. pH H_2SO_4 ile 7,4'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

hCA I ve hCA II izoenzimleri kantitatif protein tayin çözeltileri

1. Sığır albümin çözeltisi (BSA): 1 mg BSA tartıldı, 1 mL saf suda çözüldü.

2. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 tartıldı. %95'lik 50 mL etanolde çözüldü ve üzerine %95'lik fosforik asit konuldu. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

SDS-PAGE çözeltileri

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8,8): 6,057 g Tris tartıldı. 4,5 mL saf suda çözüldü. pH 8,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

2. Akrilamid (%3)-bisakrilamid (%0,8) çözeltisi: 30 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartıldı. 100 mL saf suda çözüldü.

3. %10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS 90 mL saf suda çözüldü.

4. 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 6,8): 6,057 g Tris tartıldı. 4,5 mL saf suda çözüldü. pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.

5. Numune tamponu: 0,65 mL Tris-HCl (pH:6,8), 1 mL %10'luk SDS, 1 mL gliserin, 1 mL %0,1'lik bromtimol mavisi konuldu. Son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Tampon kullanılmadan önce 950 μL numune tamponuna 50 μL β -merkaptoetanol eklendi.

6. Yürütme tamponu: 1,5 g Tris, 7,2 g glisin tartıldı. 50 mL saf suda çözüldü. Üzerine 5 mL %10'luk SDS eklendi. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

7. Boyama çözeltisi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 tartıldı. %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan oluşan çözeltide çözüldü.

8. Fiksasyon çözeltisi: %50 izopropil alkol, %10 asetik asit, %40 saf su karıştırıldı.

9. Yıkama çözeltisi: %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su karıştırıldı.

hCA I ve hCA II izoenzimleri esteraz aktivitesi çözeltileri

1. 0,05 M Tris-SO₄ tamponu: 6,057 g Tris tartıldı. 950 mL saf suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

2. Nitrofenil asetat çözeltisi (PNF): 0,0135 g PNF tartıldı. 1 mL asetonda çözüldü. Son hacim saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz aktivite çözeltileri

1. 1 M Tris-HCl tamponu: 15,14 g Tris, 0,182 g EDTA 100 mL saf suda çözüldü. pH 8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 125 mL'ye tamamlandı.

2. 10 mM asetilkolin iyodat çözeltisi: 0,0145 g asetilkolin iyodat tartıldı. 5 mL saf suda çözüldü.

3. 10 mM DTNB çözeltisi: 0,002 g DTNB, 0,1 g sodyum sitrat tartıldı. 10 mL saf suda çözüldü.

Bütirilkolinesteraz aktivite çözeltileri

1. 1 M Tris-HCl tamponu: 15,14 g Tris tartıldı. 100 mL saf suda çözüldü. pH 8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 125 mL'ye tamamlandı.

2. 5 mM bütirilkolin iyodat çözeltisi: 0,0753 g bütirilkolin iyodat tartıldı. 50 mL saf suda çözüldü.

3. 10 mM DTNB çözeltisi: 0,0198 g DTNB tartıldı. 5 mL saf suda çözüldü.

α -Glikozidaz aktivite çözeltileri

1. 0,1 M sodyum fosfat tamponu (aktivite için): 6 g NaH₂PO₄ tartıldı. 450 mL saf suda çözüldü. pH 6,9'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2. 0,1 mM sodyum fosfat tamponu (enzim seyreltmek için): 6 mg NaH₂PO₄ tartıldı. 450 mL saf suda çözüldü. pH 6,9'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3. 5 mM PNPG çözeltisi: 0,0376 g PNPG tartıldı. 25 mL 0,1 M'lık fosfat tamponunda çözüldü.

α -Amilaz aktivite çözeltileri

1. 0,1 M sodyum fosfat tamponu: 0,6 g NaH₂PO₄ tartıldı. 40 mL saf suda çözüldü. pH 6,9'a ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

2. Nişasta (substrat) çözeltisi: 0,1 g nişasta 25 mL saf suda iyice ısıtılarak çözüldü.

3. α -Amilaz enzimi: 0,010 g α -Amilaz enzimi 10 mL saf suda iyice çözüldü.

4. 1 M HCl çözeltisi: 0,8213 mL %37'lik HCl alındı. 10 mL'ye saf su ile tamamlandı.

5. 5 mM I₂-5 mM KI çözeltisi: 0,0254 g I₂ tartıldı. 20 mL saf suda iyice ısıtılarak çözüldü. Sonra oda sıcaklığına getirildi. Üzerine 0,0166 g KI eklenerek çözüldü. Folyoya sarılarak muhafaza edildi.

Antikanser aktivite testlerinde kullanılan çözeltiler

1. XTT çözeltisi: 5 mL XTT kitinin üzerine 100 μ L XTT aktivatöründen konuldu ve çözüldü.

2. Besi yeri, tripan boyası, dimetil sülfoksit, fosfat tamponlu salin çözeltileri satın alındığı şekliyle kullanıldı.

Antioksidan Çalışmaları

DPPH $\cdot$ giderme metodu

DPPH $\cdot$ giderme metodu Blois metoduna (Blois 1958) göre yapıldı. DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi serbest radikal olarak kullanıldı. DPPH radikali çözeltisi ve etanolden oluşan toplam hacmi 1250 μ L olan kontrol çözeltisinin absorbansı kullanılmadan önce 1,000 $\pm$ 0,025 nm'ye ayarlandı. Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 1250 μ L olacak şekilde Tablo 6'daki gibi yapıldı ve vortekslendi. 30 dk oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi. 517 nm'de etanolden oluşan köre karşı absorbansları ölçüldü.

Tablo 6. DPPH $\cdot$ Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (μ L)	15 (μ g/mL)	30 (μ g/mL)	45 (μ g/mL)	60 (μ g/mL)
Numune/Standart	19	38	54	76
Etanol	731	712	696	674
DPPH $\cdot$ çözeltisi	500	500	500	500
Toplam	1250	1250	1250	1250

Fe³⁺ indirgeme metodu

Oyaizu'nun (1986) metodu modifiye edilerek yapıldı (Gülçin 2009). Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 4.5 mL olacak şekilde Tablo 7'deki gibi sırasıyla yapıldı ve vortekslendi. Üzerlerinden 1'er mL alınarak her birine 1 mL saf su eklendi. Vortekslendi. 10 dk karanlıkta inkübe edildi. 700 nm'de saf sudan oluşan köre karşı

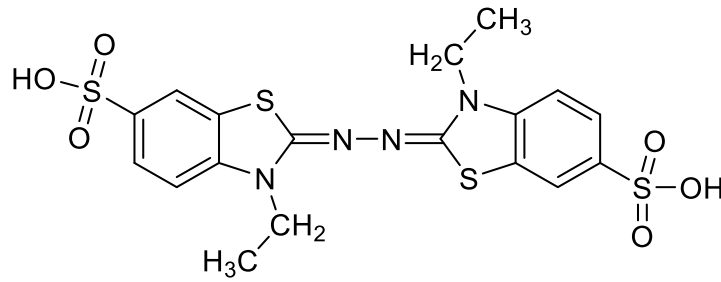
absorbanslar ölçüldü. Kontrol için deney tüpü içeriğine numune yerine saf su konularak ölçüm yapıldı. Deney tüplerine pipetlemeler yapıp karıştırıldıktan sonra her birinden 1'er mL alınıp üzerlerine 1'er mL saf su eklenerek 2 kat seyreltildiği için absorbanslar 2 ile çarpıldı.

Tablo 7. Fe³⁺ İndirgeme Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (µL)	15 (µg/mL)	30 (µg/mL)	45 (µg/mL)	60 (µg/mL)
Numune/Standart	67,5	135	202,5	270
Saf su	432,5	365	297,5	230
Fosfat tamponu	1250	1250	1250	1250
FeCl ₃ çözeltisi	250	250	250	250
K ₃ Fe(CN) ₆ çözeltisi	1250	1250	1250	1250
TCA çözeltisi	1250	1250	1250	1250
Toplam	4500	4500	4500	4500

ABTS^{•+} giderme metodu

Re ve arkadaşlarının (1999) yöntemine göre yapıldı. ABTS'den 2 mM ABTS^{•+} çözeltisi hazırlanarak radikal olarak kullanıldı. ABTS^{•+} çözeltisi ve fosfat tamponundan oluşan toplam hacmi 1250 µL olan kontrol çözeltisinin absorbansı kullanılmadan önce 1,000±0,025 nm'ye ayarlandı. Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 1250 µL olacak şekilde Tablo 8'deki gibi sırasıyla yapıldı ve vortekslendi. 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. 734 nm'de fosfat tamponundan oluşan köre karşı absorbanslar ölçüldü.



Şekil 27. ABTS'nin kimyasal yapısı

Tablo 8. ABTS^{•+} Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (µL)	5(µg/mL)	10(µg/mL)	15(µg/mL)	20(µg/mL)
Numune/Standart	6,25	12,5	18,75	25
Fosfat tamponu	243,75	237,5	231,25	225
ABTS ^{•+} çözeltisi	1000	1000	1000	1000
Toplam	1250	1250	1250	1250

Cuprak metodu

Apak ve arkadaşlarının (Apak vd 2006) uyguladığı yöntem modifiye edilerek yapıldı (Ak ve Gülçin 2008). Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 1000 µL olacak şekilde Tablo 9'daki gibi sırasıyla yapıldı ve vortekslendi. 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. 450 nm'de saf sudan oluşan köre karşı absorbensler ölçüldü. Kontrol için deney tüpü içeriğine numune yerine saf su konularak ölçüm yapıldı.

Tablo 9. Cuprak Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (µL)	15 (µg/mL)	30 (µg/mL)	45 (µg/mL)	60 (µg/mL)
Numune/Standart	15	30	45	60
Saf su	685	670	655	640
CuCl ₂	125	125	125	125
Asetat tamponu	125	125	125	125
Neokuprin çözeltisi	50	50	50	50
Toplam	1000	1000	1000	1000

DMPD^{•+} giderme metodu

Fogliano ve arkadaşlarının (1999) metoduna göre yapıldı. 100 mL 0,1 M sodyum asetat tamponuna (pH: 5,25) 1 mL 0,1 M DMPD çözeltisi ve 0,2 mL 0,05 M FeCl₃ çözeltisi eklenerek 0,01 M DMPD^{•+} reaktifi oluşturuldu. DMPD^{•+} reaktifi ve saf sudan oluşan toplam hacmi 1500 µL olan kontrol çözeltisinin absorbens kullanılmadan önce 1,000±0,025 nm'ye ayarlandı. Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 1500 µL olacak şekilde Tablo 10'daki gibi sırasıyla yapıldı ve vortekslendi. 50 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. 505 nm'de sodyum asetat tamponundan oluşan köre karşı absorbensler ölçüldü.

Tablo 10. DMPD⁺ Giderme Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (µL)	15 (µg/mL)	30 (µg/mL)	45 (µg/mL)	60 (µg/mL)
Numune/Standart	22,5	45	67,5	90
Saf su	477,5	455	422,5	410
DMPD ⁺ reaktifi	1000	1000	1000	1000
Toplam	1500	1500	1500	1500

FRAP metodu

10 hacim asetat tamponu (0,3 M, pH: 3,6), 1 hacim TPTZ (10 mM) çözeltisi, 1 hacim FeCl₃ (20 mM) çözeltisi karıştırılarak FRAP reaktifi oluşturuldu. Deney tüplerine pipetlemeler toplam hacim 2500 µL olacak şekilde Tablo 11'deki gibi sırasıyla yapıldı. Vortekslendi. Üzerlerinden 1'er mL alınarak her birine 1'er mL saf su eklendi. Vortekslendi. 10 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. 593 nm'de sodyum asetat tamponundan oluşan köre karşı absorpsiyonlar ölçüldü. Deney tüplerine pipetlemeler yapıp karıştırıldıktan sonra her birinden 1'er mL alınıp üzerlerine 1'er mL saf su eklenerek 2 kat seyreltildiği için absorpsiyonlar 2 ile çarpıldı.

Tablo 11. FRAP Metodu Deney Tüpü İçeriği

Küvet içeriği (µL)	15 (µg/mL)	30 (µg/mL)	45 (µg/mL)	60 (µg/mL)
Numune/Standart	37,5	75	112,5	150
Asetat tamponu	712,5	675	637,5	600
FeCl ₃ çözeltisi	1000	1000	1000	1000
FRAP reaktifi	750	750	750	750
Toplam	2500	2500	2500	2500

hCA I ve hCA II İzoenzimleri Safılaştırma Çalışmaları**CA enzim hemolizatının hazırlanması**

10 mL insan eritrositi alındı. Üzerine 40 mL buzlu saf su konuldu. 5-10 dk karıştırılarak hücrelerin patlaması sağlandı. +4 °C'de 13.000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra çökelek kısmına değdirmeden üst faz kısmında kalan hemolizat pastör pipeti ile dikkatlice alındı. Hemolizata katı tris azar azar ilave edilerek pH'sı 8,7'ye ayarlandı. +4 °C'de muhafaza edildi (Çoban vd 2008).

Afinite jelinin hazırlanması

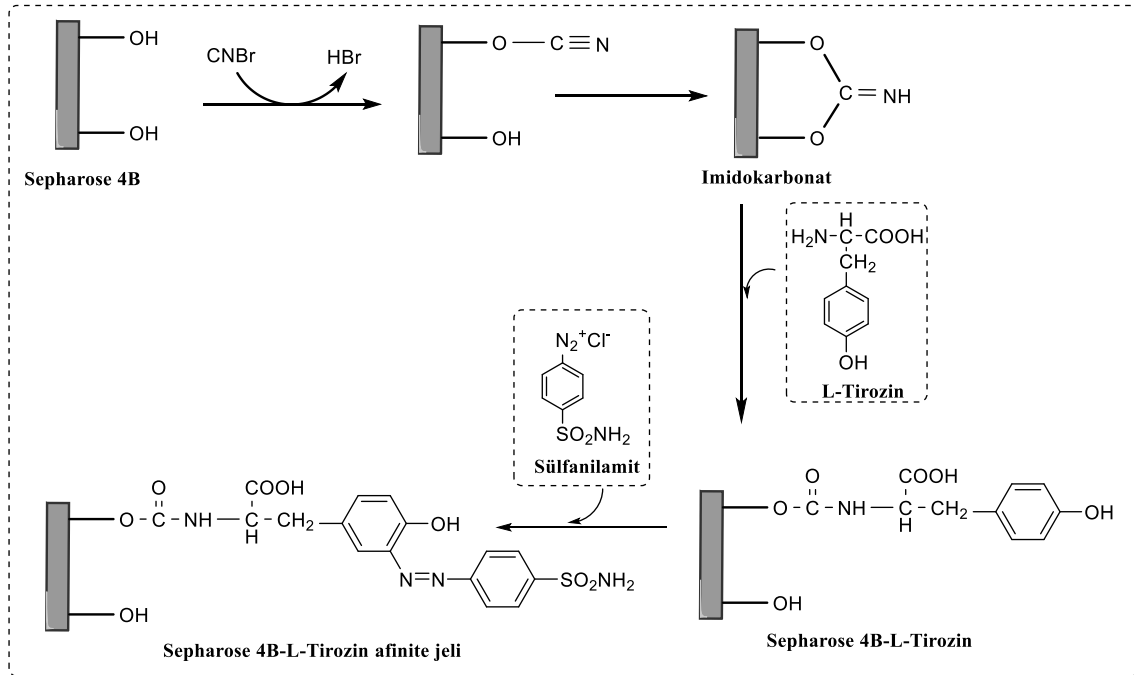
Afinite jeli aşağıdaki basamaklar takip edilerek hazırlandı.

a) CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye L-Tirozin takılması

Afinite jeli hazırlanırken CNBr ile aktifleştirilen Sepharose-4B matriksi kullanıldı. Matriks soğuk 250 mL 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH:10) ile yıkandı. Üzerine yine aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg L-Tirozin çözünmüş çözelti eklendi. +4 °C'de 2 saat manyetik karıştırıcıda yavaş bir şekilde karıştırıldı. +4 °C'de 16 saat bekletildi. Reaksiyona girmeyen L-Tirozin'in uzaklaştırılması için 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar yıkama suyu ile yıkandı. Yıkamaya 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH:8,8) ile devam edildi. Matrikse kovalent olarak takılı L-Tirozin'li jel aynı tamponun (40 mL) içine konuldu.

b) Sülfanilamid kenetlendirilmesi

0°C'de 1 M 10 mL HCl içinde 25 mg sülfanilamid çözöldü. Üzerine içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan çözeltiden damla damla 5 mL eklendi. 10 dk reaksiyon sürecinden sonra diazollanmış olan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-Tirozin çözeltisine ilave edildi. 1 M NaOH ile pH: 9,5'e ayarlandı. Oda sıcaklığında 3 saat boyunca yavaş yavaş karıştırıldı. 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponu ve 1 L saf su ile yıkandı. Üzerine aynı tampondan ilave edilerek muhafaza edildi (Söyüt 2006).



Şekil 28. CNBr Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jeli reaksiyon basamakları (Atasever vd 2013)

Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanmış olan jel Tris-HCl dengeleme tamponuna (pH: 7,8) konuldu. İçerisinde kalan hava su trombu ile alındı. Bu jel 1x10 cm'lik kapalı sistem soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jelin çökmesi beklendi. Peristaltik pompa kullanılarak yıkama tamponu ile iyice yıkandı. Dengeleme tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Elüatlar alınarak 280 nm'de absorbanlara bakıldı. Absorbansların ve pH'nın eşitlenmesi kolonun dengelenmiş olduğunu gösterdi.

Afinite kolonuna numune eklenmesi ve elüatların alınması

pH'sı 8,7 olan hemolizat damlalıkla afinite kolona eklendi. Sonra 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH: 8,7) çözeltisi ile yıkanarak safsızlıklar uzaklaştırıldı. Önce 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH: 6,3) elüsyon tamponu eklenerek hCA I izoenzimi; sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH: 5,6) elüsyon tamponu eklenerek hCA II izoenzimi elüe edilerek 2 mL'lik 8-10 tüpe alındı. Sonra elüatların 280 nm'deki absorbanları ölçüldü.

Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini metodu, proteinlerin yapısında bulunan Tirozin, Triptofan, Fenilalanin'in 280 nm'de maksimum absorban vermesi esasına dayanır (Segel 1968). Afinite kolonundan alınmış olan 2 mL'lik hCA I ve hCA II elüatları kuvars küvetlere konup spektrofotometrede elüsyon tamponlarından oluşan köre karşı 280 nm'de absorbanları alındı. Absorbansları yüksek olan tüplerdeki hCA I ve hCA II izoenzimleri birleştirilerek -80 °C'de muhafaza edildi.

Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini metodu, proteinlerdeki asidik ve bazik gruplarla organik boyaların reaksiyona girip renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorban vermesi esasına dayanır (Bradford 1976). Boyanın proteine bağlanması çok hızlıdır. Bu protein-boya kompleksi uzun süre kalabilir.

1 mL'sinde 1 mg sığır albümin çözeltisi (BSA) 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, 80, 90 ve 100 µL oranlarında tüplere alındı. Üzerlerine saf su ilave edilerek her tüp 100 µL'ye tamamlandı. Üzerlerine renklendirme reaktifi olan Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi konularak son hacimleri 5 mL'ye tamamlandı. Karıştırıldı. 10 dk inkübe edildikten sonra 3 mL'lik küvetlere kondu. 595 nm'de 4,9 mL reaktif ve 0,1 mL saf sudan oluşan köre karşı absorbanları alındı. Elde edilen absorban değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri

standart grafik olarak oluşturuldu. Numuneler için de aynı yöntem uygulandı. Standart grafikten elde edilen denklemde yerine konularak miktar tayini yapıldı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

SDS-PAGE metodu aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapıldı (Laemmli1970, Çoban vd 2008).

a) Ayırma jeli: Behere 1 M'lık pH'sı 8,8 olan Tris tamponundan 5 mL kondu. Üzerine 4,4 mL %3'lük akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid çözeltisi, 0,2 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,03 mL saf TEMED, 3,13 mL saf su eklenerek karıştırıldı. Üzerine %1,5'lik PER çözeltisinden 40 µL eklenerek hızlıca karıştırıldı. Dışarıda donma olmaması için hemen cam plakaların arasına pipetlendi. Cam plakaların arasında oluşabilecek kabarcıkları gidermek için az miktarda izopropil alkol kondu. Jel donduktan sonra (3-5 dk) üstte kalan izopropil alkol alındı.

b) Yığılma jeli: Behere 1 M'lık pH'sı 6,8 olan Tris tamponundan 0,41 mL kondu. Üzerine 0,8 mL %10'luk akrilamid-bisakrilamid çözeltisi, 0,03 mL %10'luk SDS çözeltisi, 0,03 mL saf TEMED, 2,45 mL saf su eklenerek karıştırıldı. Üzerine 50 µL PER eklenerek karıştırıldı. Hemen ayırma jelinin üzerine cam plakaların üst seviyesine kadar pipetlendi. Cam plakalar arasına tarak konarak 5-10 dk donması bekledi. Jel donup kuyucuklar oluştuğundan sonra taraklar çıkarıldı.

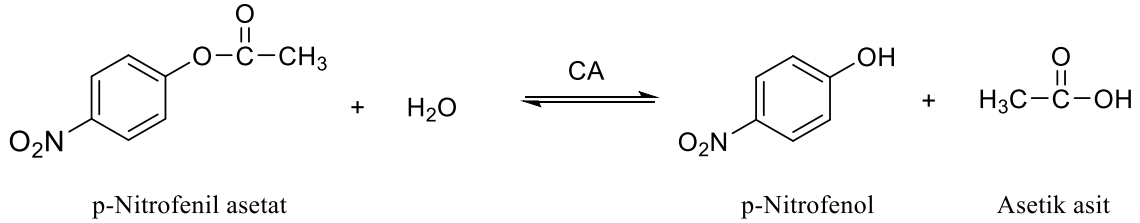
c) Numunenin jele yüklenmesi: hCA I ve hCA II izoenzimlerini denatüre etmek için 100'er µL alınıp üzerlerine 50 µL numune tamponu, %1'lik SDS, %10'lukβ-merkaptoetanol eklenerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra 5'er ve 10'ar µL olarak cam plakalardaki kuyucuklara pipetlendi.

d) Elektroforez: Cam plakalar elektroforezdeki yerlerine takıldı. Hazneye yürütme tamponu konuldu. Önce 30 dk 90 V'ta sonra 90 dk 120 V'ta çalıştırıldı. İşlemden sonra plakalar alınarak iki plaka birbirinden ayrıldı. Jel dikkatlice plakadan kaldırılıp Brilliant Blue R-250 boyasının içine konuldu. 1 gece çalkalayıcıda karıştırıldı. Daha sonra jel çalkalayıcıdan alınıp 50 mL metanol-10 mL asetik asit-40 mL saf sudan oluşan yıkama çözeltisine yani renksizleştirme çözeltisine konuldu. Çözelti renkli hale gelince yenisiyle değiştirildi. Jeldeki bantlar netleşinceye kadar işleme devam edildi.

hCA I ve hCA II İzoenzimleri Esteraz Aktivitesi Tayini

Yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanır. p-Nitrofenil asetat (PNF), karbonik anhidraz enziminin substratıdır. Enzim PNF'yi hidroliz

eder ve 348 nm’de absorbsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat oluşur. Oluşan bu iki bileşiğin ikisi de 348 nm’de absorbsiyon verdiği için fenol grubunda bulunan H⁺ iyonunun gruptan ayrışması ya da ayrışmaması ölçümü değiştirmemektedir. PNF çözeltisi günlük hazırlanır ve sarı renkli olup ışık altında çabuk bozunduğu için folyoya sarılır. Ayrıca PNF çözünürken aseton kullanılır. Çünkü aseton diğer çözücülere göre hidroliz reaksiyonunu çok daha az inhibe eder (Verpoorte *et al.* 1967; Göçer ve Gülçin 2013).



Şekil 29. p-Nitrofenil asetat’ın p-Nitrofenol’e dönüşümü

Esteraz aktivitesi ölçümü yapmak üzere 1 mL’lik küvete Tablo 12’de verilen pipetlemeler yapıldı. 400 µL tampon, 240 µL saf su, 360 µL PNF’den oluşan köre karşı spektrofotometrede 248 nm’de her 30 saniyede bir olmak üzere 3 dk boyunca absorbans ölçümleri yapıldı. Son absorbans ile ilk absorbans arasındaki fark alınarak aktivite belirlendi.

Tablo 12. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Küvet İçeriği

Küvet içeriği	Hacim (µL)
Tris-SO ₄ tamponu	400
Saf su	220
PNF çözeltisi	360
Numune	-
Enzim çözeltisi	20
Toplam hacim	1000

hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine Shogaol’ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

IC₅₀ değerlerinin bulunması için numunenin 6 farklı konsantrasyonu hazırlanarak pipetlemeler yapıldı. 348 nm’de 3 dk absorbans ölçüldü. Konsantrasyona karşı % enzim aktivitesi grafiği çizilerek elde edilen denklemden IC₅₀ değerleri hesaplandı. K_i hesaplamaları yapmak üzere 5 farklı kontrol, 5 farklı PNF konsantrasyonu ve numunenin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanarak pipetlemeler yapıldı. 348 nm’de 3 dk absorbans ölçümü yapıldı. K_i değerleri hesaplandı. Hangi tip inhibisyon türü olduğu belirlendi.

Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Bu yöntemde tiyokolin ile DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Bu bileşik 412 nm'de absorbands verir (Ellman *et al.* 1961).Öncelikle IC₅₀ değerinin bulunması için deney tüpüne Tablo 13'teki pipetlemeler yapıldı. 412 nm'de 3 dk absorbands ölçüldü. Elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı % enzim aktivitesi grafiği çizilerek elde edilen denklemden IC₅₀ değerleri hesaplandı. K_i hesaplamaları yapmak üzere 5 farklı kontrol, 5 farklı DTNB konsantrasyonu ve numunenin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanarak pipetlemeler yapıldı. 412 nm'de 3 dk absorbands ölçümü yapıldı. K_i değerleri hesaplandı. Hangi tip inhibisyon türü olduğu belirlendi.

Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Bütirilkolinesteraz metodu asetilkolinesteraz için yapılan metotla hemen hemen aynıdır. Farkları ise enzimlerin kontrol aktivitesine göre kullanılan enzim miktarları ve asetilkolin iyodat yerine bütirilkolin iyodat kullanılmasıdır.

Tablo 13. Asetilkolinesteraz Aktivite Tayini Küvet İçeriği

Küvet içeriği	Hacim (µL)
Tampon	100
Saf su	780
DTNB çözeltisi	50
Enzim çözeltisi	20
Numune	-
Asetilkolin iyodat	50
Toplam hacim	1000

Tablo 14. Bütirilkolinesteraz Aktivite Tayini Küvet İçeriği

Küvet içeriği	Hacim (µL)
Tampon	100
Saf su	785
DTNB çözeltisi	50
Enzim çözeltisi	15
Numune	-
Bütirilkolin iyodat	50
Toplam hacim	1000

α -Glikozidaz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Tao ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (Tao *et al.* 2013).Yöntem uygulanırken Tablo 15'teki pipetlemeler yapıldı. 405 nm'de 3 dk boyunca absorbans ölçüldü. IC₅₀ için numunenin 6 farklı konsantrasyonu hazırlanarak pipetlemeler yapıldı. 405 nm'de 3 dk absorbans ölçüldü. IC₅₀ değerleri hesaplandı. K_i hesaplamaları yapmak üzere 5 farklı kontrol, 5 farklı PNPG konsantrasyonu ve numunenin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanarak pipetlemeler yapıldı. 405 nm'de 3 dk absorbans ölçümü yapıldı. K_i değerleri hesaplandı. Hangi tip inhibisyon türü olduğu belirlendi.

Tablo 15. α -Glikozidaz Aktivite Tayini Küvet İçeriği

Küvet içeriği	Hacim (μ L)
Tampon	100
Saf su	820
Enzim çözeltisi	30
Numune	-
PNPG	50
Toplam hacim	1000

α -Amilaz Enzimi Üzerine Shogaol'ün İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Metodun temeli nişastanın iyot ile kompleks oluşturması ve bu kompleksin de 580 nm'de absorbans vermesine dayanır (Xiao *et al.* 2006). Numunenin 5 farklı konsantrasyonu hazırlanarak üzerine 1'er mL nişasta çözeltisi eklendi. Tüpler sodyum fosfat tamponu ile 3'er mL'ye tamamlandı. Üzerlerine 0,25'er mL enzim eklenerek karıştırıldı. 30 dk inkübasyondan sonra 1,75'er mL iyot çözeltisi eklenerek karıştırıldı. 580 nm'de absorbans ölçüldü.

Tablo 16. α -Amilaz Aktivite Tayini Küvet İçeriği

Küvet içeriği	Hacim (mL)
Numune	-
Nişasta	1
Fosfat tamponu	2
Enzim	0,25
İyot çözeltisi	1,75
Toplam hacim	4

Antikanser Araştırma Çalışmaları

Hücre kültürü koşulları

Hücrelerin veya tek bir hücrenin doku ile bağıntısı olmadan *in vitro* olarak laboratuvar şartlarında çoğaltılmasına “hücre kültürü” denir. Hücre kültürü çalışmaları günümüzde önemli araştırma konularının başında gelmektedir. Kanser hastalığı gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin bu duruma karşı nasıl etki ettiğini ya da bir hücre veya dokuda üretilen bir maddenin nasıl işlev gördüğünü belirleyebilmek için hücre kültürü çalışmaları sıklıkla yapılmaktadır. *In vivo* olarak canlı ortamda yapılamayan araştırma çalışmaları, *in vitro* olarak laboratuvar şartlarında hücre hatları çoğaltılarak yapılabilir. Hücreler, etraflarındaki çevreye karşı duyarlı olduklarından dolayı fiziksel ve kimyasal koşullar değiştiğinde çoğu hücreler bu durumdan etkilenirler. Kanser hücreleri de benzer etki gösterdikleri için, besi yeri ile fizyolojik koşulların sağlandığı ortamlarda beslenip çoğaltılmalıdır. Bu koşulların en önemlileri insan vücut sıcaklığı ve oksijensiz ortamdır. Bu ortamların hücrelere sağlanması için çoğunlukla karbondioksit inkübatörleri kullanılır. Bu koşullarda hücreler canlılıklarını sürdürürler ve hücre bölünmesi yaparak çoğalırlar.

Hücre kültürü çalışmaları yapılırken kontaminasyonun olmaması için steril bir ortamın olması oldukça önemlidir. Bundan dolayı çalışmalar Class II Güvenlik Kabini’nde yapıldı. Kanser hücrelerinin büyüüp çoğalması için çeşitli takviye edici büyüme ortamları kullanıldı. Bu takviye edici maddeler fetal sığır serumu, penisilin streptomisin (Pen-Strep), Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) ve McCoys’un 5A ortamıdır. Hücre kültürleri, 37 °C’de %95 nem %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

Hücrelerin çözdürülmesi

Kanser hücreleri DMSO’lu besi yeri içeren 2 mL kriyotüp içerisinde dondurulmuş olarak saklanır. Sıvı azot tankında dondurulmuş halde olan kanser hücreleri, tanktan alındı ve çoğaltılmak üzere T75 hücre kültürü flaskına aktarıldı. Hücrelerin büyümesi için üzerlerine 8 mL besi yeri konup 37 °C’de %95 nem %5 CO₂ inkübatöründe çoğalmaya bırakıldı. 24 saat inkübeden sonra büyüme ortamı yeni besi yeri ile değiştirildi ve yine %5 CO₂ inkübatörüne konuldu.



Şekil 30. Class II güvenlik kabini

Hücrelerin bölünmesi

Hücreler T75 flaskta %80 oranında çoğaldığında inkübatörden alındı. İçerisindeki besi yeri ortamı vakum yardımıyla boşaltıldı. 10 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkanarak atıklar, kirlilikler, ölü hücreler uzaklaştırıldı. Yıkama yapılırken pipet kullanılarak T75 flaskın dip kısmına yapışık halde olan hücrelerin dağılmamasına dikkat edildi. Yıkama yapıldıktan sonra yıkama suyu boşaltıldı. T75 flask dibine yapışık halde olan canlı hücrelerin kaldırılması için flaskta 2-3 mL tripsin/EDTA eklendi ve 37 °C’de %95 nem %5 CO₂ inkübatörüne konuldu. 5-10 dakika inkübe edilerek hücrelerin ayrışması sağlandı. Flask inkübatörden alınıp, içerisine tripsinin inaktive olması için 8 mL besi yeri eklendi. Hücrelerin birbirinden ayrıştırılması için pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. Sonra bu hücre karışımından 2 mL alındı ve başka bir T75 şişesine konuldu. Üzerine hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için 7-8 mL besiyeri eklendi. Böylece bölünen hücre kültürleri yine 37 °C’de %95 nem %5 CO₂ inkübatörüne konuldu. Haftada 3-4 kez bu işlem tekrarlandı.

Hücrelerin dondurulması

Bölünen hücreler, 15 mL’lik falkon tüplerine konarak 37 °C’de 1000×g’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra falkon tüpünden üst katman alındı. Pelet kısmı ise serum ile takviye edilerek büyüme ortamı olan %10 DMSO içeren 3 mL dondurma ortamında yeniden süspansiyon yapıldı. Bu hücre süspansiyonu kriyotüplere konuldu ve

vakit kaybetmeden -80 °C dondurucuya konuldu. Bir hafta -80 °C dondurucuda kalan kriyotüpler, uzun süre depolama yapmak amacıyla -196 °C’de sıvı azot tankına konuldu.

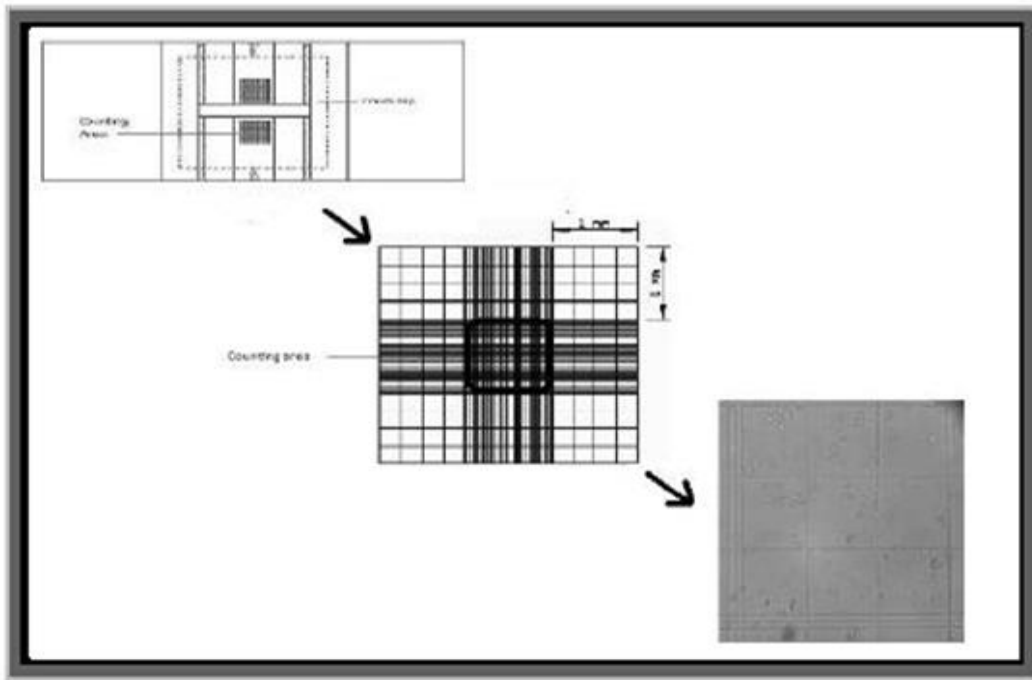
Hücre sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında antiproliferatif etki ölçümünden önce 1 mL’de 100.000 hücre olması hedeflenir. Bölünüp hücre çoğaltılması yapılan hücreler tripan mavisi ile boya dışlama tekniği kullanılarak sayıldı. Tripan mavisi, hücreleri daha görünür yapar ve canlı ile cansız hücreleri ayırt eder. Canlı hücreler boyayı içine almaz ve sarı renkli görünür. Cansız hücreler ise boyayı içine aldığı için mavi renkli görünür. Tripsin ile iyice birbirinden ayrılan hücreler iki ayrı ependorfa konuldu. Üzerine tripan boyası eklenerek boyama işlemi yapıldı. Işık mikroskobuna yerleştirilerek hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Boyanmış hücre karışımından hemositometrenin iki odacığına 10’ar µL konuldu. Hemositometre, ışık mikroskobuna yerleştirilip odacıklardaki hücreler sayılarak ortalaması alındı. Daha sonra 1 mL’deki hücre sayısı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \text{Odacıklardaki ortalama hücre sayısı} \times \text{DF} \times 10^4$$

(DF: Tripan boyası ile yapılan seyreltme faktörü.)

(10^4 :Lamdaki odacık boyutlarından hesaplanan faktör (Hemositometredeki her oda 1cm uzunluğa, 1 cm ene, 0,1 cm yüksekliğe sahiptir, hacmi $0,1 \text{ cm}^3$ ’tür.)



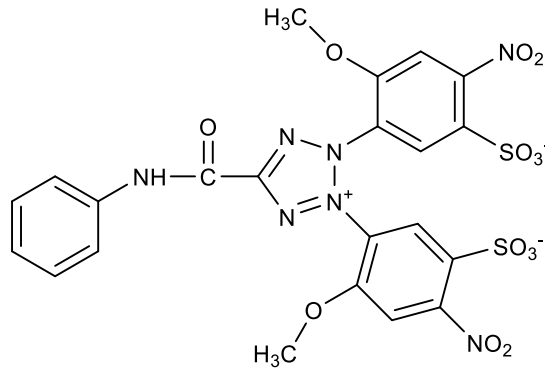
Şekil 31. Hemositometre ile canlı hücre sayımı (Altay 2015)

XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü

Shogaol'ün A-549 akciğer kanseri hücre hattı, HT-29 kolon kanseri hücre hattı, MCF-7 ve MDA-MB-453 göğüs kanseri hücre hatları ve 3T3-L1 fare fibroblast normal hücrelerine karşı antiproliferatif etkisinin araştırılması, Hücre Proliferasyon XTT Kiti Biyolojik Endüstrileri kullanılarak yapıldı. XTT (Şekil 32), heterosiklik organik yapıda bir tetrazolyum tuzudur ve canlı hücrelerdeki mitokondri enzimleri vasıtasıyla turuncu renkli olan formazan ürününe indirgenir. Meydana gelen formazan ürünü suda çözünerek 415 nm'de absorbanans verdiği için eliza okuyucuda ölçümü yapılabilir.

Beslenip çoğaltılması yapılan A-549, HT-29, MCF-7, MDA-MB-453 ve 3T3-L1 hücre hatlarından 96 kuyucuklu plakalara 100'er µL ekildi. İnkübatöre konarak büyümeleri sağlandı. 24 saat inkübeden sonra plakalar alınarak besi yerleri boşaltıldı. Canlı hücreler kuyucuk dibine yapışık olduğu için plakada kaldı. Her kuyucuk 75 µL PBS ile yıkandı ve boşaltıldı. Kuyucuk dibine yapışık halde olan hücrelerin üzerine 50'er µL besi yeri eklendi. Bunun üzerine yine 50'er µL numune çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda 3 tekrar elde edilecek şekilde eklendi ve karıştırıldı. Kuyucuklardan ikisinde kontrol olarak sadece besi yeri, iki kuyucukta da %0,2 DMSO'lu büyüme ortamı vardır. 24 saat inkübasyon için tekrar inkübatöre konuldu. İnkübe süresi dolunca plakalar inkübatörden alındı. XTT kitini aktive etmek için 5 mL XTT kiti üzerine 100 µL XTT aktivatöründen konularak çözüldü. Her bir kuyucuğa bu çözeltiden 50'şer µL eklenerek karıştırıldı. Karışımın 8 saat XTT reaktifi ile inkübe olması için CO₂ inkübatörüne konuldu. İnkübe olduktan sonra 415 nm'de eliza okuyucuda okutuldu. Hücre canlılığını hesaplamak için aşağıdaki eşitlik kullanıldı. Elde edilen sonuçlarla IC₅₀ değerleri hesaplandı. Hücre canlılığını %50 azaltmak için gereken numune konsantrasyonu IC₅₀ değeridir.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{[\text{Abs(ekstrakt ile muamele görmüş hücreler)} - \text{Abs(hücresiz ortamdaki ekstrakt)}]}{[\text{Abs(muamele görmemiş hücreler)} - \text{Abs(hücresiz ortam)}]} \times 100$$



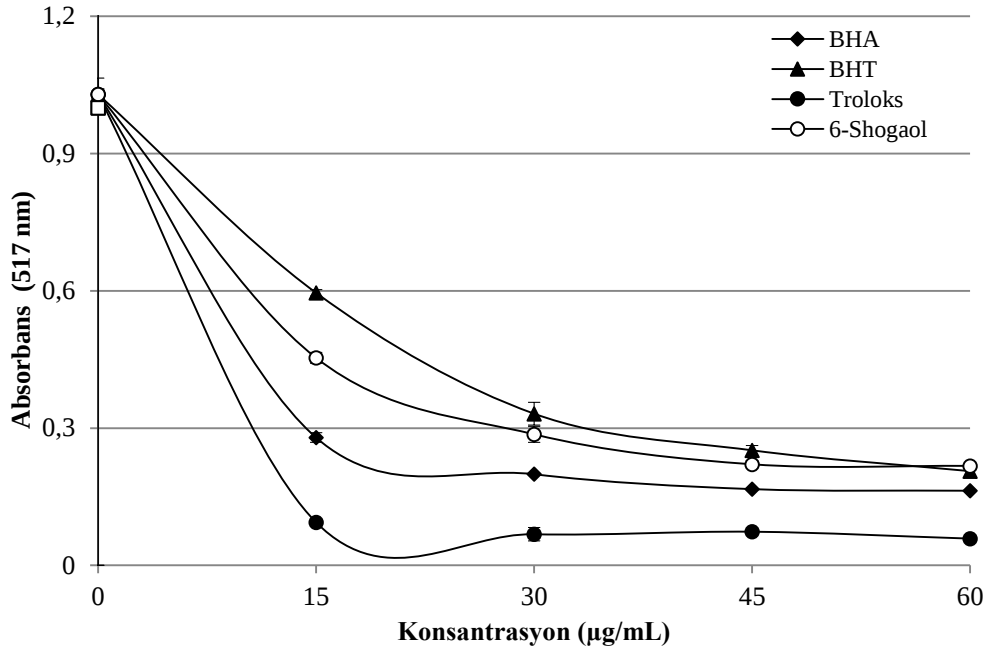
Şekil 32. XTT tetrazolyum tuzu

ARAŞTIRMA BULGULARI

Antioksidan Aktivite Bulguları

DPPH· giderme metodu bulguları

DPPH· giderme aktivitesi, Blois metodu uygulanıp Shogaol ve standart antioksidan olan BHA, BHT ve Troloks'un 517 nm'deki absorbansları ölçülerek ve bunlara ait grafik çizilerek belirlendi. Grafik Şekil 33'te verilmiştir.



Şekil 33. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) DPPH· giderme aktivitesi grafiği

Shogaol'ün DPPH· giderme aktivitesi konsantrasyon arttıkça arttığı görüldü. 15 µg/mL, 30 µg/mL ve 45 µg/mL konsantrasyonlarda Shogaol'ün, BHT'den daha etkili, Troloks ve BHA'dan daha düşük aktivite gösterdiği bulundu. Shogaol ve standart antioksidan olan BHA, BHT ve Troloks'un DPPH· giderme aktivitelerini karşılaştırmak üzere IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo17'de verilmiştir. 30 µg/mL konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların DPPH· giderme aktivitesi sırasıyla şöyledir:

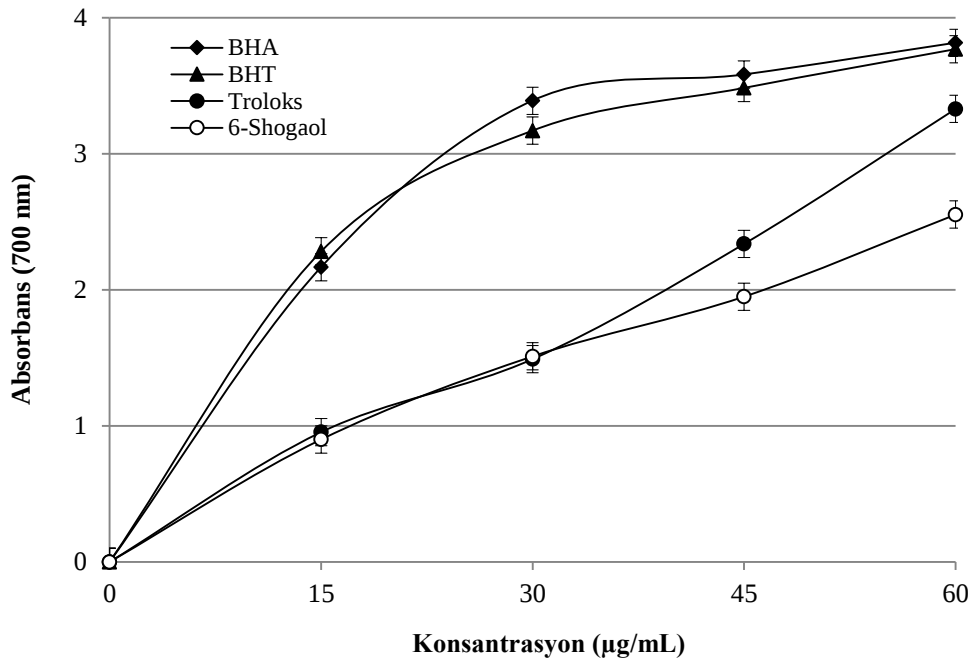
$$\text{Troloks} > \text{BHA} > \text{Shogaol} > \text{BHT}$$

Tablo 17. Shogaol ve Standart Antioksidanlar (BHA, BHT ve Troloks) İçin DPPH· Giderme Aktivitesi IC₅₀ Değerleri

Standartlar ve Bileşik	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	18,458
BHT	28,115
Troloks	10,884
Shogaol	24,791

Fe³⁺ indirgeme metodu bulguları

Ferrik iyonları (Fe³⁺) indirgeme kapasitesi, Oyaizu metodunun hafif modifikasyonu ile Shogaol ve standart antioksidan olan BHA, BHT ve Troloks'un 700 nm'deki absorbensları ölçülüp elde edilen absorbenslarla Şekil 34'te verilen grafik çizilerek belirlendi.



Şekil 34. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) Fe³⁺ indirgeme kapasitesi grafiği

Shogaol'ün Fe³⁺ indirgeme kapasitesi konsantrasyon arttıkça arttığı görüldü. Bu metotta 30 µg/mL konsantrasyonda Shogaol'ün, Troloks'tan daha etkili aktivite gösterdiği, 15 µg/mL konsantrasyonda ise Troloks'a çok yakın, BHA ve BHT'den düşük aktivite gösterdiği bulundu. Shogaol ve standart antioksidanların 30 µg/mL'deki absorbens değerleri Tablo 18'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı. 30 µg/mL konsantrasyonda Shogaol ve standartların Fe³⁺ indirgeme kapasitesi sırasıyla şöyledir:

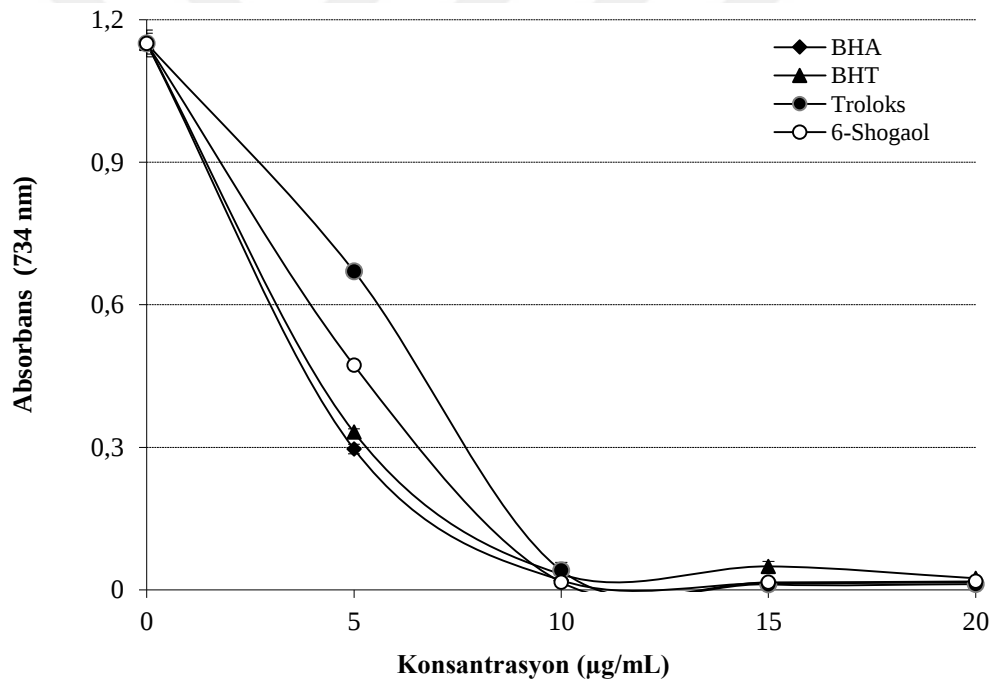
BHA > BHT > Shogaol > Troloks

Tablo 18. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) Fe^{3+} İndirgeme Metoduna Göre 30 $\mu\text{g/mL}$ 'deki Absorbans Değerleri

Standartlar ve Bileşik	Absorbans (700 nm) $\pm$ SS
BHA	$3,390 \pm 0,037$
BHT	$3,170 \pm 0,167$
Troloks	$1,491 \pm 0,069$
Shogaol	$1,511 \pm 0,055$

ABTS^{•+} giderme metodu bulguları

ABTS^{•+} giderme aktivitesi, Re ve arkadaşlarının metoduna göre Shogaol'un ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) 734 nm'deki absorbansları ölçülüp elde edilen absorbanslarla Şekil 35'te verilen grafik çizilerek belirlendi.



Şekil 35. Shogaol'un ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (5-20 $\mu\text{g/mL}$) ABTS^{•+} giderme aktivitesi grafiği

Shogaol'un ABTS^{•+} giderme aktivitesinin 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Troloks'a göre etkili, BHA ve BHT'den ise düşük olduğu bulundu. 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda ise hem standartların hem de Shogaol'un, ABTS radikallerini tamamen giderdiği görüldü. Shogaol ve standart antioksidan olan BHA, BHT ve Troloks'un ABTS^{•+} giderme aktivitelerini karşılaştırmak üzere IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo

19’da verilmiştir. 5 µg/mL konsantrasyonda Shogaol ve standartların ABTS^{•+} giderme aktivitesi sırasıyla şöyledir:

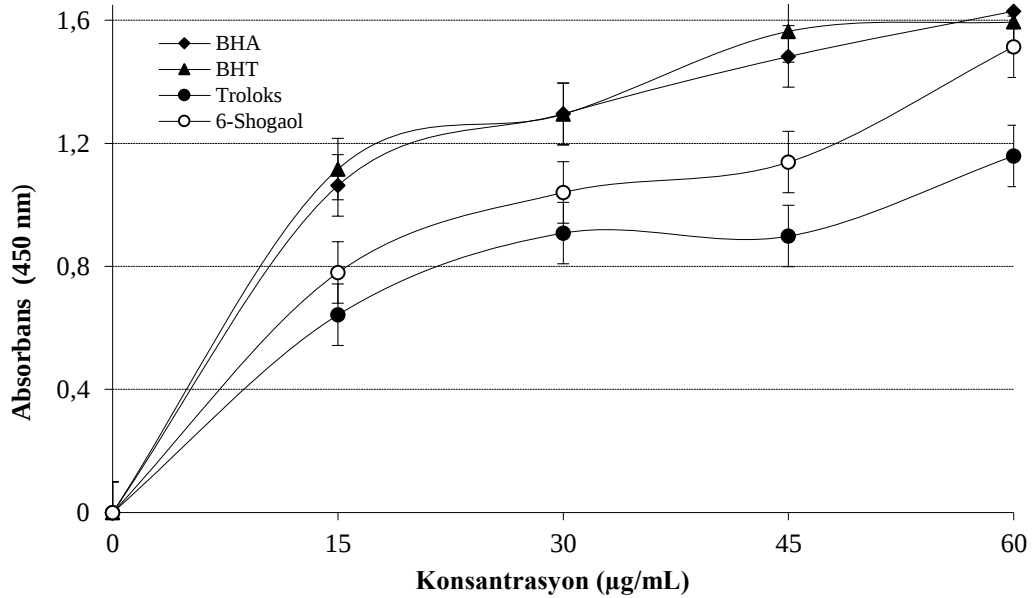
$$\text{BHA} > \text{BHT} > \text{Shogaol} > \text{Troloks}$$

Tablo 19. Shogaol ve Standart Antioksidanlar (BHA, BHT ve Troloks) İçin ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi IC₅₀ Değerleri

Standartlar ve Bileşik	IC ₅₀ (µg/mL)
BHA	4,588
BHT	4,980
Troloks	6,707
Shogaol	5,611

Cuprak metodu bulguları

Kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme kapasitesi, Apak ve arkadaşlarının metodu modifiye edilerek Shogaol’ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) 450 nm’deki absorbansları ölçülüp elde edilen absorbanslarla Şekil 36’da verilen grafik çizilerek belirlendi.



Şekil 36. Shogaol’ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) Cu²⁺ indirgeme kapasitesi grafiği

Shogaol’ün Cu²⁺ indirgeme kapasitesinin tüm konsantrasyonlarda Troloks’tan daha etkili, BHA ve BHT’den düşük olduğu bulundu. Shogaol ve standart antioksidanların 30 µg/mL’deki absorbans değerleri Tablo 20’de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı. 30

$\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Shogaol ve standartların Cuprak metoduna göre Cu^{2+} indirgeme kapasitesi sırasıyla şöyledir:

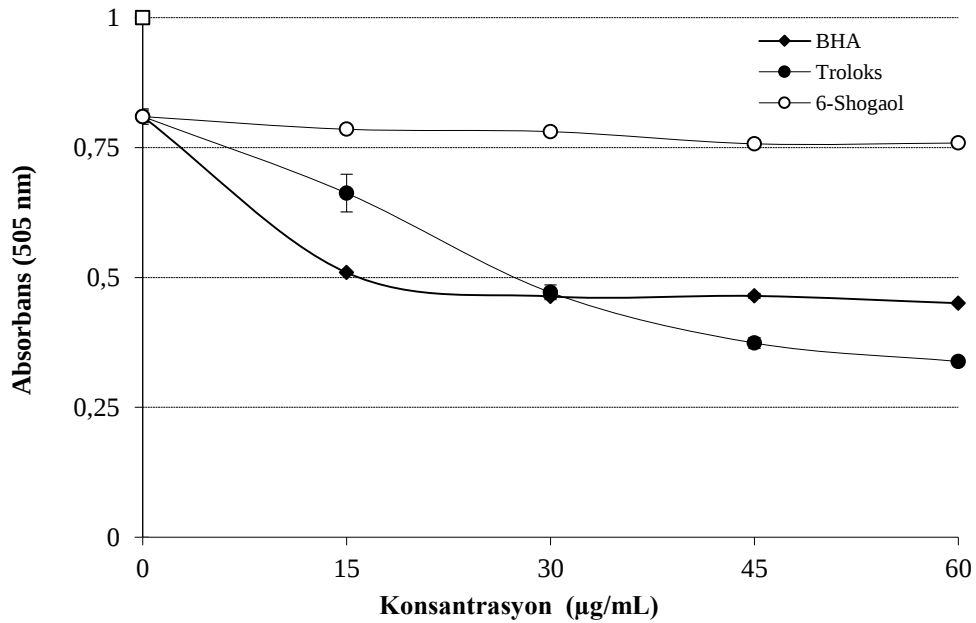
$$\text{BHT} \approx \text{BHA} > \text{Shogaol} > \text{Troloks}$$

Tablo 20. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) Cuprak Metoduna Göre $30 \mu\text{g/mL}$ 'deki Absorbans Değerleri

Standartlar ve Bileşik	Absorbans (450 nm) $\pm$ SS
BHA	$1,297 \pm 0,052$
BHT	$1,295 \pm 0,023$
Troloks	$0,909 \pm 0,047$
Shogaol	$1,041 \pm 0,025$

DMPD⁺ giderme metodu bulguları

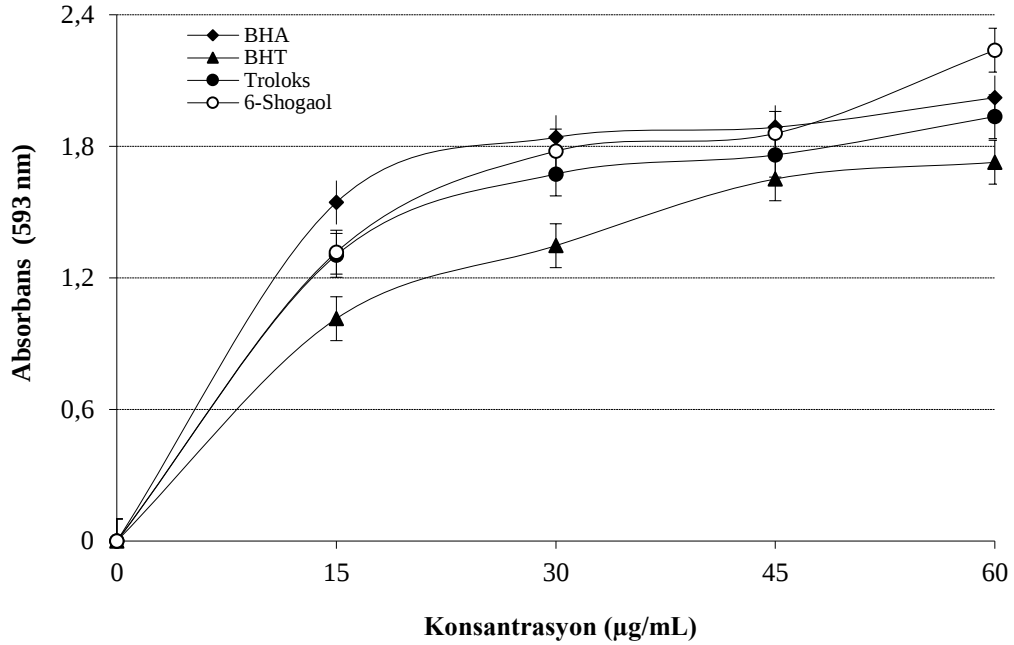
DMPD⁺ giderme aktivitesi, Fogliano ve arkadaşlarının metoduna göre Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA ve Troloks) 505 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Elde edilen absorbanslarla Şekil 37'de verilen grafik çizildi. Shogaol'ün DMPD⁺ giderme aktivitesinin standartlardan düşük olduğu görüldü. Bu durumun bir sebebi girişim olabilir. Çünkü α - tokoferol gibi hidrofobik bileşiklerin DMPD⁺ giderme metodunda girişim yapma özelliği vardır. Bu da sonuçları etkilemektedir. Shogaol bileşiği de hidrofobik alifatik zincir bulundurmaktadır. Bundan dolayı girişim yapmış olabilir.



Şekil 37. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki ($15\text{-}60 \mu\text{g/mL}$) DMPD⁺ giderme aktivitesi grafiği

FRAP metodu bulguları

FRAP metoduna göre Fe^{3+} indirgeme kapasitesi Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) 593 nm'deki absorbansları ölçülüp elde edilen absorbanslarla Şekil 38'de verilen grafik çizilerek belirlendi.



Şekil 38. Shogaol'ün ve standart antioksidanların (BHA, BHT, Troloks) farklı konsantrasyonlardaki (15-60 µg/mL) FRAP metoduna göre Fe^{3+} indirgeme kapasitesi grafiği

Shogaol'ün FRAP metoduna göre Fe^{3+} indirgeme aktivitesinin 60 µg/mL konsantrasyonda tüm standartlardan daha yüksek olduğu, 45 µg/mL konsantrasyonda ise BHT ve Troloks'tan daha etkili, BHA'a çok yakın olduğu bulundu. Shogaol ve standart antioksidanların 60 µg/mL'deki absorbans değerleri Tablo 21'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı. 60 µg/mL konsantrasyonda Shogaol ve standartların FRAP metoduna göre Fe^{3+} indirgeme aktivitesi sırasıyla şöyledir:

$$\text{Shogaol} > \text{BHA} > \text{Troloks} > \text{BHT}$$

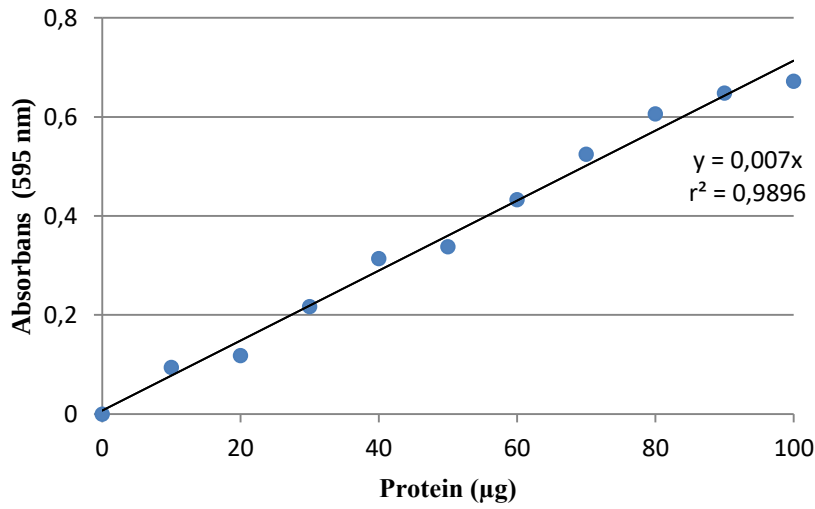
Tablo 21. Shogaol ve Standart Antioksidanların (BHA, BHT ve Troloks) FRAP Metoduna Göre 60 µg/mL'deki Absorbans Değerleri

Standartlar ve Bileşik	Absorbans (593 nm) ± SS
BHA	2,022 ± 0,158
BHT	1,727 ± 0,004
Troloks	1,935 ± 0,018
Shogaol	2,238 ± 0,087

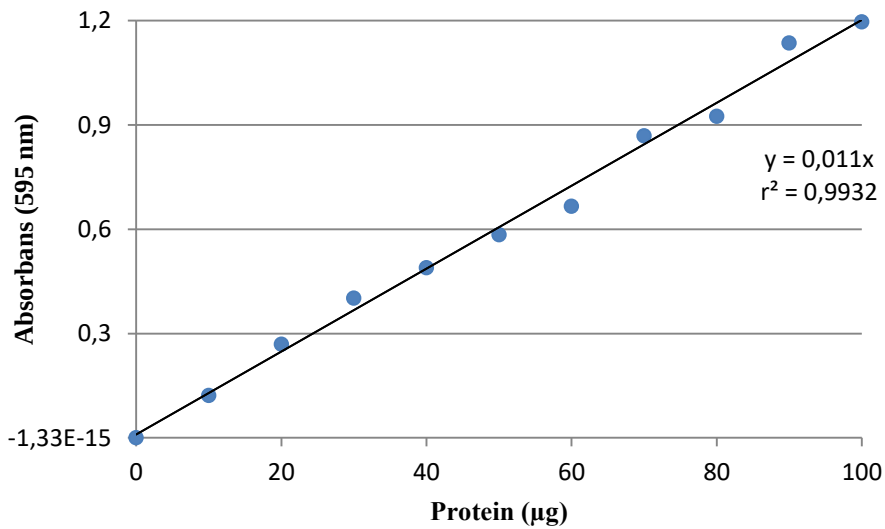
Enzim Saflaştırma Bulguları

Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanılarak hem hemolizatin hem de hCA I ve hCA II izoenzimlerinin kantitatif tayini yapıldı. Bunun için öncelikle sığır albümin çözeltisinin farklı konsantrasyonları hazırlanarak 595 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Sonra protein miktarına karşı absorbans değerlerini içeren standart grafik çizildi (Şekil 39 ve 40). Grafiklerden elde edilen denklemlerden hemolizat, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin protein miktarları hesaplandı. Bu miktarların sırasıyla 39485,68 mg/mL; 158 mg/mL; 375 mg/mL olduğu bulundu.



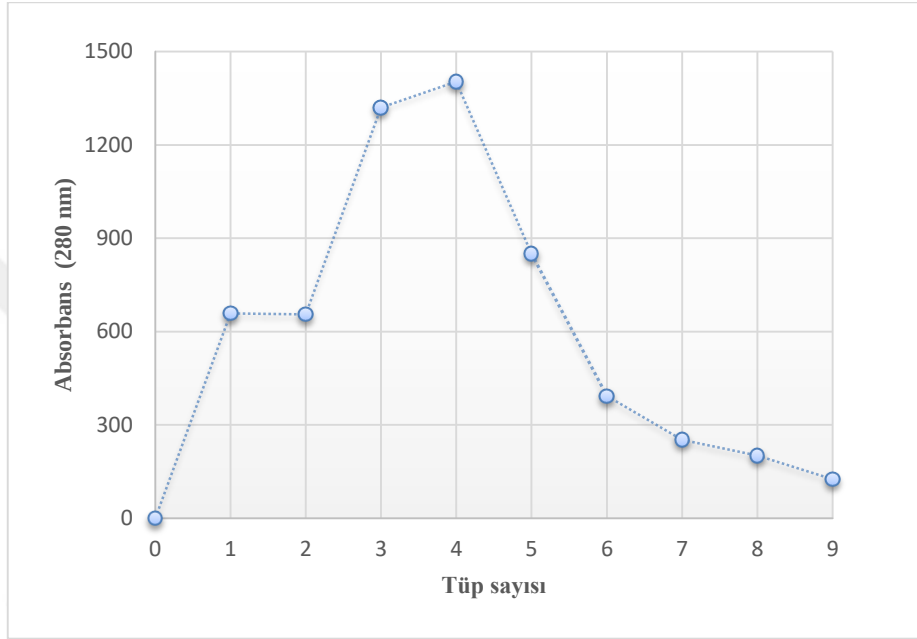
Şekil 39. Bradford metoduna göre hemolizattaki protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik



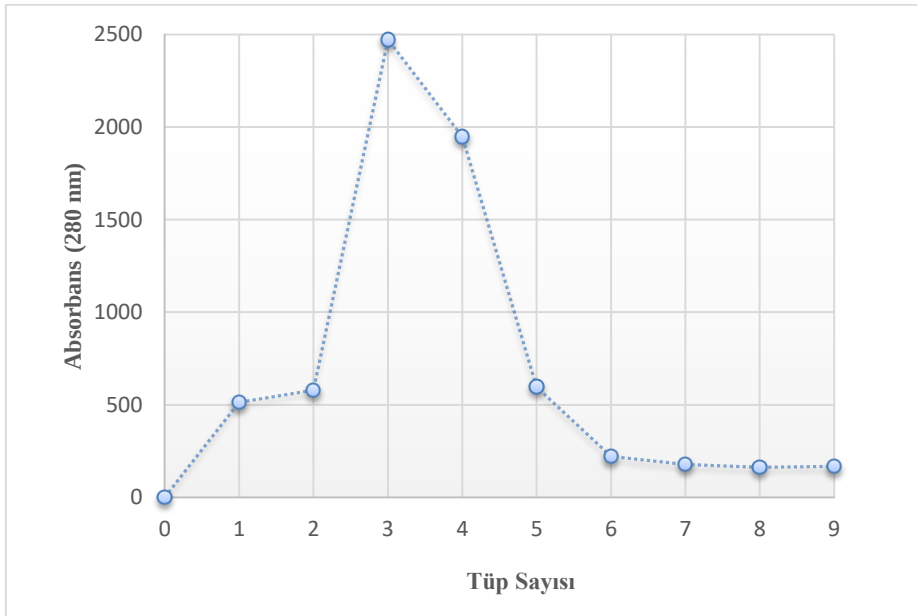
Şekil 40. Bradford metoduna göre hCA I ve hCA II izoenzimlerinin protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik

Karbonik anhidraz I ve II saflaştırma bulguları

Afinite kolonundan alınmış olan 2 mL’lik hCA I ve hCA II elüatları kuvars küvetlere konup spektrofotometrede elüsyon tamponlarından oluşan köre karşı 280 nm’de absorbansları alındı. Elde edilen absorbans sonuçları ile tüp sayısına karşılık absorbans grafiği çizildi (Şekil 41 ve 42). hCA I izoenzimi için ilk altı tüpün absorbansının diğerlerinden daha yüksek olduğu görüldü. hCA II izoenzimi için ise ilk beş tüpün absorbansının diğerlerinden daha yüksek olduğu görüldü.



Şekil 41. hCA I izoenziminin elüsyon sonucu kalitatif tayin grafiği



Şekil 42. hCA II izoenziminin elüsyon sonucu kalitatif tayin grafiği

SDS-PAGE bulguları

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmaları sonucunda saflıklarının tespit edilmesi için SDS-PAGE yapıldı. Molekül ağırlıkları bilinen proteinler standart madde olarak kullanıldı. İşlem sonucu tek bant gözlemlendi ve belirgin hale gelen bantlar hCA I ve hCA II izoenzimleri olarak tespit edildi (Şekil 43).



Şekil 43. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin SDS-PAGE sonucu fotoğrafı

Karbonik anhidraz I ve II saflaştırma basamakları bulguları

Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak yapılan saflaştırma sonucunda aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, % verim ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplandı (Tablo 22). hCA I izoenzimi %40,67 verimle 273 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1,367 EÜ/mg olarak bulundu. hCA II izoenzimi %81,92 verimle 309 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1,546 EÜ/mg olarak bulundu. Saflaştırma tablosu hazırlanırken aşağıda verilen formüller kullanıldı:

$$\text{Enzim Ünitesi (EÜ)} = \frac{\text{Absorbans / dk}}{\text{Ekstinksiyon kat.}} \times \frac{\text{Küvet hacmi (}\mu\text{L)}}{\text{Enzim (}\mu\text{L)}}$$

$$\text{Toplam Aktivite (EÜ)} = \text{Aktivite (EÜ)} \times \text{Hacim (mL)}$$

$$\text{Toplam Protein (mg)} = \text{Protein (mg/mL)} \times \text{Hacim (mL)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (EÜ/mg)} = \frac{\text{Toplam Aktivite (EÜ)}}{\text{Toplam Protein (mg)}}$$

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Saflaştırmanın sonundaki toplam aktivite (EÜ)}}{\text{Saflaştırmanın ilk basamağındaki toplam aktivite (EÜ)}} \times 100$$

$$\text{Saflaştırma Katsayısı} = \frac{\text{Saflaştırmanın sonundaki spesifik aktivite (EÜ/mg)}}{\text{Saflaştırmanın ilk basamağındaki spesifik aktivite (EÜ/mg)}}$$

Tablo 22. İnsan Eritrositinden Elde Edilen Hemolizat ve Hemolizattan Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan hCA I ve hCA II İzoenzimleri İçin Enzim Ünitesi, Spesifik Aktivite, % Verim ve Saflaştırma Katsayısı Sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/mL)	Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam aktivite (EÜ)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	236	18	39485,68	4248	710742	0,005	100	1
hCA I	216	8	158	1728	1264	1,367	40,67	273
hCA II	580	6	375	3480	2250	1,546	81,92	309

Enzim İnhibisyonu Araştırma Bulguları

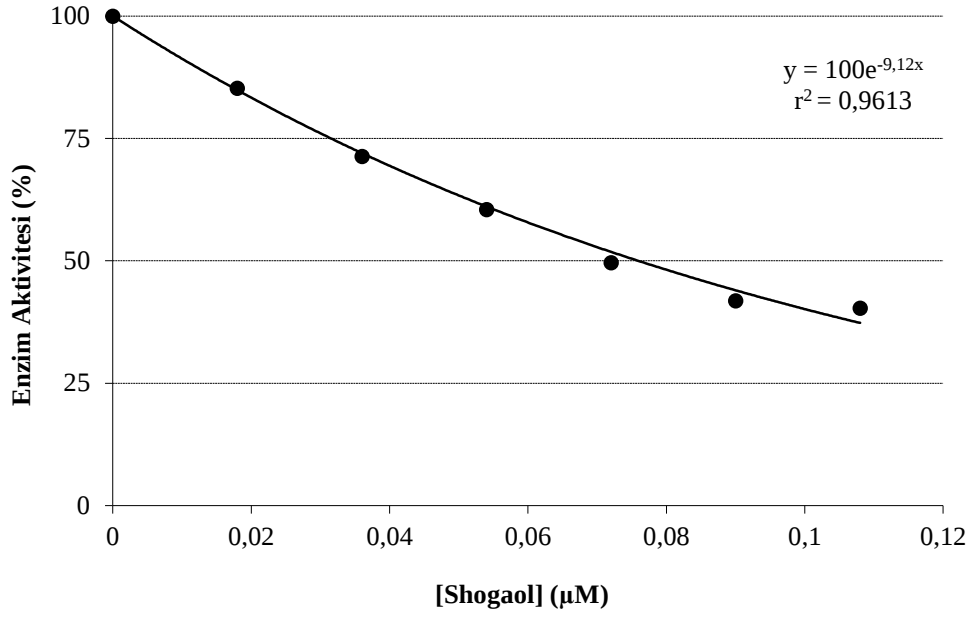
Shogaol'ün hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde esteraz aktivitesi inhibisyon bulguları

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitelerini belirlemek için yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle numunenin farklı konsantrasyonlarına karşı % enzim aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 44 ve 45). Grafiklerden elde edilen denklemlerden hCA I ve hCA II izoenzimleri için IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değerleri hCA I izoenzimi için 75,91 nM ($r^2:0,9613$), hCA II izoenzimi için 47,04 nM ($r^2:0,9265$) olarak bulundu (Tablo 23).

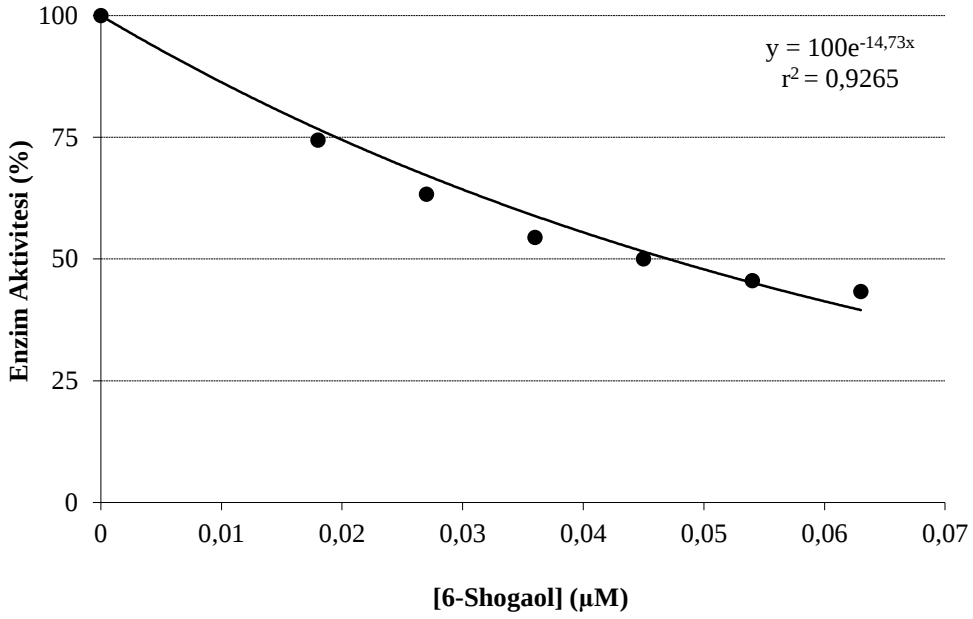
Tablo 23. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Esteraz Aktivitesi IC_{50} Değerleri

	IC_{50} (nM)	r^2
hCA I	75,91	0,9613
hCA II	47,04	0,9265

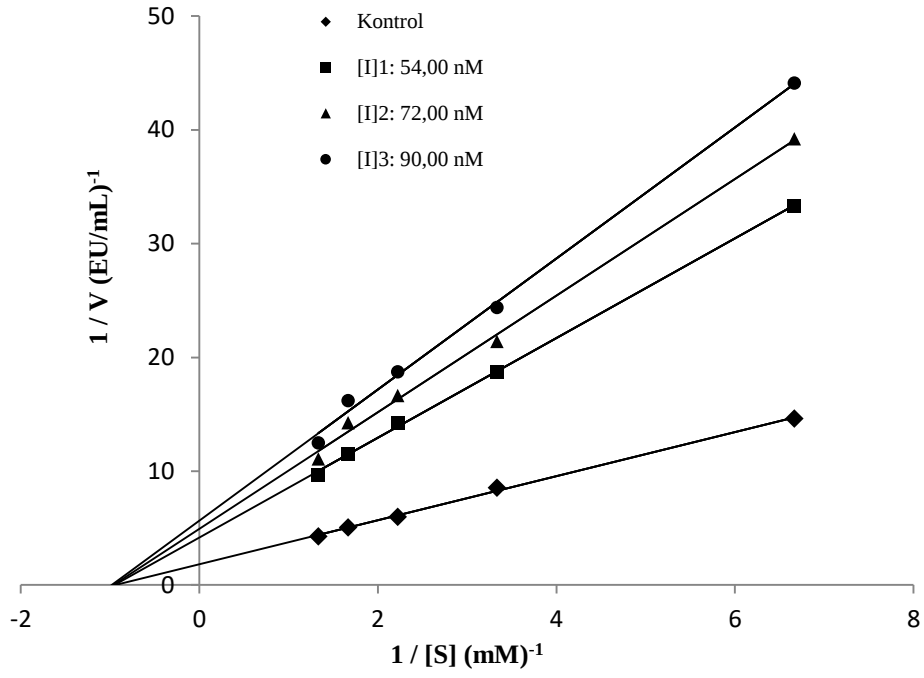
hCA I ve hCA II izoenzimlerinin K_i değerlerini bulmak için substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat'ın 5 farklı konsantrasyonu ve numunenin de 3 farklı konsantrasyonu ile çalışılarak elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 46 ve 47). Elde edilen grafiklerde kontrol ve 3 farklı numune konsantrasyonu çizgilerinin x ekseninde kesiştiği görüldü. Buradan da Shogaol'ün hem hCA I hem de hCA II izoenzimleri için yarışmasız inhibitör olarak etki gösterdiği belirlendi. hCA I izoenzimi için K_i değerleri I_1 , I_2 ve I_3 için sırasıyla 41,71 nM, 42,00 nM, 42,63 nM, ortalama K_i ise 42,11 nM olarak bulundu. hCA II izoenzimi için K_i değerleri I_1 , I_2 ve I_3 için sırasıyla 31,36 nM, 28,40 nM, 28,67 nM, ortalama K_i ise 29,47 nM olarak bulundu (Tablo 24).



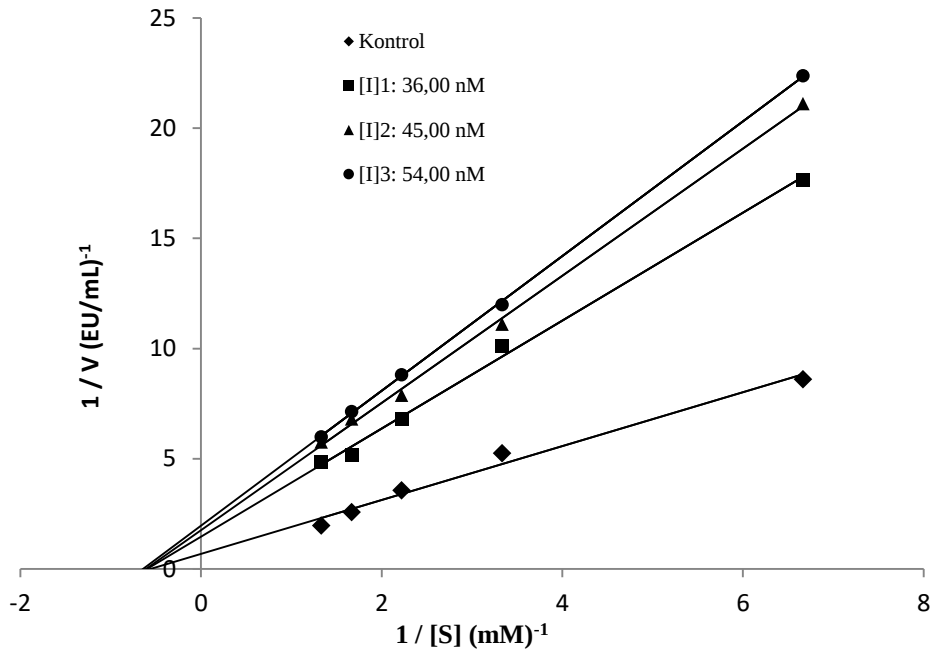
Şekil 44. hCA I izoenziminin 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan esteraz aktivitesi metodu sonucu IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği



Şekil 45. hCA II izoenziminin 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan esteraz aktivitesi metodu sonucu IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği



Şekil 46. hCA I izoenzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 47. hCA II izoenzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

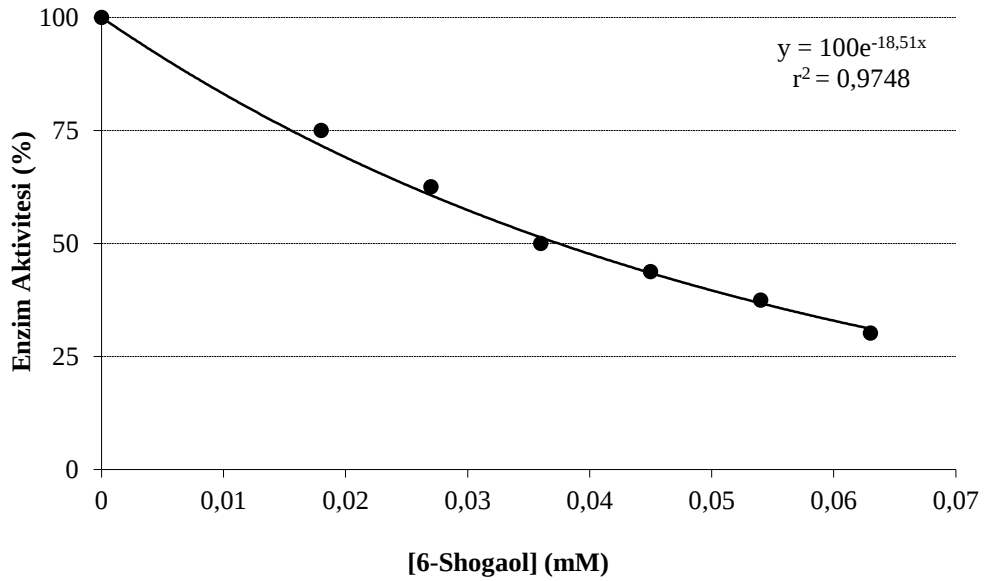
Tablo 24. Shogaol'ün hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC₅₀ ve K_i Değerleri

Enzim	IC ₅₀ (nM)	r ²	[I] (nM)	K _i değerleri (nM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
hCA I	75,91	0,9613	[I] ₁ : 54,00	41,71	42,11	Yarışmasız
			[I] ₂ : 72,00	42,00		
			[I] ₃ : 90,00	42,63		
hCA II	47,04	0,9265	[I] ₁ : 36,00	31,36	29,47	Yarışmasız
			[I] ₂ : 45,00	28,40		
			[I] ₃ : 54,00	28,67		

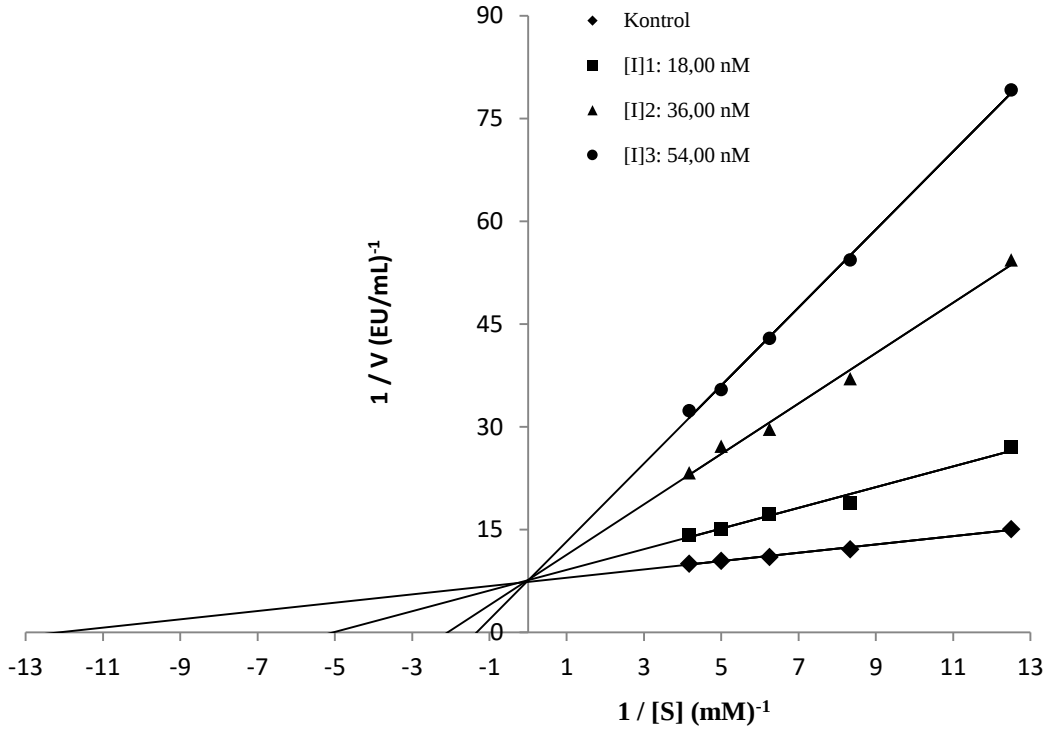
Shogaol'ün asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki aktivite bulguları

İnhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle numunenin farklı konsantrasyonlarına karşı % enzim aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 48). Grafikten elde edilen denklemden IC₅₀ değeri hesaplandı. IC₅₀ değeri 37,44 nM (r²:0,9748) olarak bulundu.

Asetilkolinesteraz enziminin K_i değerini bulmak için substrat olarak kullanılan asetilkolin iyodatin 5 farklı konsantrasyonu ve numunenin de 3 farklı konsantrasyonu ile çalışılarak elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 49). Elde edilen grafikte kontrol ve 3 farklı numune konsantrasyonu çizgilerinin y ekseninde çakıştığı görüldü. Buradan da Shogaol'ün asetilkolinesteraz enzimi için yarışmalı inhibitör olarak etki gösterdiği belirlendi. AChE enzimi için K_i değerleri I₁, I₂ ve I₃ için sırasıyla 12,74 nM, 7,44 nM, 6,67 nM, ortalama K_i ise 8,95 nM olarak bulundu (Tablo 25).



Şekil 48. Asetilkolinesteraz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği

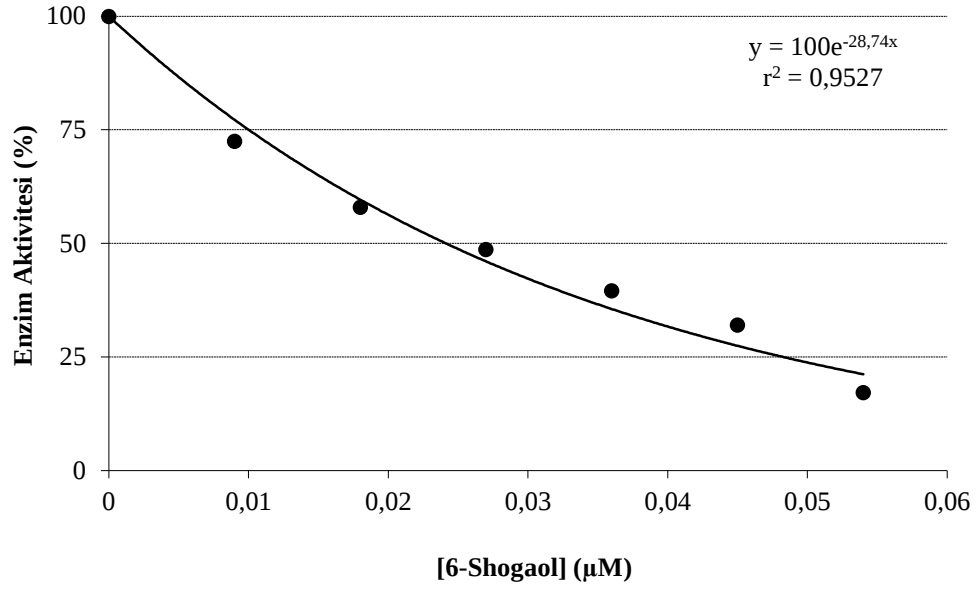


Şekil 49. Asetilkolinesteraz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

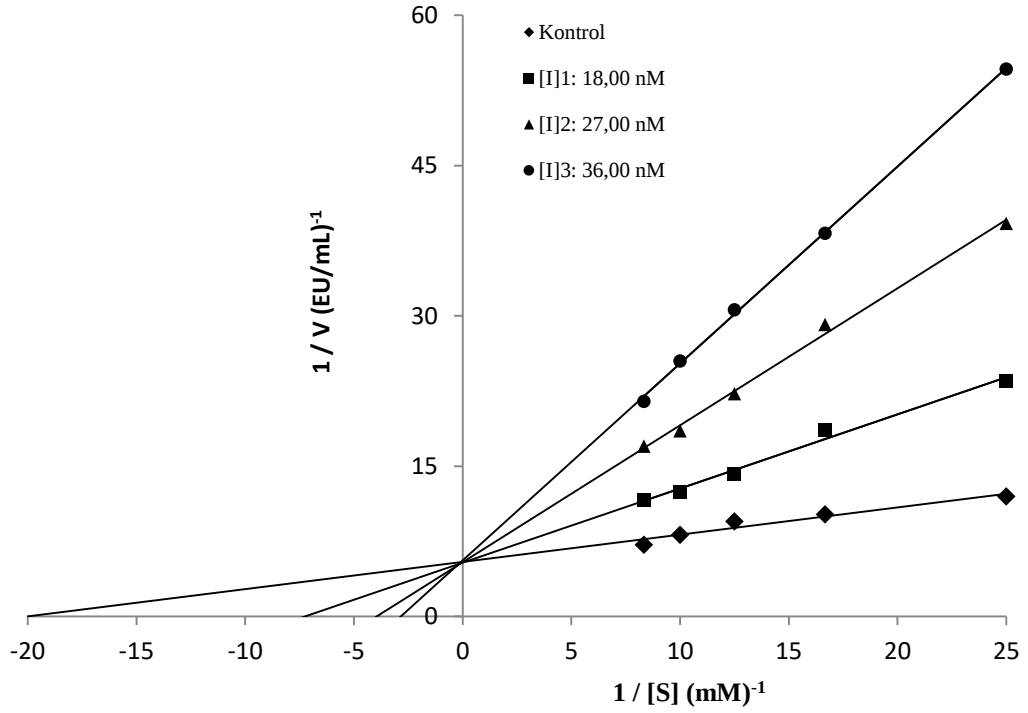
Shogaol'ün bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki aktivite bulguları

İnhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle numunenin farklı konsantrasyonlarına karşı % enzim aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 50). Grafikten elde edilen denklemden IC_{50} değeri hesaplandı. IC_{50} değeri 24,11 nM ($r^2:0,9527$) olarak bulundu.

Bütirilkolinesteraz enziminin K_i değerini bulmak için substrat olarak kullanılan bütirilkolin iyodatın 5 farklı konsantrasyonu ve numunenin de 3 farklı konsantrasyonu ile çalışılarak elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 51). Elde edilen grafikte kontrol ve 3 farklı numune konsantrasyonu çizgilerinin y ekseninde çakıştığı görüldü. Buradan da Shogaol'ün bütirilkolinesteraz enzimi için yarışmalı inhibitör olarak etki gösterdiği belirlendi. BChE enzimi için K_i değerleri I_1 , I_2 ve I_3 için sırasıyla 10,22 nM, 6,64 nM, 5,96 nM, ortalama K_i ise 7,60 nM olarak bulundu (Tablo 25).



Şekil 50. Bütirilkolinesteraz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği



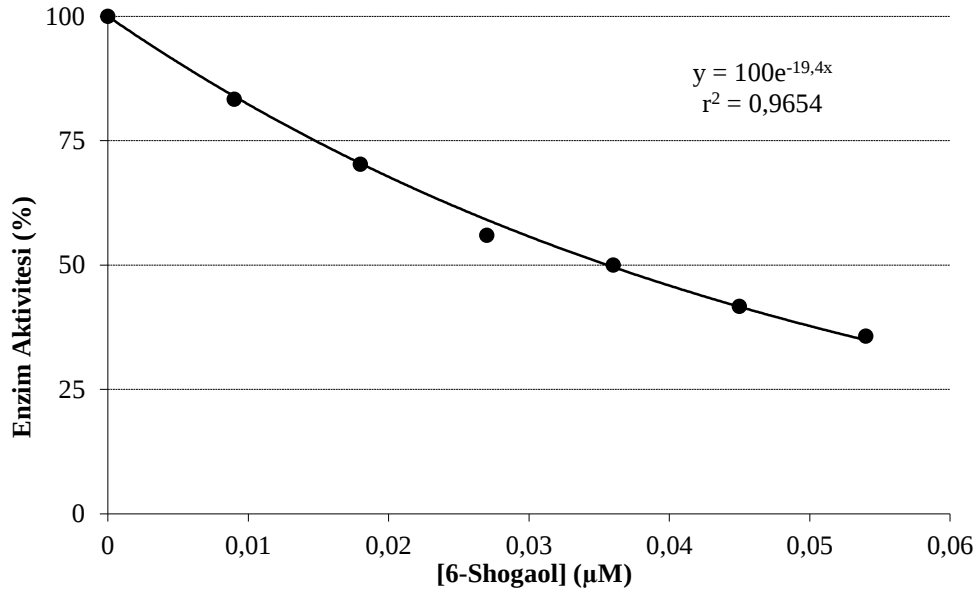
Şekil 51. Bütirilkolinesteraz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 25. Shogaol'ün Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Enzimleri Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC₅₀ ve Ki Değerleri

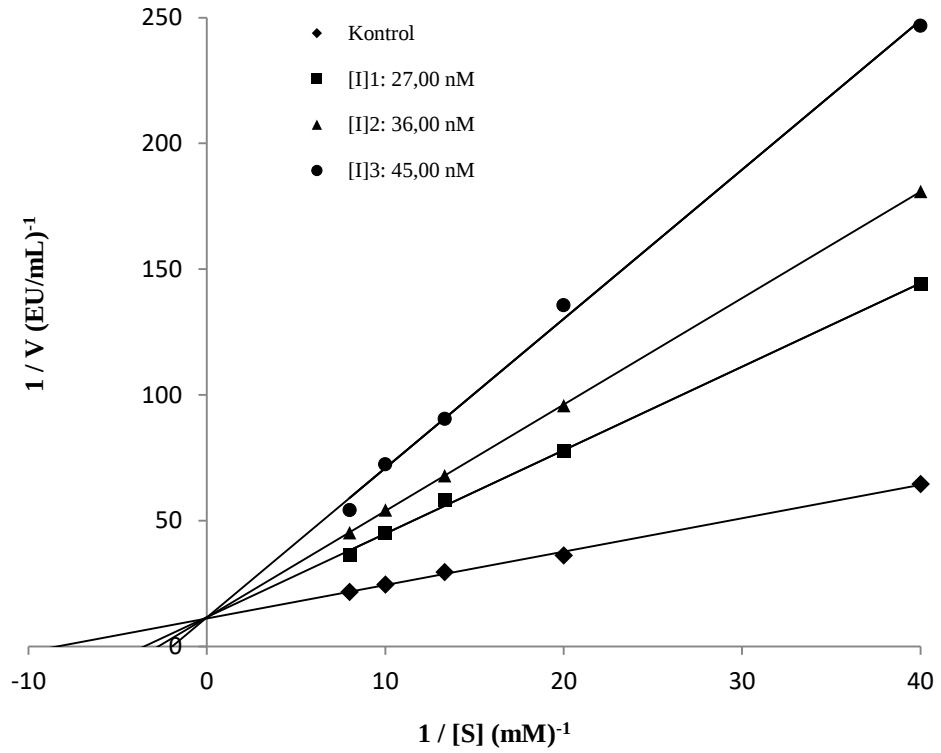
Enzim	IC ₅₀ (nM)	r ²	[I] (nM)	K _i değerleri (nM)	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
AChE	37,44	0,9748	[I] ₁ : 18,00 [I] ₂ : 36,00 [I] ₃ : 54,00	12,74 7,44 6,67	8,95	Yarışmalı
BChE	24,11	0,9527	[I] ₁ : 18,00 [I] ₂ : 27,00 [I] ₃ : 36,00	10,22 6,64 5,96	7,60	Yarışmalı

Shogaol'ün α-glikozidaz enzimi üzerindeki aktivite bulguları

İnhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle numunenin farklı konsantrasyonlarına karşı % enzim aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 52). Grafikten elde edilen denklemden IC₅₀ değeri hesaplandı. IC₅₀ değeri 35,72 nM (r²:0,9654) olarak bulundu. α-Glikozidaz enziminin K_i değerini bulmak için substrat olarak kullanılan PNPg'nin 5 farklı konsantrasyonu ve numunenin de 3 farklı konsantrasyonu ile çalışılarak elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 53). Elde edilen grafikte kontrol ve 3 farklı numune konsantrasyonu çizgilerinin y ekseninde çakıştığı görüldü. Buradan da Shogaol'ün α-glikozidaz enzimi için yarışmalı inhibitör olarak etki gösterdiği belirlendi. α-Glikozidaz enzimi için K_i değerleri I₁, I₂ ve I₃ için sırasıyla 19,56 nM, 17,33 nM, 13,62 nM, ortalama K_i ise 16,83 nM olarak bulundu (Tablo 26).



Şekil 52. α-Glikozidaz enzimi için 6 farklı Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği



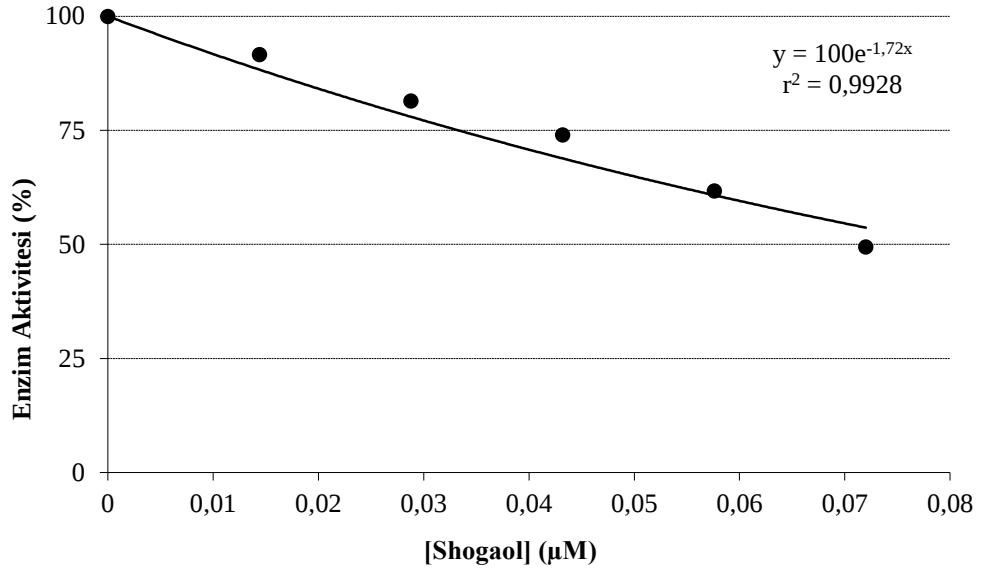
Şekil 53. α -Glikozidaz enzimi için 5 farklı substrat konsantrasyonu ve 3 farklı Shogaol konsantrasyonunda K_i değerlerinin bulunması için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 26. Shogaol'ün α -Glikozidaz Enzimi Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Türü, IC_{50} ve K_i Değerleri

Enzim	IC_{50} (nM)	r^2	[I] (nM)	K_i değerleri (nM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
α -Glikozidaz	35,72	0,9654	[I] ₁ : 27,00	19,56	16,83	Yarışmalı
			[I] ₂ : 36,00	17,33		
			[I] ₃ : 45,00	13,62		

Shogaol'ün α -amilaz enzimi üzerindeki aktivite bulguları

İnhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle numunenin farklı konsantrasyonlarına karşı % enzim aktivitesi grafiği çizildi (Şekil 54). Grafikten elde edilen denklemden IC_{50} değeri hesaplandı. IC_{50} değeri 402,90 nM (r^2 :0,9928) olarak bulundu (Tablo 27).



Şekil 54. α -Amilaz enzimi için Shogaol konsantrasyonu ile yapılan inhibisyon çalışması sonucu IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Enzim Aktivitesi-[Shogaol] grafiği

Tablo 27. Shogaol'ün α -Amilaz Enzimi Üzerinde Gösterdiği İnhibisyon Aktivitesi IC_{50} Değeri

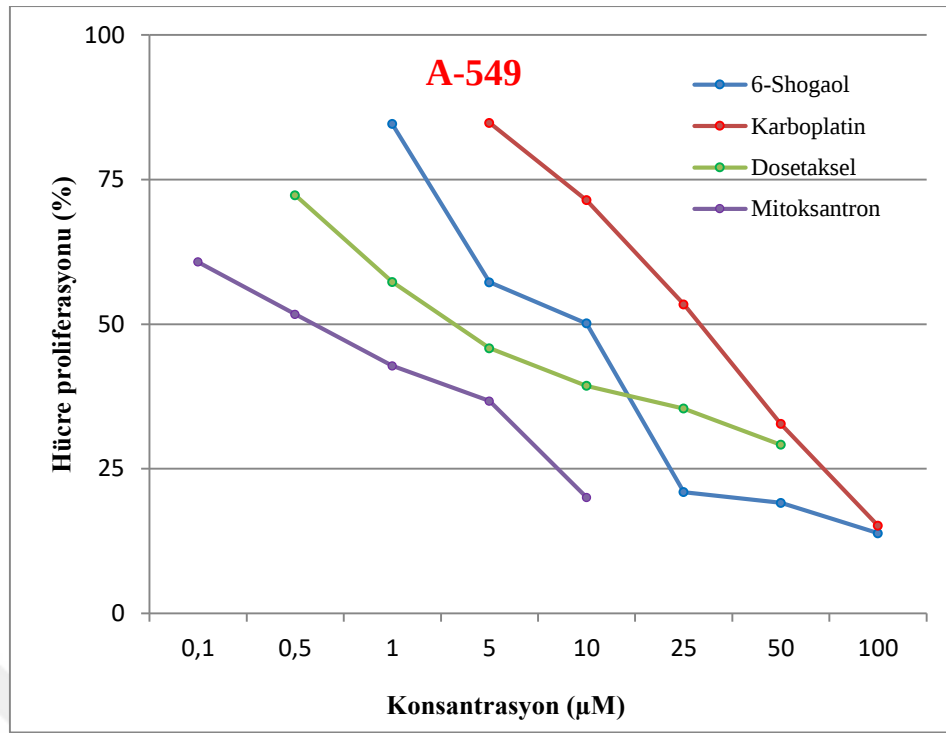
Enzim	IC_{50} (nM)	r^2
α -Amilaz	402,90	0,9928

Antikanser Araştırma Bulguları

A-549 insan akciğer kanseri hücre hattı araştırma bulguları

Shogaol'ün A-549 insan akciğer kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif etkisi araştırılırken kemoterapötik ilaçlar mitoksantron, karboplatin ve dosetaksel kullanıldı. 415 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen verilerle konsantrasyona karşı % hücre proliferasyonu grafiği çizildi (Şekil 55). A-549 insan akciğer kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaçlardan mitoksantronun (IC_{50} : 2,74 μ M) en etkili antiproliferatif aktivite gösterdiği; mitoksantrondan sonra sırasıyla dosetaksel (IC_{50} : 4,35 μ M), Shogaol (IC_{50} : 11,49 μ M) ve karboplatinin (IC_{50} : 62,93 μ M) antiproliferatif etki gösterdiği bulundu (Tablo 28). Shogaol'ün, A-549 insan akciğer kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaç Karboplatin'den daha etkili antiproliferatif aktivite gösterdiği görüldü. Shogaol ve standart kemoterapötik ilaçların IC_{50} değerlerinin küçükten büyüğe doğru sıralaması aşağıdaki gibidir:

$$\text{Mitoksantron} < \text{Dosetaksel} < \text{Shogaol} < \text{Karboplatin}$$



Şekil 55. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) A-549 insan akciğer kanserihücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri

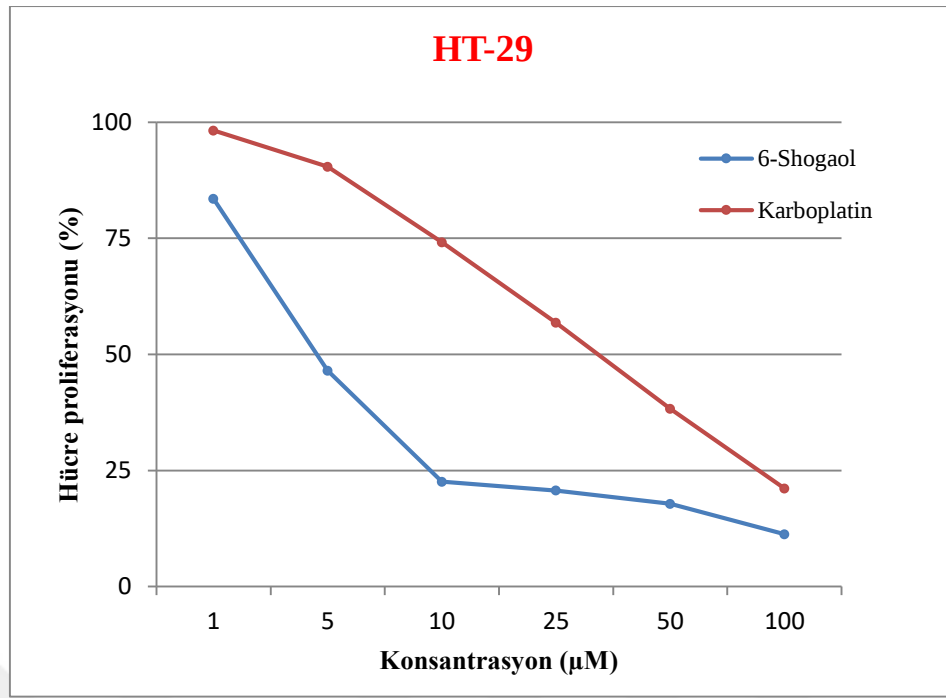
Tablo 28. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların A-549 İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)
Karboplatin	62,93
Shogaol	11,49
Dosetaksel	4,35
Mitoksantron	2,74

HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı araştırma bulguları

HT-29 insan kolon kanseri hücre hattına karşı standart kemoterapötik ilaç karboplatin ve Shogaol'ün antiproliferatif etkisi araştırıldı. 415 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen verilerle konsantrasyona karşı % hücre proliferasyonu grafiği çizildi (Şekil 56). Shogaol'ün (IC₅₀: 8,38 μM), HT-29 insan kolon kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaç Karboplatin'den (IC₅₀: 46,16 μM) daha etkili antiproliferatif aktivite gösterdiği bulundu (Tablo 29). Bu sonuçlara göre Shogaol ve Karboplatin'in IC₅₀ değerlerinin küçükten büyüğe doğru sıralaması aşağıdaki gibidir:

$$\text{Shogaol} < \text{Karboplatin}$$



Şekil 56. Shogaol bileşiği ve kemoterapötik ilaç Karboplatin'in HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri

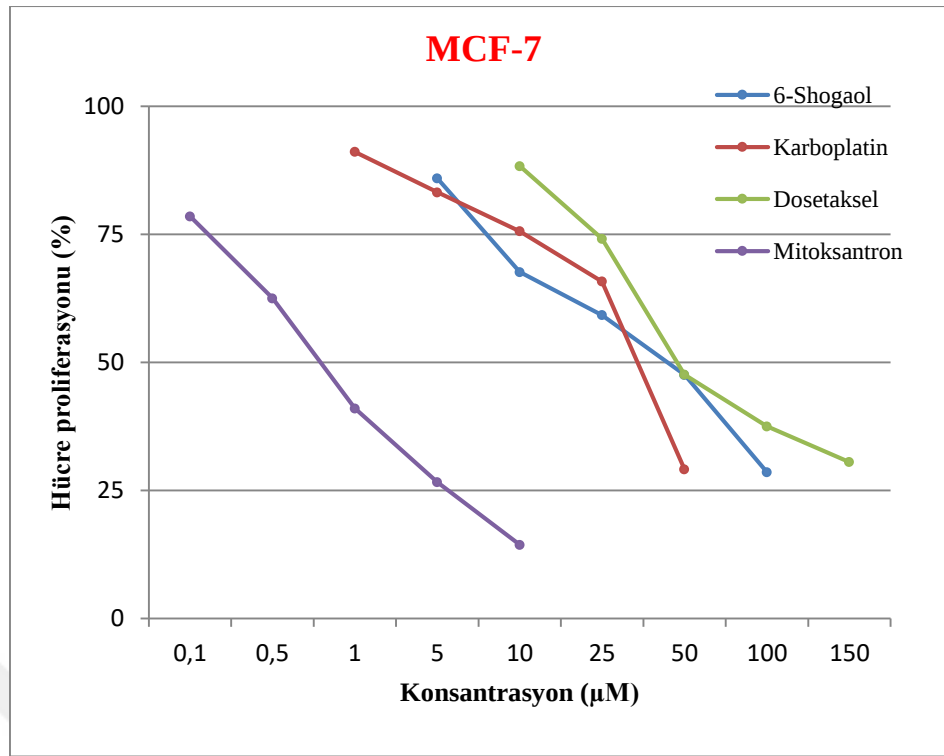
Tablo 29. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaç Karboplatin'in HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	IC ₅₀ (µM)
Shogaol	8,38
Karboplatin	46,16

MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattı araştırma bulguları

Shogaol'ün MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif etkisi araştırılırken standart kemoterapötik ilaçlar mitoksantron, karboplatin ve dosetaksel kullanıldı. 415 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen verilerle konsantrasyona karşı % hücre proliferasyonu grafiği çizildi (Şekil 57). MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaçlardan mitoksantronun (IC₅₀: 2,55 µM) en etkili aktiviteyi gösterdiği; mitoksantrondan sonra sırasıyla karboplatin (IC₅₀: 16,36 µM), Shogaol (IC₅₀: 51,31 µM) ve dosetakselin (IC₅₀: 74,61 µM) antiproliferatif etki gösterdiği bulundu (Tablo 30). Shogaol'ün, MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaç Dosetaksel'den daha etkili antiproliferatif aktivite gösterdiği görüldü. Bu sonuçlara göre Shogaol ve standart kemoterapötik ilaçların IC₅₀ değerlerinin küçükten büyüğe doğru sıralaması aşağıdaki gibidir:

$$\text{Mitoksantron} < \text{Karboplatin} < \text{Shogaol} < \text{Dosetaksel}$$



Şekil 57. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) MCF-7 insan göğüs kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri

Tablo 30. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların MCF-7 İnsan Göğüs Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC₅₀ Değerleri

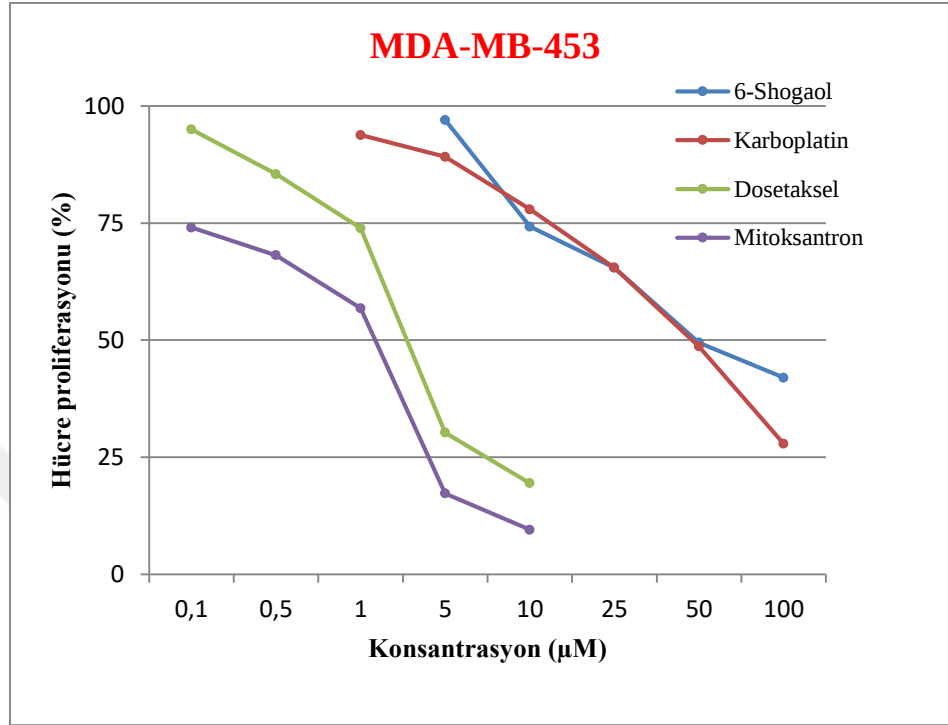
Bileşikler	IC ₅₀ (µM)
Dosetaksel	74,61
Shogaol	51,31
Karboplatin	16,36
Mitoksantron	2,55

MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattı araştırma bulguları

Shogaol'ün MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı antiproliferatif etkisi araştırılırken standart kemoterapötik ilaçlar mitoksantron, karboplatin ve dosetaksel kullanıldı. 415 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen verilerle konsantrasyona karşı % hücre proliferasyonu grafiği çizildi (Şekil 58). MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaçlardan mitoksantronun (IC₅₀: 2,17 µM) en etkili aktiviteyi gösterdiği; mitoksantrondan sonra sırasıyla dosetaksel (IC₅₀: 4,58 µM), karboplatin (IC₅₀: 22,63 µM) ve Shogaol'ün (IC₅₀: 62,42 µM) antiproliferatif etki gösterdiği bulundu (Tablo 31). Shogaol'ün, MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattına karşı kemoterapötik ilaçlardan daha az antiproliferatif etki gösterdiği görüldü. Bu

sonuçlara göre Shogaol ve standart kemoterapötik ilaçların IC₅₀ değerlerinin küçükten büyüğe doğru sıralaması aşağıdaki gibidir:

Mitoksantron < Dosetaksel < Karboplatin < Shogaol



Şekil 58. Shogaol bileşiği ve standart kemoterapötik ilaçların (karboplatin, dosetaksel ve mitoksantron) MDA-MB-453 insan göğüs kanseri hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri

Tablo 31. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaçların MDA-MB-453 İnsan Göğüs Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC₅₀ Değerleri

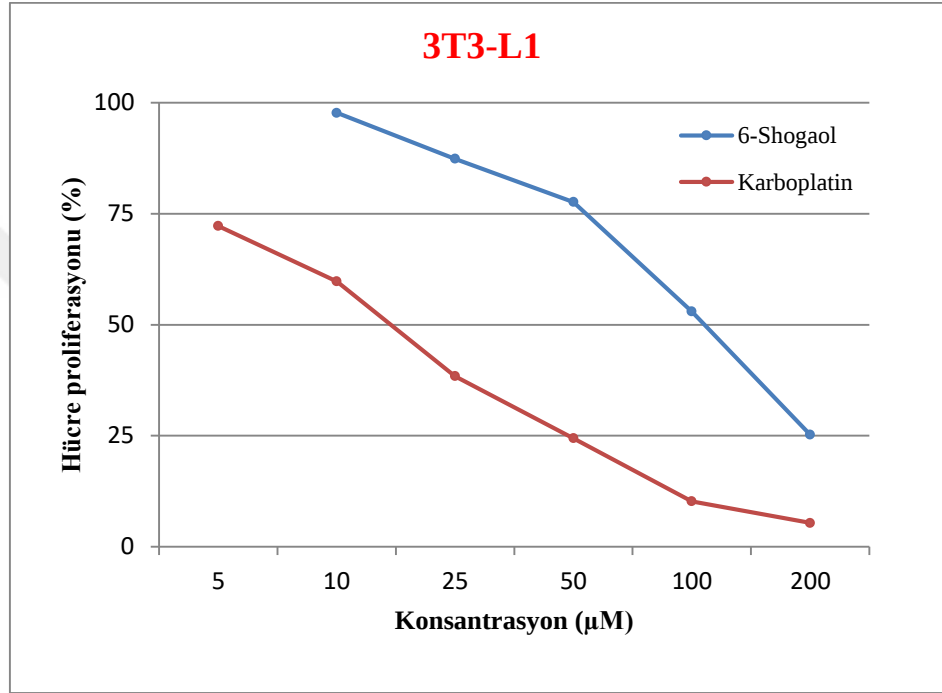
Bileşikler	IC ₅₀ (µM)
Shogaol	62,42
Karboplatin	22,63
Dosetaksel	4,58
Mitoksantron	2,17

3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattı araştırma bulguları

3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattına karşı standart kemoterapötik ilaç karboplatin ve Shogaol'ün antiproliferatif etkisi araştırıldı. 415 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen verilerle konsantrasyona karşı % hücre proliferasyonu grafiği çizildi (Şekil 59). 3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattına karşı Shogaol'ün (IC₅₀: 124,35 µM), kemoterapötik ilaç Karboplatin'den (IC₅₀: 21,32 µM) daha az

antiproliferatif etki gösterdiği bulundu (Tablo 32). Kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların kanser hücrelerini öldürüp sağlıklı hücreleri öldürmemesi hedeflendiğinden Shogaol'un 3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattına karşı standart ilaç olarak kullanılan Karboplatin'den daha az antiproliferatif etki göstermesi bu hedefe uygunluğu noktasından oldukça değerli bir sonuç olarak göze çarpmaktadır. Shogaol ve Karboplatin'in IC₅₀ değerlerinin küçükten büyüğe doğru sıralaması aşağıdaki gibidir:

Karboplatin < Shogaol



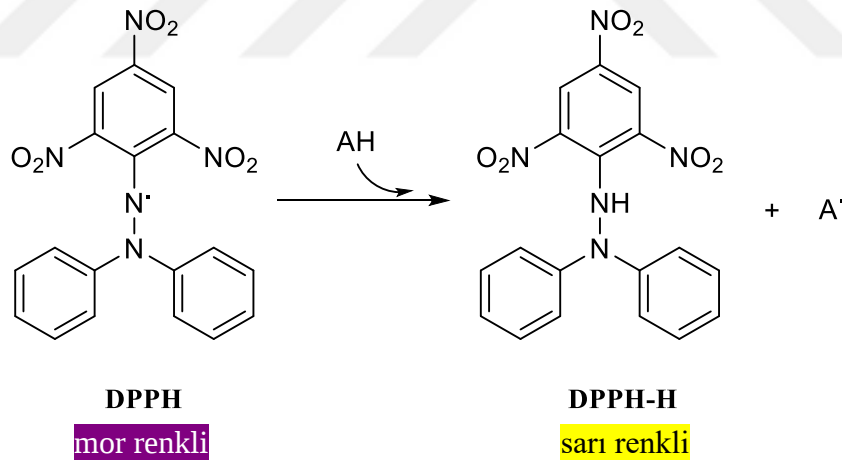
Şekil 59. Shogaol bileşiği ve kemoterapötik ilaç Karboplatin'in 3T3-L1 fare fibroblast hücre hattı üzerine doz-bağımlı antiproliferatif etkileri

Tablo 32. Shogaol ve Standart Kemoterapötik İlaç Karboplatin'in 3T3-L1 Fare Fibroblast Normal Hücre Üzerinde Gösterdiği Antiproliferatif Etki IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	IC ₅₀ (µM)
Karboplatin	21,32
Shogaol	124,35

TARTIŞMA VE SONUÇ

DPPH radikali giderme metodu, ilk olarak Blois (1958) tarafından rapor edilen, antioksidanların serbest radikalleri giderme aktivitelerini değerlendirmede sıklıkla kullanılan, kolay, ekonomik, basit, hızlı ve enzimatik olmayan bir metottur. DPPH radikali, elektron delokalizasyonu sayesinde dimerizasyona uğramadığı için kararlı, uzun ömürlü, koyu mavi-mor renkli ve 517 nm’de maksimum absorbands gösteren bir azot radikalidir. Ticari olarak elde etmek kolaydır ve deneyden önce oluşturulmak zorunda değildir. Halbuki başka bir radikal olan ABTS radikali deney yapmadan önce üretilmek durumundadır. H atomu veren bir antioksidan ile reaksiyona sokulduğunda DPPH radikali indirgenir, radikal olmayan DPPH-H oluşur, koyu mavi-mor renk açık sarı renge döner ve 517 nm’de absorbands azalışı olur (Şekil 60).Metodun duyarlılığı, kullanılan çözücü miktarı, H atomu konsantrasyonu, metal iyonlarının varlığı ve DPPH reaktifinin tazeliğinden etkilenebilir. Metodun bir dezavantajı ise 517 nm dalga boyuna yakın dalga boylarında başka bileşiklerin de absorbsiyon vermesidir. Örneğin antosiyaninler 500-550 nm’de güçlü absorbsiyon verirler. Bu durum sonuçlar yorumlanırken girişim olup olmadığının da değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarır (Gülçin 2020).



Şekil 60. Bir antioksidanın DPPH radikali giderme mekanizması

Araştırmamızda 30 µg/mL konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların DPPH· giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri dikkate alındığında sırasıyla şöyle bulundu: Troloks (IC₅₀: 10,884 µg/mL) > BHA (IC₅₀: 18,458 µg/mL) > Shogaol (IC₅₀: 24,791 µg/mL) > BHT (IC₅₀: 28,115 µg/mL).

Shogaol’ün bir standart olan BHT’den daha etkili, diğer standartlar Troloks ve BHA’dan ise daha düşük aktivite gösterdiği görüldü.

Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşikler için yapılan araştırmalarda bulunan DPPH[·] giderme aktivitesi ile ilgili IC₅₀ değerleri Tablo 33'te verilmiştir. Tablo 33'e bakıldığında Shogaol'ün standart olarak kullanılan BHT ve kurkumin, kuersetin, p-kumarik asit, oktopamin, kapsaisin, sinefrin, fenilefrin bileşiklerinden daha etkili; gingerol, ferulik asit, rutinhidrat, gallik asit gibi bileşiklerden daha düşük oranda DPPH[·] giderme aktivitesi sergilediği görülmektedir.

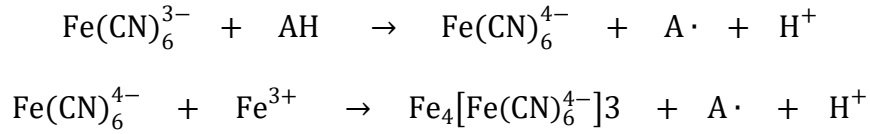
Tablo 33. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşikler İçin DPPH[·] Giderme Aktivitesi IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	IC ₅₀ (µg/mL)
Shogaol	24,79
BHA*	18,45
BHT*	28,11
Troloks*	10,88
Gingerol	17,33
Kurkumin	34,90
L-Adrenalin	30,60
Kuersetin	31,41
Ferulik asit	17,37
p-Kumarik asit	48,85
p-Hidroksi benzoik asit	46,29
Gallik asit	16,13
Oktopamin	138,60
Filoretin	24,75
Rutinhidrat	10,04
Kapsaisin	34,65
Sinefrin	49,50
Fenilefrin	53,30

*Standart olarak kullanılan bileşik

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme kapasitesi Fe[(CN)₆]₃'ün Fe[(CN)₆]₂'ye indirgenmesi ile direkt olarak ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne serbest Fe³⁺ eklenirse 700 nm'de güçlü absorbans veren Perl's Prussian Blue kompleksi oluşur. Test çözeltisinin sarı rengi antioksidan numunenin indirgeme gücüne bağlı olarak mavi veya yeşil rengin tonlarına değişir. Absorbanstaki artış kompleks oluşumunun arttığını, bu da indirgeme kapasitesindeki artışı gösterir. Bileşiğin indirgeme kapasitesi onun potansiyel antioksidan

aktivitesinin önemli bir göstergesi olarak hizmet edebilir. Fakat araştırmalarda bildirilmiştir ki, antioksidanlar ile Fe^{3+} arasındaki birkaç dakikadan birkaç saate kadar olan reaksiyon süresine göre sonuçlar değişiklik gösterebilir (Pulido *et al.* 2020).



Araştırmamızda 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların Fe^{3+} indirgeme kapasiteleri sırasıyla şöyle bulundu: BHA (λ_{700} : 3,390) > BHT (λ_{700} : 3,370) > Shogaol (λ_{700} : 1,511) > Troloks (λ_{700} : 1,491).

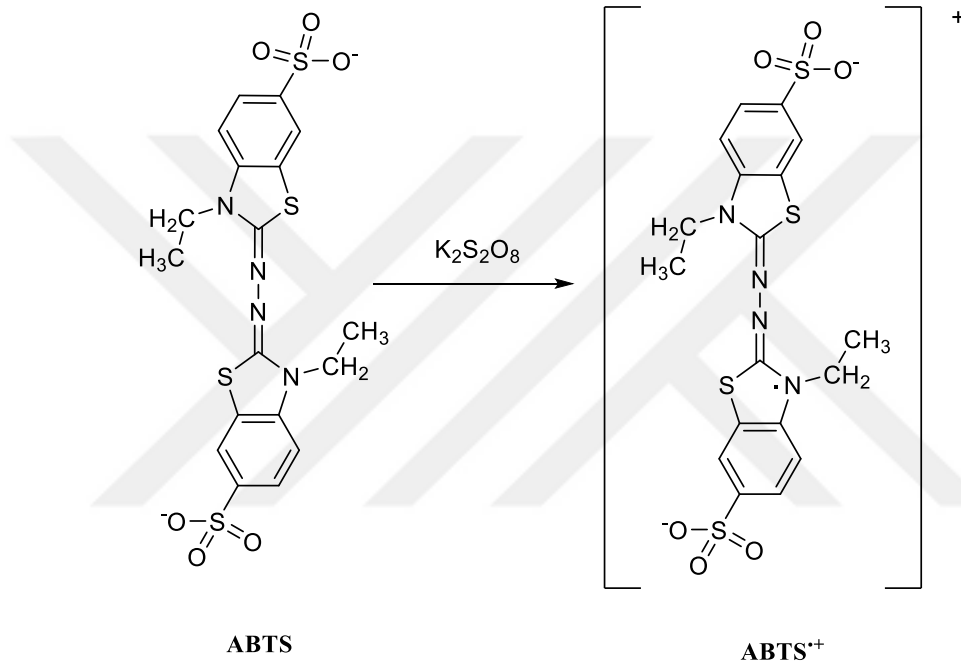
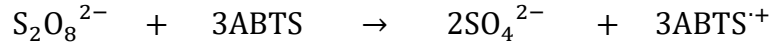
Shogaol'ün bir standart olan Troloks'tan daha etkili, diğer standartlar olan BHA ve BHT'den ise daha düşük aktivite gösterdiği görüldü. Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşikler için yapılan araştırmalarda bulunan Fe^{3+} indirgeme kapasitesi ile ilgili absorbands değerleri Tablo 34'te verilmiştir. Tablo 34'e bakıldığında Shogaol'un bir standart olan Troloks'tan ve gingerol, olivetol bileşiklerinden daha etkili Fe^{3+} indirgeme kapasitesi sergilediği görülmektedir.

Tablo 34. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Fe^{3+} İndirgeme Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri

Konsantrasyon	Bileşikler	Absorbans (700 nm)
30 $\mu\text{g/mL}$	Shogaol	1,511
	BHA*	3,390
	BHT*	3,170
	Troloks*	1,491
	Gingerol	1,084
	Olivetol	0,864
20 $\mu\text{g/mL}$	Oktopamin	0,306
	Kuersetin	1,556
	p-Kumarik asit	0,506
	p-Hidroksi benzoik asit	0,303
	Filoretin	0,933
	Sinefrin	0,258
	Fenilefrin	0,278
10 $\mu\text{g/mL}$	Kapsaisin	0,757

*Standart olarak kullanılan bileşik

ABTS^{•+}, hem lipofilik (yağ seven) hem hidrofilik (su seven) bileşikler için uygun bir metottur. Bu metotla saf maddelerin, sulu karışımların, içeceklerin antioksidan aktivitelerinin ölçümü yapılabilir. Spektrofotometrik metot olan ABTS^{•+} giderme metodu, ABTS radikallerinin üretilip 734 nm dalga boyunda ABTS radikal kationunun absorpsiyonunun azalması esasına dayalıdır. ABTS radikalleri genellikle ABTS ile K₂S₂O₈ reaksiyona sokularak üretilir. ABTS^{•+}, gıda bileşenlerindeki antioksidanlarla 30 dk gibi bir süre içinde hızlıca reaksiyona girer. Geniş bir pH aralığında kullanılabilir (Gülçin 2020).



Şekil 61. ABTS ile K₂S₂O₈'in oksidasyonu ve ABTS^{•+} üretimi

ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftir. DPPH radikalleri ile ilgili reaksiyonlar HAT içerir, ABTS radikali ile ilgili reaksiyonlar ise genellikle SET içerir (Kaviarasan *et al.* 2007; Köksal vd 2009). Araştırmamızda 5 µg/mL konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların ABTS^{•+} giderme aktivitesi IC₅₀ değerleri dikkate alındığında sırasıyla şöyle bulundu: BHA (IC₅₀: 4,588 µg/mL) > BHT (IC₅₀: 4,980 µg/mL) > Shogaol (IC₅₀: 5,611 µg/mL) > Troloks (IC₅₀: 6,707 µg/mL).

Shogaol'un bir standart olan Troloks'tan daha etkili, diğer standartlar BHA ve BHT'den ise daha düşük aktivite gösterdiği görüldü.

Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin yapılan araştırmalarda bulunan ABTS^{•+} giderme aktivitesi ile ilgili IC₅₀ değerleri Tablo 35'te verilmiştir. Tablo 35'e bakıldığında Shogaol'un bir standart olan Troloks'tan ve kuersetin, p-kumarik asit, ferulik

asit, oktopamin, sirinjik asit, elajik asit bileşiklerinden daha etkili; rutinhidrat, kapsaisin, sinefrin, gingerol bileşiklerinden daha düşük oranda ABTS^{•+} giderme aktivitesi sergilediği görülmektedir.

Tablo 35. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşikler İçin ABTS^{•+} Giderme Aktivitesi IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	IC ₅₀ (µg/mL)
Shogaol	5,61
BHA*	4,58
BHT*	4,98
Troloks*	6,70
Gingerol	5,33
L-Adrenalin	6,93
Elajik asit	13,75
Kuersetin	14,35
Ferulik asit	11,50
p-Kumarik asit	22,56
p-Hidroksi benzoik asit	45,16
Gallik asit	11,14
Sirinjik asit	10,65
Oktopamin	22,35
Filoretin	2,24
Rutinhidrat	4,95
Kapsaisin	4,33
Sinefrin	4,20
Fenilefrin	7,70

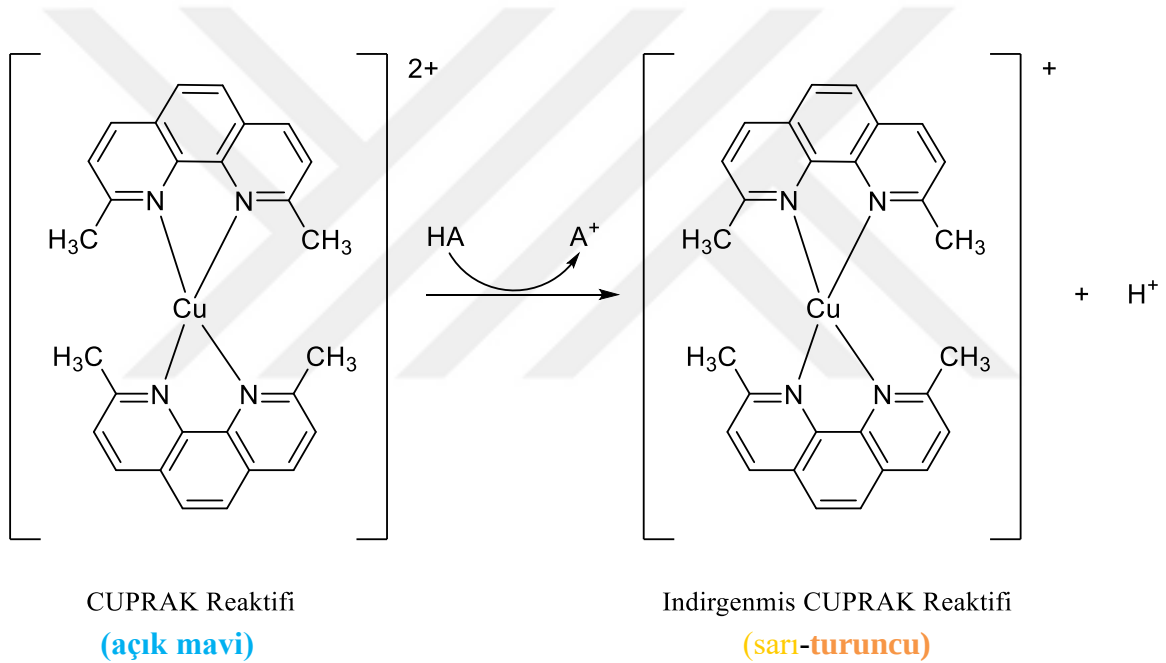
*Standart olarak kullanılan bileşik

Cuprak metodu, heterosiklik bir bileşik ve şelatlama ajanı olan neokuprinin varlığında ve sulu etanolik ortamda (pH:7) Cu²⁺'nın Cu¹⁺'e antioksidanlar tarafından indirgenmesi esasına dayanır. Başlangıçta iki değerli olan Cuprak reaktifinin açık mavi olan rengi reaksiyondan sonra oluşan indirgenmiş bir değerlikli Cuprak reaktifi sayesinde sarı-turuncu renge döner ve bu kompleks 450 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Bu metot, kimyasal tipine ve hidrofobikliğine bakılmaksızın birçok antioksidan için uygulanabilen, maliyeti uygun, kolay ulaşılabilir, hızlı, stabil, seçici bir metottur. Bu metotla hem hidrofilik hem lipofilik antioksidanların aktivite ölçümü yapılabilir. *In vitro*

uygulanabilirliğinin yanında *in vivo* olarak da uygulanabilir. Cuprak reaktifinin diğer oksidatif reaktiflere göre redoks potansiyeli düşüktür ve daha kararlıdır (Gülçin 2020). Araştırmamızda 30 µg/mL konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların Cuprak metoduna göre antioksidan aktiviteleri absorbans değerlerine göre sırasıyla şöyle bulundu: BHA (λ_{450} : 1,297) > BHT (λ_{450} : 1,295) > Shogaol (λ_{450} : 1,041) > Troloks (λ_{450} : 0,909).

Shogaol'ün bir standart olan Troloks'tan daha etkili, diğer standartlar BHA ve BHT'den ise daha düşük aktivite gösterdiği görüldü.

Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin Cuprak metoduna göre bulunan absorbans değerleri Tablo 36'de verilmiştir. Tablo 36'ye bakıldığında Shogaol'ün standart olarak kullanılan Troloks'tan ve gingerol bileşiğinden daha etkili; olivetol bileşiğinden daha düşük oranda Cu^{2+} indirgeme kapasitesi sergilediği görülmektedir.



Şekil 62. Bir antioksidan ile Cuprak reaktifi arasındaki varsayılan reaksiyon mekanizması

Tablo 36. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Cuprak Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri

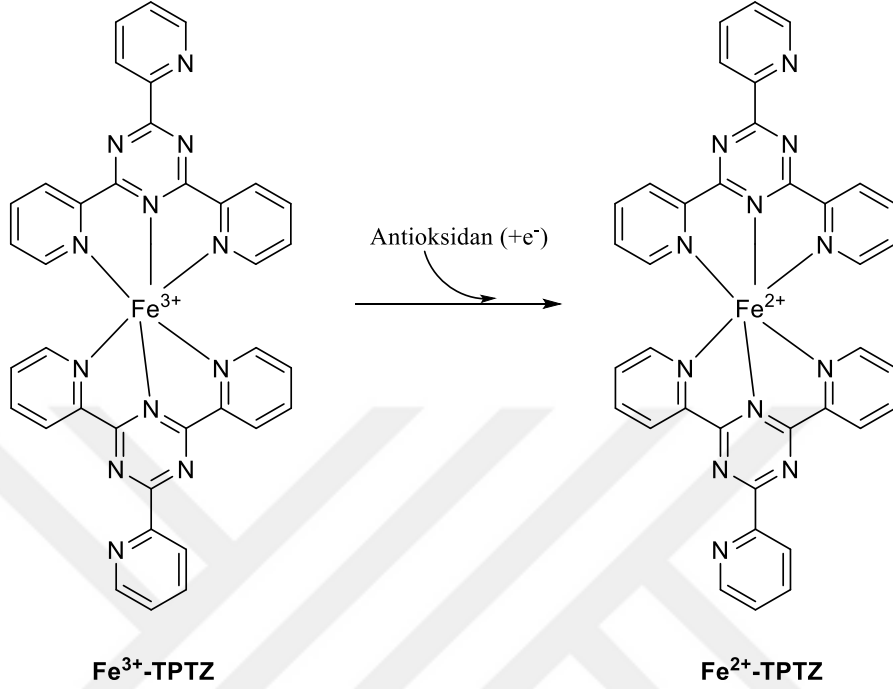
Konsantrasyon	Bileşikler	Absorbans (450 nm)
30 µg/mL	Shogaol	1,041
	BHA*	1,297
	BHT*	1,295
	Troloks*	0,909
	Gingerol	0,343
	Olivetol	1,314
20 µg/mL	Oktopamin	0,195
	Kuersetin	1,590
	p-kumarik asit	0,918
	p-hidroksi benzoik asit	0,610
	Filoretin	0,369
	Sinefrin	0,258
10 µg/mL	Fenilefrin	0,116
	Kapsaisin	0,402

*Standart olarak kullanılan bileşik

FRAP metodu tipik bir elektron transferine dayalı metottur. Asidik ortamda ferrik 2,4,6-tripirydyl-s-triazine kompleksinin ($[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) antioksidanlar tarafından koyu mavi renkli ferröz 2,4,6-tripirydyl-s-triazine kompleksine ($[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) indirgenmesi (Şekil 63) ve bu kompleksin 593 nm’de absorbans vermesi esasına dayanır. FRAP metodu, sıvılara, gıdalara, bitki ekstraktlarına, baharatlara, sebzelere, içeceklere, çaya, meyve sularına uygulanabilir. Basit, ucuz, hızlı, güçlü metottur ve özel ekipman gerektirmez. FRAP metodu demirin çözünürlüğünü sürdürmek için pH:3,6’da yapılır. FRAP metodunun dezavantajı Fe^{2+} ile reaksiyona giren, –SH grubu içeren antioksidanların, karotenoidlerin antioksidan kapasitesini ölçememesidir (Gülçin 2020).

Araştırmamızda 60 µg/mL konsantrasyonda Shogaol bileşiğinin ve standartların FRAP metoduna göre Fe^{3+} indirgeme kapasitesi absorbans değerlerine göre sırasıyla şöyle bulundu: Shogaol (λ_{593} : 2,238) > BHA (λ_{593} : 2,022) > Troloks (λ_{593} : 1,935) > BHT (λ_{593} : 1,727). Shogaol’ün, 60 µg/mL konsantrasyonda kullanılan standartlardan etkili aktivite gösterdiği görüldü. Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin yapılan araştırmalarda FRAP metoduna göre bulunan Fe^{3+} indirgeme kapasitesi absorbans değerleri Tablo 37’de verilmiştir. Tablo 37’e bakıldığında Shogaol’un FRAP metoduna göre 30 µg/mL

konsantrasyonda BHT ve Troloks standartları ve gingerol, olivetol bileşiklerinden daha etkili Fe^{3+} indirgeme kapasitesi sergilediği görülmektedir. 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Shogaol'un, kullanılan tüm standartlardan daha yüksek aktivite gösterdiği görüldü (Tablo 21).



Şekil 63. FRAP metodunun indirgenme reaksiyonu $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+} - [\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$

Tablo 37. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin FRAP Metoduna Göre Farklı Konsantrasyonlardaki Absorbans Değerleri

Konsantrasyon	Bileşikler	Absorbans (593 nm)
30 $\mu\text{g/mL}$	Shogaol	1,778
	BHA*	1,841
	BHT*	1,347
	Troloks*	1,673
	Gingerol	1,260
	Olivetol	1,260
20 $\mu\text{g/mL}$	Oktopamin	0,397
	Filoretin	0,468
	Sinefrin	0,603
	Fenilefrin	0,485

*Standart olarak kullanılan bileşik

Karbonik anhidraz enzimi pH düzenleyen enzimdir. Hızlı bir şekilde karbondioksitin bikarbonat ve hidrojene hidroliz olmasını katalizler. Bu kataliz hızı 10^4 ile 10^6 kat arasındadır (Gülçin vd 2020). CA'nın tamponlama yaptığı önemli organlar akciğer ve böbreklerdir. 7 farklı genetik ailesi olan CA'nın 16 farklı izoenzimi vardır. Bu izoenzimlerin katalitik aktiviteleri ve inhibisyon afiniteleri farklıdır. En çok çalışılan izoenzimler CA I ve CA II'dir. CA I, serebral ödem ve retinal hastalıkları ile ilişkilidir. CA II, ödem, epilepsi, glukoma hastalıkları ile ilişkilidir. CA'nın inhibisyon mekanizması epilepsi, lösemi, diyabet, kistik fibröz, nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Lolak vd 2020). Genel olarak karbonik anhidrazın oksidatif stres, glukoma, epilepsi, ödem, felç, mide bulantısı gibi hastalıklarla ilişkisi vardır ve bu hastalıkların tedavilerinde CA enziminin inhibe edilmesi mekanizması kullanılmaktadır.

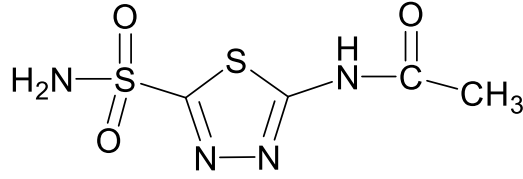
Karbonik anhidraz enziminin inhibisyonu iki şekilde olabilir:

1. İnhibitör aktif bölgede bulunan Zn^{2+} iyonuna bağlı suyu ayırarak yerine bağlanır.
2. İnhibitör Zn^{2+} iyonuna ek bir ligand aracılığıyla bağlanır.

CA inhibitörleri genellikle F^- , Cl^- , CN^- , NCO^- , SCN^- gibi anyonlar ve sülfonamid, sülfamit, sülfonik asit türevleri, aromatik halkalı fenolik bileşikler gibi nötr bileşiklerdir. Özellikle aromatik yapıdaki sülfonamid türevleri karbonik anhidraz enziminin güçlü inhibitörleridir. Sülfonamidlerin genel kimyasal yapısı $R-SO_2NH_2$ şeklindedir. Buradaki R genellikle aromatik halka yapısındadır. Bu bileşikler enzimdeki Zn^{2+} iyonuna $R-SO_2NH_2$ yapısında bulunan N atomu ile sıkıca bağlanır ve enzimi inhibe ederler (Karakuş 2015). Sülfonamidler, çok güçlü farmakolojik aktivitelerinden dolayı antitümör, antikanser, antifungal, antiinflamatuvar, antiprotozoal, antikonvülsan, proteaz inhibitörü olarak yaklaşık 100 yıldır ilaçlarda kullanılmaktadır (Güleç vd 2022).

CA inhibitörü ve antiglukoma, antiepileptik, diüretik ajan olarak asetazolamid, etokszolamid, dorzolamid, methazolamid, diklorfenamid, brinzolamid gibi bileşikler yıllardır kullanılmaktadır (Lolak vd 2020). Bu bileşikler içerisinde asetazolamid bileşiği (Şekil 64) dikkat çekicidir. Asetazolamidin antiglukoma, antidiüretik, antikonvülsan özellikleri vardır. Epileptik nöbet, yükseklik korkusu, merkezi uyku apnesi, sistinüri, hipertansiyon, periyodik paralizi hastalıklarının tedavisinde CA inhibitörü olarak kullanılır. Ticari olarak Diazomid ve Diamox isimleriyle satılır (Karakuş 2015). CA inhibe edilerek akut glukoma hastalığı ve epilepsi tedavisi yapılmaktadır (Akıncıoğlu vd 2013). Yine mide bulantısı, ödem, oksidatif stres, felç, obezite, kısırlık, kanser gibi birçok hastalığın CA enzimleri ile ilişkisi vardır (Alterio *et al.* 2012). Çeşitli hastalıkların tedavisi için

kullanılmakla birlikte *in vitro* CA inhibisyon çalışmalarında en çok kullanılan bileşikler arasında yine asetazolamid bileşiği vardır.



Şekil 64. Asetazolamid bileşiğinin kimyasal yapısı

Bu çalışmada hCA I ve hCA II izoenzimleri insan eritrositlerinden saflaştırılarak Shogaol'ün bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. İnhibisyon çalışmalarından önce insan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri, Sepharose-4-B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. hCA I izoenzimi % 40,67 verimle 273 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1,367 EÜ/mg olarak bulundu. hCA II izoenzimi % 81,92 verimle 309 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1,546 EÜ/mg olarak bulundu. İnhibisyon çalışmaları sonucunda Shogaol'ün, hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde sırasıyla 75,91 nM ve 47,04 nM IC₅₀ değerleriyle ifade edilen inhibisyon etkisi gösterdiği bulundu.

Tablo 38'de Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin hCA I ve hCA II izoenzimleri için IC₅₀ ve K_i değerleri verildi.

Tablo 38'e bakıldığında Shogaol'ün hCA I izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin karvakrol, olivetol, filoretin, krisin, eugenol türevleri gibi fenolik bileşiklerden daha yüksek, pozitif kontrol asetazolamid ve gingerol, naringin, resveratrol gibi bileşiklerden daha düşük olduğu; hCA II izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin karvakrol, zingerone, krisin, resveratrol, eugenol türevleri gibi fenolik bileşiklerden daha yüksek, pozitif kontrol asetazolamid ve gingerol, naringin gibi bileşiklerden düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 38. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin hCA I ve hCA II İzoenzimleri İçin IC₅₀ ve Ortalama K_i Değerleri

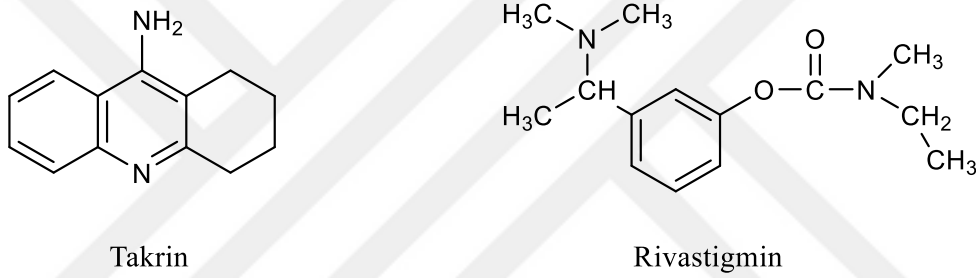
Bileşikler	hCA I		hCA II	
	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)
Shogaol	75,91	42,11	47,04	29,47
Krisin	77,63	58,23	100,96	73,74
Karvakrol	106,21	79,66	135,88	84,88
Zingerone	80,63	72,18	109,15	74,88
Olivetol	90,87	88,05	118,66	178,27
Gingerol	6,79	7,91	6,40	8,75
Naringin	40,64	20,51	40,17	37,50
Resveratrol	57,75	65,88	63,00	101,75
Filoretin	289,00	281,00	308,00	394,00
Eugenol türevi-2	504,73	568,89	505,84	470,84
Eugenol türevi-3	240,45	224,20	225,26	92,35
Eugenol türevi-5	237,33	205,65	228,38	129,28
Eugenol türevi-6	236,20	113,48	195,31	156,43
Asetazolamid*	46,20	35,39	24,75	16,60

*Asetazolamid: Pozitif kontrol (Bingöl 2022)

Asetilkolinesteraz enzimi çok yönlü bir enzimdir. Moleküler yapısı ve kolinerjik sistemde gördüğü önemli işlevlerden dolayı oldukça ilgi görmektedir (Ceylan ve Erdoğan 2017). Nöronlar arasında iletişimi sağlayan (nörotransmitter) asetilkolinlerin iletişimi sağladıktan sonra fazla birikenlerini parçalayan enzimdir (Topal 2014). Eğer asetilkolin gereğinden fazla parçalanırsa beyindeki miktarı azalacağından dolayı sinir iletilerinde azalma olur. Bu durum unutkanlık başta olmak üzere çeşitli biyolojik hasarlara sebep olur. Asetilkolinesteraz enziminin inhibitörleri enzimi inhibe ederek asetilkolin miktarını artırır. Sinir uyarıları iletilir. Bu şekilde Alzheimer hastalığının tedavisi kısmen yapılabilir. Beyindeki sinir uyarılarını ileten asetilkolin gibi bileşiklerin miktarının çeşitli sebeplerle normal düzeyden düşük hale gelmesiyle Alzheimer hastalığı denen hastalık ortaya çıkar. Alzheimer hastalığı, bir demans hastalığı türüdür ve yaşlılarda daha fazla görülür. Önce hafif hafıza kaybı ile ortaya çıkan bu hastalık daha sonraları ciddi bunamaya (Burmaoğlu vd 2019) kadar gidebilir. Demans hastalığı olduğunda algılamada, soyut düşünme ve yargılama kapasitesinde, öğrenme ve problem çözme becerilerinde aksamalar olur. Hafıza

kayıpları, dil sorunları ve psikolojik değişiklikler meydana gelir (Burns and Iliffe 2009; Şahin ve Yazıcı 2007; Burmaoğlu vd 2019).

AChE inhibitörleri, enzimdeki serin rezidüsüne kovalent olarak bağlanarak enzimi inhibe eder ve asetilkolin miktarını artırıcı rol oynar. Asetilkolin artınca sinapslardaki ve nöromuskular boşluklardaki iletiler artar. Sinir uyarıları iletilince Alzheimer hastalarının bilişsel kayıpları azaltılır. Ayrıca Alzheimer hastalığının ilk evresi olan β -amiloid peptid ile amiloid plaque'nin birleşmesine engel olunarak hastalığın tedavisine katkı sağlanır. Alzheimer hastalığının tedavisinde AChE inhibitörü olarak güçlü etki gösteren ve doğal kaynaklardan elde edilen takrin, rivastigmin (Şekil 65) galantamin, huperzin A, donepezil bileşikler ilaç olarak kullanılmaktadır. Fakat doğal olmayan ilaçların yan etki gösterip gastrointestinal ve hepatotoksisite gibi hastalıklara sebep oldukları belirtilmiştir (Akıncıoğlu vd 2013; Taslimi *et al.* 2017; Ma *et al.* 2020).



Şekil 65. İlaç olarak kullanılan asetilkolinesteraz enzimi inhibitörlerinden Takrin ve Rivastigmin'in kimyasal yapıları

Bu çalışmada Shogaol'un asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Shogaol'un, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerinde sırasıyla 37,44 nM ve 24,11 nM IC_{50} değerleriyle ifade edilen inhibisyon etkisi gösterdiği bulundu.

Tablo 39'da Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri için IC_{50} ve K_i değerleri verilmiştir. Tablo 39'a bakıldığında Shogaol'un asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin zingerone, karvakrol, filoretin, kapsaisin bileşiklerinden daha yüksek, pozitif kontrol takrin ve gingerol, olivetol, resveratrol, naringinden düşük; bütirilkolinesteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin karvakrol, zingerone, krisin, resveratrol, naringin bileşiklerinden daha yüksek, pozitif kontrol takrinden ve olivetol, gingerolden düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 39. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimleri İçin IC₅₀ ve Ortalama K_i Değerleri

Bileşikler	Asetilkolinesteraz		Bütirilkolinesteraz	
	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)
Shogaol	37,44	8,95	24,11	7,60
Karvakrol	82,81	22,93	77,38	23,87
Zingerone	94,98	46,80	79,11	24,13
Krisin	31,63	15,45	71,66	32,08
Naringin	29,10	11,67	29,41	15,94
Olivetol	5,13	3,40	6,01	2,73
Gingerol	2,14	0,67	3,38	0,86
Resveratrol	21,65	4,70	77,00	29,67
Filoretin	232,00	182,00	665,00	213,00
Takrin*	15,06	2,58	15,75	7,07

*Takrin: Pozitif kontrol (Bingöl 2022)

α -Glikozidaz enzimleri, nişasta ve glikojen moleküllerini hidroliz ederler. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarla karbohidratlar glukoz ve fruktoz moleküllerine kadar parçalanır. Glukoz ve fruktoz bağırsaktan emilerek kana geçerler. α -Glikozidaz enziminin inhibitörleri, enzimi inhibe ettiklerinde karbohidrat sindirimi süresi uzanır ve glukoz absorpsiyonu düşer. Buna bağlı olarak kan şekeri miktarı azalır. Bu durumdan faydalanılarak şeker hastalığı (diyabet) tedavi edilebilir (Taslimi *et al.* 2017).

Diyabet mellitus, metabolik bozuklukların en yaygın olanlarından. Dünya genelinde milyonlarca insanın yaşamını etkileyen ve metabolizmada değişikliklere sebep olarak göz, böbrek, damar gibi farklı organlarda ciddi zararlara neden olan bir hastalıktır (Ali *et al.* 2006; Taslimi *et al.* 2020). Kronik hiperglisemi ya da kan şekerinin yüksek olması olarak tanımlanan bu hastalıkta, kendine özgü mikro ve makrovasküler bozukluklar ortaya çıkar. İnsanların yaşam tarzlarının değişmesi, fiziksel aktivitelerin azalması, obezitenin artması diyabet hastalığının ana sebeplerindendir (Ertano vd 2022). Kan şekeri yüksekliği kronik olarak devam ettiği takdirde uzun süreli diyabet sonucu yan etkiler meydana gelir. Bu yan etkiler katarakt, nefropati, nöropati, retinopati, kardiyovasküler bozukluk olarak ortaya çıkar. Diyabetin dört türü vardır: Tip 1-diyabet, Tip 2-diyabet, gestasyonel diyabet ve spesifik diyabet (Alim vd 2017; Demir vd 2019). Tip 1-diyabet, bir otoimmün durumdur. Kandaki şeker miktarını tespit edip şekerin fazla olduğu durumlarda

insülin hormonunun salgılanmasını sağlayan pankreatik beta hücrelerinin ölümü sonucunda vücutta insülin üretimi azalır ve sonuçta kan şekeri yükselir. Tip 2-diyabet, insülin direncinin gelişmesi, aşırı glukoz yüklemesine karşı insülinin duyarsız hale gelmesi ve arızalı pankreas beta hücrelerinin etkileşimi ile ortaya çıkan, zayıf glukoz kontrolü ile tetiklenen bir durumdur (Ertano vd 2022). Bu durum kalıcı hiperglisemi olarak ifade edilir (Bursal vd 2019).

Diyabet tedavisi için önerilen yaklaşım yemekten sonra kan şekerinin yükselmesini engellemektir. Bunu yapmak için karbohidratları hidroliz eden α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibe edilmesi mekanizması kullanılır. Enzimlerin inhibisyonu sonucunda karbohidrat sindirim süresi uzanır, glukoz Emilimi gecikir, plazma glukoz artışı engellenir. Bu amaçla α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibitörü olarak akarboz, miglitol ve vogliboz bileşikler kullanılmaktadır (Ali *et al.* 2006).

Akarboz, antidiyabetik özelliği olan bir bileşiktir ve bağırsakta bulunan α -glukozidaz grubu enzimlerin inhibitörüdür (Varan 2015). 1977 yılında bulunan akarbozun molekül formülü $C_{25}H_{43}NO_{18}$ ve molekül ağırlığı 645,61'dir (Hess *et al.* 1986). Maltaz, sukraz, glukoamilaz, α -dekstrinaz enzimlerinin inhibitörüdür. Akarboz bu enzimlere bağlanarak inhibe eder. Bu durumda karbohidratların sindirimi %80 oranında azalır. Bağırsaklardan glukoz Emilimi gecikeceğinden kan şekeri azalır. Bu mekanizma, Tip 2-diyabet hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır (Üstüner 1999). Akarboz 1990 yılından itibaren ticari olarak satılmaya başlanmıştır (Varan 2015). Akarboz ayrıca *in vitro* ortamda α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin inhibisyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Shogaol bileşiğinin α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Shogaol'un, α -glukozidaz ve α -amilaz enzimleri üzerinde sırasıyla 35,72 nM ve 402,90 nM IC_{50} değerleriyle ifade edilen inhibisyon etkisi gösterdiği bulundu. Tablo 40'ta Shogaol ve literatürden alınan bazı bileşiklerin α -glukozidaz enzimi için IC_{50} ve K_i değerleri; α -amilaz enzimi için ise IC_{50} değerleri verilmiştir. Tablo 40'a bakıldığında Shogaol'un α -glukozidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin p-kumarik asit, olivetol, resveratrol, karvakrol, usnik asit, zingerone, krisinden daha yüksek, pozitif kontrol akarbozdan ve gingerol, kurkumin, naringinden düşük; α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin p-kumarik asit, vulpinik asit, prosomik asitten daha yüksek, pozitif kontrol akarbozdan ve olivetol, gingerol, kurkuminden düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 40. Shogaol ve Literatürden Alınan Bazı Bileşiklerin α -Glikozidaz Enzimi İçin IC₅₀ ve Ortalama K_i; α -Amilaz İçin IC₅₀ Değerleri

Bileşikler	α -Glikozidaz		α -Amilaz
	IC ₅₀ (nM)	Ortalama K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)
Shogaol	35,72	16,83	402,90
p-Kumarik asit	157,96	127,48	737,23
Krisin	814,33	593,60	-
Zingerone	653,77	276,67	-
Vulpinik asit	808,63	892,36	626,58
Prosomik asit	443,11	159,52	416,96
Karvakrol	413,78	280,88	-
Usnik asit	577,01	598,65	281,13
Floretin	679,41	708,88	295,27
Tetrakis	64,64	49,30	187,80
Olivetol	45,47	41,85	204,24
Rosmanirik asit	32,53	22,20	137,36
Resveratrol	99,18	126,50	376,22
Naringin	12,64	4,93	-
Gingerol	27,52	14,36	34,31
Kurkumin	29,31	12,60	168,73
İsoliquiritigenin	68,61	80,01	169,52
Akarboz*	22,80	12,60	10,01

*Akarboz: Pozitif kontrol (Gülçin *et al.* 2020)

Kanser hastalığı günümüzde en ölümcül olan hastalıkların başında gelmektedir. Kansere sebep olan etkenler arasında radyasyon, kimyasal maddeler, ROS'leri, UV ışınları, ırk, cinsiyet, yaş, yanlış beslenme, sigara-alkol kullanımı vardır. Kanser hastalığının ortaya çıkmasına reaktif oksijen türleri sebep olabilmektedirler. Normalde canlı hayatı ve özellikle de insan hayatı için çok lüzumlu olan oksijen molekülü, bazı durumlarda eksik indirgenebilmektedir. Bunun sonucunda vücut için oldukça zararlı olan ROS'leri oluşur. Bu ROS'leri içerisinde özellikle hidroksil radikali gibi serbest radikaller, proteinlerin, lipidlerin, nükleik asitlerin, DNA'teki moleküllerin yapılarının bozulmasına, DNA zincirlerinin kırılmasına sebep olmaktadır. Bu durum hücre yapılarının bozulmasına ve kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Moldovan and Moldovan 2004).

Kesin tedavinin hala bulunamamış olması, kanserin insan sağlığını ne kadar tehdit ettiğini ortaya koymaktadır. Bu hastalığın tedavi edilmesi yönünde bilim insanlarının araştırmaları giderek artmaktadır. Bu araştırmaların önemli bir kısmı da fenolik bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması çalışmalarıdır. Çünkü yapılan araştırmalarda fenolik bileşiklerin kanser hücrelerini başlangıç evresinde de olsa ileri evrelerde de olsa inhibe edip sitotoksik etki gösterdikleri ve kanser riskini azalttıkları rapor edilmiştir (Hudson *et al.* 2000; Nguyen *et al.* 2003; Nair *et al.* 2004). Sitotoksik etki; hücrelere toksik olarak etki edip hücreyi öldürme etkisidir. Antiproliferatif etki; hücre çoğalmasını önleme etkisidir. Araştırmalar yapılırken laboratuvar ortamında kanser hücre kültürleri oluşturup bu hücrelere karşı özellikle doğal numunelerin ne kadar sitotoksik/antiproliferatif etki gösterdiğine bakılmaktadır.

Antiproliferatif etki araştırmalarında kullanılan yöntemlerden bazıları XTT yöntemi, MTT yöntemi, TBE yöntemi, WST-1 yöntemi, BrdU dahil etme testi, SRB (Sulforhodamine B) yöntemidir. MTT'nin sistematik adı "3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür"dür. MTT testinde (Mosmann 1983) hücreler, numunenin farklı konsantrasyonları ile genellikle 24, 48 veya 72 saat muamele edilir ve inkübasyondan sonra 570 nm'de hücre canlılığı ölçümü yapılır. Bu yöntemde sarı renkli suda çözünebilen tetrazolyum tuzu, canlı hücreye girince enzimatik reaksiyonlarla mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Bu formazan ürünü hücre zarından geçemez ve hücre içinde birikir (Fotakis and Timbrell 2006). Ortamdaki canlı hücre sayısına göre renk değişimi olur. Kuyucuklara ekilen hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlardaki numuneler eklenip belirli bir süre muamele edilir. Hücreler yeterli oranda kültürlendikten sonra MTT çözeltisi eklenir. Oluşan formazan kristalleri SDS eklenerek çözünür hale getirilir. Canlı kalan hücreler boyayı içine alıp hücre içinde bulunan enzimler sayesinde renkli bileşik oluşumuna sebep olur. Bu renkli bileşik 570 nm'de absorbans verdiği için hücre canlılığı ölçümü yapılır (Riss *et al.* 2015; Banoon and Ghasemian 2022).

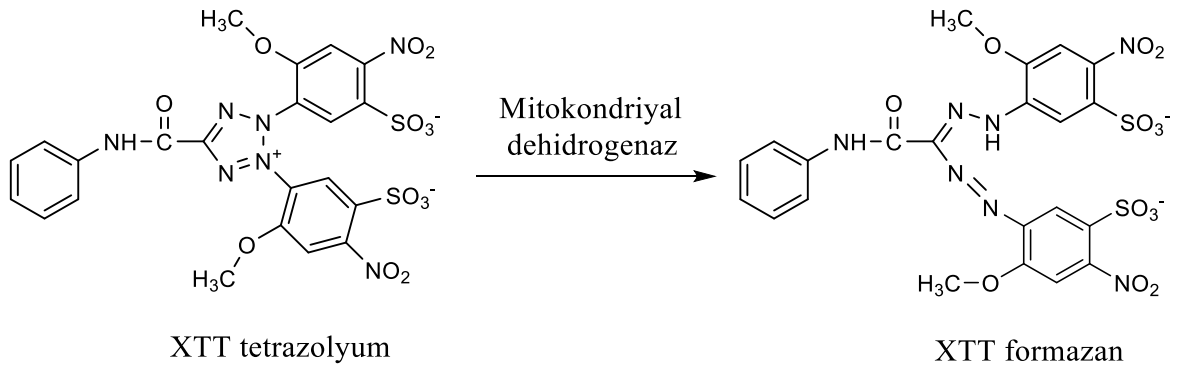
WST-1'in sistematik adı "4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat"tır. WST-1 yöntemi, MTT yöntemine benzer şekildedir. Yalnız WST-1 reaktifi, suda çözünen formazan ürünü oluşturduğu için yeniden bir çözündürme işlemine gerek kalmaz. Ayrıca hücre canlılığı ölçümü 450 nm'de yapılır (Ranke *et al.* 2004; Ngamwongsatit *et al.* 2008).

BrdU'nun sistematik adı 5-bromo-2-deoksiüridin'dir ve bir pirimidin analogudur. BrdU dahil etme yönteminde, çoğalan hücrelerin DNA'sına timidin yerine BrdU dahil edilir. İnkübasyondan sonra DNA denatüre edilir. Ortama anti-BrdU antikoru eklenerek

bunun DNA'ya dahil edilen BrdU'ya bağlanması sağlanır. 370 nm'de absorpsiyon ölçümü yapılır. Absorpsiyon değerleri, DNA sentez miktarıyla ve çoğalan hücre sayısı ile ilişkilidir (Vater *et al.* 2020).

SRB (Sulforhodamine B) yöntemi, Skehan ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, inkübasyon süresinden sonra bir protein boyası olan sulforhodamin B, TCA ile sabitlendirilmiş kültürler (hücrelerde bulunan proteinlerdeki amino asit kalıntılarına) hafif asidik koşullarda belirli bir sürede elektrostatik olarak bağlanır. Bağlanmayan boya %1 asetik asit ile yıkanır. Proteine bağlı boya tris-baz çözeltisi içinde çözülür ve 510 nm'de absorbans alınır (Skehan *et al.* 1990; Voigt 2005; Vichai and Kirtikara 2006).

Bu çalışmada XTT yöntemi (Mosmann 1983) kullanıldı. Hücre sayımı için TBE (Tripan Blue Dışlama) yöntemi kullanıldı. MTT yöntemine oldukça benzeyen XTT yöntemi, heterosiklik bir tetrazolyum tuzu olan XTT'nin 415 nm'de absorbans veren formazan ürününe indirgenmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan suksinat dehidrogenaz enzimleri, XTT tetrazolyum tuzunu portakal renginde olan ve 415 nm'de absorbans veren formazan ürününe indirger (Şekil 66). XTT tuzunun merkezinde bulunan ve dört azot atomu bulunduran halka, indirgenmenin ardından açılır. Sonuçta oluşan turuncu renkli XTT formazan ürünü aktif hücre sayısına bağlı ve doğru orantılı olacak şekilde 415 nm'de absorbans verir (Altay 2015).



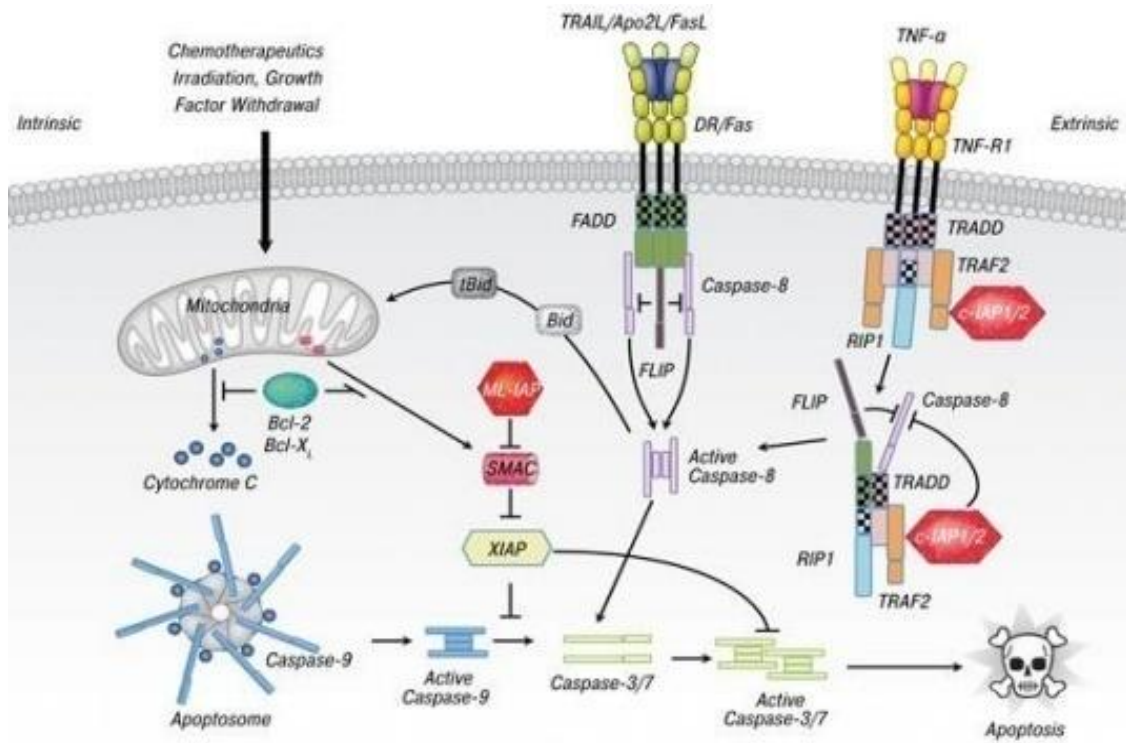
Şekil 66. XTT tetrazolyum tuzunun XTT formazana indirgenmesi

Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan “apoptoz”da temelde üç grup rol oynar (Hetts 1998): 1. Ölüm reseptörleri. 2. Adaptör proteinler. 3. Kaspazlar (proteolitik enzimler). Ölüm reseptörleri, polipeptidlerde ölüm alanı denilen bölümde bulunurlar ve bir dizi aminoasitten oluşurlar. Tumour Necrosis Factor (TNF) reseptör gen ailesindendirler. Görevleri hücreye gelen ölüm sinyallerini adaptör proteinlere bağlanarak hücre içine iletme (Büyükgebiz ve Caferler 2001). Bilinen bazı ölüm reseptörleri TRAIL-R1 (TNF

Related Apoptosis-Inducing Ligand), TRAIL-R2, CD95 (APO-1/Fas), DR3 ve DR6'dır (Eichhorts and Krammer, 2001).

Apoptozda ikinci etkin grup olan adaptör proteinler, ölüm reseptörlerinden aldıkları sinyaller sonrası kaspazlara bağlanırlar ve onları aktif ederler. Catenin, REL proteinleri, Fas, WNT1 adaptör proteinlerdendir. Hücre ölümüne giden yolda bu adaptör proteinlerinin etkisiyle son grup olan kaspazlar aktif hale gelir. Hücre ölümünün son grubu kaspazlar iki kısma ayrılırlar. Birinci grup kaspazlar 2,4,8'den oluşan "başlatıcı"lardır. İkinci grup kaspazlar 3,6,7'den oluşan "uygulayıcı"lardır (Budihardjo and Oliver 1999). Başlatıcılar ölüm sinyalini uygulayıcı kaspazlara verip onları aktif ederek ölüme yönlendirirler. Uygulayıcı kaspazlar sayesinde aktif olan DNaz enzimi ise DNA yıkımına sebep olarak ölümü gerçekleştirir (Büyükgebiz ve Caferler 2001).

Apoptozda mitokondriyal iç ve dış yollar vardır. Dış yol, spesifik ligandın TNF reseptör ailesinden olan hücre yüzeyindeki ölüm reseptörüne bağlanmasıyla aktive edilir. Ardından prokaspaz 8, ölüm sinyali kompleksine bağlanır. İç yol ise hücrelerdeki oksidatif stresin artması ile iyonlaştırıcı kimyasallar ve radyasyon sonucu oluşan ajanlar tarafından aktive edilir. Bunun sonucunda mitokondriyal membran potansiyeli bozulur ve mitokondriden sitokrom c, Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör), endonükleaz G, AIF (apoptoz indükleyici faktör) salgılanır (Şekil 67).



Şekil 67. Apoptozda giden yollar (Altay 2015)

Bu çalışmada Shogaol'ün ve standart kemoterapötik ilaç olarak kullanılan mitoksantron, dosetaksel, karboplatinin A-549 kodu ile ifade edilen akciğer kanseri hücre hattı, HT-29 kodu ile ifade edilen kolon kanseri hücre hattı, MCF-7 ve MDA-MB-453 kodları ile ifade edilen göğüs kanseri hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırıldı. Ayrıca seçicilik endeksi hesabı için Shogaol ve Karboplatin'in 3T3-L1 fare fibroblast normal hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi de araştırıldı. Araştırma sonucunda elde edilen sonuçlarla IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri Tablo 41'de verildi.

Shogaol'ün kanserli hücre hatları üzerinde en yüksek antiproliferatif etkiyi 8,38 µM IC₅₀ değeriyle HT-29 kolon kanseri hücre hattına karşı; en az antiproliferatif etkiyi ise 62,42 µM IC₅₀ değeriyle MDA-MB-453 göğüs kanseri hücre hattına karşı gösterdiği bulundu. Standartlardan mitoksantronun A-549, MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatlarına karşı en yüksek antiproliferatif etki gösterdiği bulundu. Shogaol'ün, A-549 ve HT-29 hücre hatlarında Karboplatin'den; MCF-7 hücre hattında Dosetaksel'den daha etkili aktivite gösterdiği görüldü. Shogaol'ün A-549, HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı bazı standart ilaçlardan daha etkili aktivite göstermesi, antikanser potansiyele sahip olduğunun kanıtı olabilir.

Shogaol'ün normal hücre hattı olan 3T3-L1 fare fibroblast hücrelerine karşı gösterdiği etkinin IC₅₀ değeri 124,35 µM, standart kemoterapötik ilaç Karboplatin'in ise 21,32 µM olduğu bulundu. Shogaol'ün, 3T3-L1 fare fibroblast normal hücrelerine Karboplatin'den çok daha az antiproliferatif etki gösterdiği görüldü. Ortaya çıkan bu sonuçlar ilaçla yapılan kanser tedavileri için oldukça değerlidir. Çünkü kanser hücreleri ilaçla tedavi edilirken ilacın, kanser hücrelerine karşı öldürücü etki göstermesi istenirken sağlıklı normal hücrelere karşı etki göstermemesi istenir. Ta ki normal hücreler işlevlerine devam edebilsin, dokular ve organlar da vücut için gerekli görevlerini yerine getirebilsinler. Bu durum seçicilik endeksi (SI) ile ifade edilir. Seçicilik endeksi; numunenin sağlıklı hücre üzerinde gösterdiği antiproliferatif etki IC₅₀ değerinin, kanserli hücre hattı üzerinde gösterdiği IC₅₀ değerine bölünmesiyle elde edilir ve çıkan sonuç ne kadar yüksek olursa numune o kadar seçici davranmaktadır denilir.

Tablo 42'de bakıldığında HT-29 kolon kanseri hücre hattına karşı Shogaol'ün gösterdiği seçicilik endeksi değeri 14,83; Karboplatin'in ise 0,46 olduğu görülmektedir. Yani Shogaol, Karboplatin'den 32,24 kat daha seçici davranmıştır. Diğer hücre hatlarına karşı da Shogaol'ün, Karboplatin'den daha seçici davrandığı görülmektedir. Bu sonuçlar,

ileri safha çalışmalara ışık tutmakta olup Shogaol'ün farmakoloji açısından etkili bir ajan olabileceği konusunda güçlü veri vermektedir.

Tablo 41. Shogaol Bileşiği ve Farklı Kemoterapötik İlaçların Çeşitli Kansere ve Normal Hücre Hatları Üzerindeki IC₅₀ (μM) Değerleri

Bileşikler	A-549	HT-29	MCF-7	MDA-MB-453	3T3-L1
Shogaol	11,49 ± 0,92	8,38 ± 0,70	51,31 ± 1,44	62,42 ± 1,44	124,35 ± 2,15
Karboplatin	62,93 ± 1,54	46,16 ± 0,80	16,36 ± 0,60	22,63 ± 0,70	21,32 ± 1,06
Dosetaksel	4,35 ± 0,36	-	74,61 ± 1,35	4,58 ± 0,44	-
Mitoksantron	2,74 ± 0,75	-	2,55 ± 0,44	2,17 ± 0,52	-

Tablo 42. Shogaol Bileşiği ve Karboplatin'in Seçicilik Endeks (SI) Değerleri

Hücre hatları	Shogaol	Karboplatin
A-549	10,82	0,33
HT-29	14,83	0,46
MCF-7	2,42	1,30
MDA-MB-453	1,99	0,94

Bai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada oleanolik asidin A-549 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerini 4,71 μM olarak bulmuşlardır (Bai *et al.* 2018). Wang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada klorojenik asidin A-549 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ değerini 150 μM olarak bulmuşlardır (Wang *et al.* 2020). Hung ve arkadaşları 6-Shogaol'ün A-549 hücrelerine karşı otofajik hücre ölümünü indükleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve akciğer kanserine karşı umut verici bir kemopreventif ajan olabileceğini belirtmişlerdir (Hung *et al.* 2009). Yamagata ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada MTT yöntemi ile 24 saat uygulama sonucunda klorojenik asidin A-549 hücre hattı için 50 μM konsantrasyonda hücre proliferasyonunu %39 inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Yamagata *et al.* 2018). Volstatova ve arkadaşları Caco-2/HT29-MTX ortak hücre kültürüne karşı MTT yöntemi uygulayarak IC₅₀ değerlerini klorojenik asit, epikateşin gallat ve kuersetin için sırasıyla 337,4; 204,5 ve 167,7 μM olarak bulmuşlardır (Volstatova *et al.* 2019). Rezaei-Seresht ve arkadaşları MTT yöntemi ile MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat inkübe sonundaki IC₅₀ değerlerini kafeik asit için 170 μg/mL, gallik asit için 18,5 μg/mL, tamoksifen sitrat için 19,4 μg/mL olarak bulmuşlardır (Rezaei-Seresht *et al.* 2019). Kabala-Dzik ve arkadaşları XTT yöntemi ile MCF-7 hücre hattı üzerinde 24 saat inkübe sonundaki IC₅₀ değerlerini kafeik asit için 102,98 μM,

kafeik asit fenil ester için 56,39 μM olarak bulmuşlardır (Kabala-Dzik *et al.* 2018). Chou ve arkadaşları kuersetinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 48 saat inkübe sonundaki IC_{50} değerini 92,4 μM olarak bulmuşlardır (Chou *et al.* 2010). Moghtaderi ve arkadaşları MTT yöntemi ile MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat inkübe sonundaki IC_{50} değerlerini gallik asit için 150 μM , kurkumin için 80 μM olarak bulmuşlardır (Moghtaderi *et al.* 2018). Sales ve arkadaşları MTT yöntemi ile hem MCF-7 hem MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24 saat inkübe sonundaki IC_{50} değerlerini oktil galat için 40 μM , gallik asit için 80 μM olarak bulmuşlardır (Sales *et al.* 2018). Luna-Dulcey ve arkadaşları 6-Gingerol'ün 48 saat inkübe sonundaki IC_{50} değerlerini MCF-7 hücre hattı için 985,8 μM , MCF-10A hücre hattı için 599,4 μM , MDA-MB-231 hücre hattı için 404,5 μM olarak bulmuşlardır (Luna-Dulcey *et al.* 2018).

Yukarıda çeşitli kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkileri verilen bileşiklerle kıyaslandığında Shogaol'ün, çalışılan hücre hatları üzerinde birçok bileşikten daha iyi bir antiproliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Bu da Shogaol'ün oldukça iyi derecede antiproliferatif etki gösteren ajan olduğunu düşündürmektedir. Shogaol'ün kanserli hücre hatlarına karşı gösterdiği çok iyi antiproliferatif etki ve aynı zamanda normal hücrelere karşı seçici davranması oldukça değerli ve dikkat çekicidir. Bu durum Shogaol'ün farmakolojik potansiyelinin olduğunu kanıtı olabilir. Ayrıca seçicilik endeksinin yüksek olması, doğal bileşiklerin yan etkilerinin az olduğu ve tedavilerde kullanılmasının daha uygun olduğu görüşünü desteklemektedir.

Sonuç olarak; canlı organizmalarda çeşitli sebeplerden dolayı ortaya çıkan ve oldukça zararlı olan oksidanlara karşı antioksidan olarak etki ederek oksidanları bertaraf edip hastalıkların oluşumuna veya ilerlemesine engel olabilecek, aynı zamanda da canlı yapısına zarar vermeyecek olan doğal bileşiklerin ya da ekstraktların keşfedilmesi konusu günümüz araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Çünkü gıda ve ilaçlarda kullanılan sentetik antioksidanların zararlı etkilerinin olduğu yapılan araştırmalarda rapor edilmiştir. Bunun sonucunda doğal antioksidanların bulunmasının önemi daha da artmış ve araştırmalar da bu yönde devam etmektedir. Çeşitli bitkilerden farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların ve özellikle de doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin ne kadar olduğu araştırmaları yapılmaktadır. Bu konuda dikkate değer sonuçlar rapor edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız Shogaol bileşiği de zencefilde bulunan doğal fenolik bir bileşiktir. Shogaol, antioksidan metotlardan FRAP metodunda 60 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda standartlardan daha etkili, DPPH $\cdot$ giderme metodunda BHT'den, Fe^{3+} ve Cu^{2+} indirgeme, ABTS $^{++}$ giderme metotlarında Troloks'tan daha etkili antioksidan aktivite gösterdi.

Enzimler, canlılardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran katalizörlerdir. Canlı organizmalarda hiçbir reaksiyon enzimsiz gerçekleşmez. Binlerce reaksiyon enzimler aracılığıyla meydana gelerek ya bir molekül sentezlenir veya parçalanır. Hal böyle olunca canlı için bu kadar önemli olan enzimlerin hastalıkların oluşumu ya da tedavisi noktasında ciddi etkilerinin olması kaçınılmazdır. Örneğin yaşlılar için önemli bir hastalık olan Alzheimer hastalığının tedavisi için asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu mekanizması uygulanmaktadır. Yine önemli bir hastalık olan diyabet için de α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibe edilmesi mekanizması uygulanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan Shogaol bileşiği, hCAI, hCA II, AChE, BChE ve α -glukozidaz enzimlerine karşı sırasıyla 75,91 nM, 47,04 nM, 37,44 nM, 24,11 nM ve 35,72 nM IC₅₀ değerleriyle etkili inhibisyon aktivitesi gösterdi.

Kanser hastalığı günümüz dünyasının önemli bir hastalığı olup 200'den fazla çeşidi vardır. Bu hastalığın tedavisi için kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve cerrahi tedavi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Fakat bu uygulamaların vücuda yan etkileri de olmaktadır. Ayrıca kesin tedavi de sağlanamamaktadır. Bundan dolayı antikanser ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar hızla devam etmektedir. Özellikle doğal ilaçların bulunup uygulamaya alınması yönünde araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan Shogaol'un, A-549 akciğer kanseri ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarında standart kemoterapötik ilaç olarak kullanılan Karboplatin'den; MCF-7 göğüs kanseri hücre hattında standart kemoterapötik ilaç olarak kullanılan Dosetaksel'den daha etkili aktivite gösterdiği görüldü. Ayrıca Shogaol'un, normal hücre hattı olan 3T3-L1 hücre hattına karşı Karboplatin'den çok daha az antiproliferatif etki gösterdiği görüldü. Yani 6-Shogaol, kanserli hücre hattına karşı yüksek derecede antiproliferatif etki gösterirken normal hücre hattına karşı düşük antiproliferatif etki göstermiştir. Shogaol'un bu seçici etkisi oldukça önemlidir. Çünkü ilaçla kanser tedavilerinde ilacın kanser hücrelerini bertaraf ederken normal hücrelere etki göstermemesi istenir. Bu açıdan bakıldığında Shogaol'un halihazırda kemoterapi tedavisinde ilaç olarak kullanılan Karboplatin'den çok daha seçici davranması dikkate değer bir sonuçtur.

Bu sonuçlar neticesinde denilebilir ki 6-Shogaol, yüksek antioksidan kapasiteye sahip bir bileşiktir. Birçok global hastalıkla ilintili bazı metabolik enzimleri inhibe etmede etkili olmuştur. Özellikle selektif davranarak kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek ilaçların geliştirilmesi için *in vivo* yapılacak çalışmalara ışık tutan bir antiproliferatif etkiye sahip olup, gıda ve ilaç endüstrisi için potansiyelli doğal bir ajandır.

KAYNAKLAR

- Abe, C., Miyazawa, T., Miyazawa, T., 2022. Current use of fenton reaction in drugs and food. *Molecules*, 27(17), 5451.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbari, B., Baghaei-Yazdi, N., Bahmaie, M., Mahdavi Abhari, F., 2022. The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *Bio Factors*, 48(3), 611-633.
- Akdulum, B., 2011. *Echinacea padilla*'nın köklerindeki bileşiklerin izolasyonu, yapı tayini ve antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 106-111.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2013. Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(6), 1379-1385.
- Akıncıoğlu, A., Akıncıoğlu, H., Gülçin, İ., Durdağı, S., Supuran, C.T., Göksu, S., 2015. Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoyl carbamates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 3592-3602.
- Al-Abbasi, F.A., Alghamdi, E.A., Baghdadi, M.A., Alamoudi, A.J., El-Halawany, A.M., El-Bassossy, H.M., Al-Abd, A.M., 2016. Gingerol synergizes the cytotoxic effects of doxorubicin against liver cancer cells and protects from its vascular toxicity. *Molecules*, 21(7), 886.
- Alho, H., Leinonen, J., 1999. Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology*, 299, 3-15.
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3), 449-455.
- Alim, Z., Kilinc, N., Sengul, B., Beydemir, S., 2017. Mechanism of capsaicin inhibition of aldose reductase activity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(7), e21898.
- Altay, A., 2015. Antioxidant and cytotoxic properties of salvia fruticosa m. and its effects on gene expressions of some CYP450 and antioxidant enzymes in HT-29 cell line. Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Altay, A., Tohma, H., Durmaz, L., Taslimi, P., Korkmaz, M., Gülçin, I., Köksal, E. 2019. Preliminary phytochemical analysis and evaluation of *in vitro* antioxidant, antiproliferative, antidiabetic, and anticholinergics effects of endemic *Gypsophila taxa* from Turkey. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12908.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., De Simone, G., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chemical Reviews*, 112(8), 4421-4468.
- Anıl, M., 2006. Antioksidan olarak tahıllar. Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi, 7-8 Eylül, Gaziantep.

- Annakkaya, P., 2012. Turna yemişı (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Erçağ, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 292-304.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanism and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027.
- Apak, R., Calokerinos, A., Gorinstein, S., Segundo, M.A., Hibbert, D.B., Gülçin, İ., Arancibia-Avila, P., 2022. Methods to evaluate the scavenging activity of antioxidants toward reactive oxygen and nitrogen species (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 94(1), 87-144.
- Arabacı, B., 2015. Kapsaisin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ile asetilkolin esteraz enzimi üzerine inhibisyon etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arai, H., Kono, N., 2021. α -Tocopherol transfer protein (α -TTP). *Free Radical Biology and Medicine*, 176, 162-175.
- Arosio, B., Gagliano, N., Fusaro, L.M.P., Parmeggiani, L., Tagliabue, J., Galetti, P., Annoni, G., 2000. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology and Toxicology*, 87(5), 229-233.
- Aslan, H.E., Demir, Y., Özasan, M.S., Türkan, F., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2019. The behavior of some chalcones on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase activity. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(6), 634-640.
- Atasever, A., Özdemir, H., Gulcin, İ., Kufrevioglu, O.İ., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136(2), 864-870.
- Azzi, A., 2019. Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology*, 26, 101259.
- Bai, X., Lai, T., Zhou, T., Li, Y., Li, X., Zhang, H., 2018. *In vitro* antioxidant activities of phenols and oleanolic acid from mango peel and their cytotoxic effect on A549 cell line. *Molecules*, 23(6), 1395.
- Banoon, S.R., Ghasemian, A., 2022. The characters of graphene oxide nanoparticles and doxorubicin against HCT-116 colorectal cancer cells *in vitro*. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 53(2), 410-414.
- Bastem, E.S., 2019. Eupatilin, gardenin a, eupatorin flavon türevi bileşiklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bawadood, A.S., Al-Abbasi, F.A., Anwar, F., El-Halawany, A.M., Al-Abd, A.M., 2020. 6-Shogaol suppresses the growth of breast cancer cells by inducing apoptosis and suppressing autophagy via targeting notch signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128, 110302.

- Bhattarai, S., Tran, V.H., Duke, C.C., 2007. Stability of [6]-gingerol and [6]-shogaol in simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(4), 648-653.
- Bensid, A., El Abed, N., Houicher, A., Regenstein, J.M., Özogul, F., 2022. Antioxidant and antimicrobial preservatives: Properties, mechanism of action and applications in food—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2 (11), 2985-3001.
- Benzer, F., Ozan, S.T., 2003. *Fascolia hepatica* ile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksik Düzeyleri. *Turkish Journal o Veterinary and Animal Sciences*, 27, 657-661.
- Bergers, G., Fendt, S.M., 2021. The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 21(3), 162-180.
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193-197.
- Bingöl, Z., 2022. Resveratrol ve türevleri: Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve bazı metabolik enzimler üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- 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, 248-254.
- Bronze, M.R., Figueira, M.E., Mecha, E., 2012. Flavonoids and its contribution to a healthier life. Kazuya Yamane, Yuudai Kato (eds.) *Handbook on Flavonoids: Dietary sources, properties and health benefits*, Nova Publisher.
- Budihardjo, I., Oliver, H.L.M., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 269-290.
- Burmaoglu, S., Yilmaz, A.O., Polat, M.F., Kaya, R., Gulcin, İ., Algul, O., 2019. Synthesis and biological evaluation of novel tris-chalcones as potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -glycosidase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 85, 191-197.
- Burns, A., Iliffe, S., 2009. Alzheimer's disease. *British Medical Journal*, 338, 467-471.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Taslimi, P., Gören, A.C., Gülçin, İ., 2019. Phytochemical content, antioxidant activity, and enzyme inhibition effect of *Salvia eriophora* Boiss. Kotschy against acetylcholinesterase, α -amylase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes. *Journal of Food Biochemistry*, 43(3), e12776.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.
- Büyükgebiz, O., Caferler, J.S., 2001. “Apoptosis”, *Sendrom*, 13(1), 102-107.

- Canoruç, N., Çiçek, R., Atamer, A., Dursun, M., Turgut, C., Güneli, E., Canoruç, F., 2001. Protective effects of vitamin E selenium and allopurinol against stress-induced ulcer formation in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 31(3), 199-203.
- Castaneda-Ovando, A., De Lourdes Pacheco-Hernandez, M.A., Elena Paez-Hernandez, M.A., Rodriguez, J.A., Galan-Vidal, C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Ceylan, H., Erdoğan, O., 2017. Cloning, expression, and characterization of human brain acetylcholinesterase in *Escherichia coli* using a SUMO fusion tag. *Turkish Journal of Biology*, 41(1), 77-87.
- Chan, K.M., Decker, E.A., Feustman, C., 1994. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*, 34(4), 403-426.
- Chen, C.Y., Yang, Y.H., Kuo, S.Y., 2010. Effect of [6]-shogaol on cytosolic Ca^{2+} levels and proliferation in human oral cancer cells (OC2). *Journal of Natural Products*, 73(8), 1370-1374.
- Chen, X., Fu, W., Yang, Z., Yang, Y., Li, Y., Huang, H., Pan, B., 2023. Enhanced H_2O_2 utilization efficiency in fenton-like system for degradation of emerging contaminants: oxygen vacancy-mediated activation of O_2 . *Water Research*, 119562.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, F., Rahmani, M., 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(5), 307-312.
- Choi, E.J., Ahn, W.S., 2008. Kaempferol induced the apoptosis via cell cycle arrest in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Nutrition Research and Practice*, 2(4), 322.
- Chou, C.C., Yang, J.S., Lu, H.F., Ip, S.W., Lo, C., Wu, C.C., Chen, D.R., 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33(8), 1181-1191.
- Clifford, M.N., Scalbert, A., 2000. Ellagitannins, occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of Food Sciences and Agriculture*, 80, 1118-1125.
- Coffey, M.D., Cole, R.A., Colles, S.M., Chisolm, G.M., 1995. *In vitro* cell injury by oxidized low density lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid, and peroxyl radicals. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1866-1873.
- Corn, P.G., El-Deiry, W.S., 2002. Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioassays*, 24(1), 83-90.
- Coşkun, F., 2006. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 27-33.
- Cuppett, S.M.C.F., Schnepf, M., Hall, C., 1997. Natural antioxidants-Are they a reality? *Natural Antioxidant, Chemistry Health Effects and Applications*, 12-24.
- Çağlayan, C., 2013. Oktopamin: Antioksidan kapasitesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çakatay, U., Kayalı, R., 2006. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.

- Çetin Çakmak, K., 2017. Bazı liken metabolitlerin biyolojik aktiviteleri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çetinkaya, S., 2016. İzolikuiritigenin'in, antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II, glutatyon s-transferaz, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: *in vivo* and *in vitro* studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 266-270.
- Da Costa, L.A., Badawi, A., El-Sohemy, A., 2012. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. Annals of Nutrition and Metabolism, 60 (3), 27-36.
- Dave, K.R., Syal, A.R., Katyare, S.S., 2000. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. Journal of Biosciences, 55, 10-108.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases. 15(4), 316-328.
- Demir, H., Turkoglu, V., 2005. Effects of neostigmine methylsulfate on enzyme activity of acetylcholinesterase in rat serum, plasma, muscle and liver *in vivo*. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science, 32(1).
- Demirpolat, E., 2014. Potansiyel mPGES-1 inhibitörlerinin antikanserojen etkilerinin A549 hücrelerinde araştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Kayseri.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Journal Association Physicians India, 52, 794-804.
- Demir, Y., Özaslan, M.S., Duran, H.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Beydemir, Ş., 2019. Inhibition effects of quinones on aldose reductase: antidiabetic properties. Environmental Toxicology and Pharmacology, 70, 103195.
- Dikici, İ., 1999. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Diplock, A., 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, 59.
- Doğru, A., 2020. Bitkilerde aktif oksijen türleri ve oksidatif stres. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 3(2), 205-226.
- Durmaz, L., 2015. Bazı kumarin türevleri: Antioksidan kapasiteleri ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ile asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Draper, H.H., 1990. Nutritional modulation of oxygen radical pathology. Advances in Nutritional Research, 8, 119-145.
- Eichhorst, S.T., Krammer P.H., 2001. Derangement of apoptosis in cancer. The Lancet, 358, 345-346.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7, 88-95.

- Ertano, B.Y., Demir, Y., Nural, Y., Erdoğan, O., 2022. Investigation of the effect of acylthiourea derivatives on diabetes-associated enzymes. *Chemistry Select*, 7(46), e202204149.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., 1990. *Organic chemistry*. Brooks/Cole Publishing Company Pacific Grove, California, 4th ede.
- Frei, B., 2012. *Natural antioxidants in human health and disease*. Academic Press.
- Fırat, S., 1997. Kobaylarda radyasyon oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sisteinin bu sistem üzerindeki etkisi. *Uzmanlık Tezi*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040.
- Forman, H.J., Zhang, H., 2021. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689-709.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R., Stratton, M.R. 2001. Cancer and genomics. *Nature*, 409, 850-852.
- Gezici, S., Koçum, D., 2021. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde nöroprotektif ajan olarak tıbbi bitkiler ve fitokimyasallar. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2), 325-337.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Rahmat, A., 2015. Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* The ilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-10.
- González-Peña, M.A., Ortega-Regules, A.E., Anaya de Parrodi, C., Lozada-Ramírez, J.D., 2023. Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids-a review. *Plants*, 12(2), 313.
- Goodall, G.J., Wickramasinghe, V.O., 2021. RNA in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21(1), 22-36.
- Goulart, M., Batoreu, M.C., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J., 2005. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 20(5), 311-315.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 821-825.
- Göçer, H., Gülçin, İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göçer, H., 2014. Sinefrin ve fenilefrin: antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz enzimi

üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2015a. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoyl carbamates. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 316-320.
- Göğüş, F., Fadıloğlu, S., 2006. Food chemistry. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 319-339.
- Gök, V., Serteser, A., 2003. Doğal antioksidanların biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2-4 Ekim, Ankara.
- Gökpınar, Ş., Göksan, T., 2002. Doğanın süper karotenoidi: astaksantin. *Agro-Endüstri Ar-Ge Proje Pazarı*, 31.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006. Algal Antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23(1), 85-89.
- Gulati, N., Laudet, B., Zohrabian, V.M., Murali, R.A.J., Jhanwar-Uniyal, M.E.E.N.A., 2006. The antiproliferative effect of quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Research*, 26(2A), 1177-1181.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83(3), 371-382.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu M.E., 2004a. *In vitro* antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of *in vitro* antioxidant and anti radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 281-285.
- Gülçin, İ., 2005b. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(7) 491-499.
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, İ.G., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005c. Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus Mas* L.). *Acta Alimentaria*, 34(2), 193-202.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L., 2006a. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology*, 223, 759-767.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, 78, 803-811.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of L-Tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32(3), 431-438.
- Gülçin, İ., 2008. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: An activity-structure insight. *Chemico-Biological Interaction*, 179, 71-80.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., Topal, F., 2009. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stepna rotunda*: cepharantine and

- fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(1), 44-53.
- Gülçin, İ., 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gülçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadeghian, N., Bastem, E., Kufrevioglu, Ö.İ., Şen, F., 2018. Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 741-746.
- Gülçin, İ., Kaya, R., Goren, A.C., Akincioglu, H., Topal, M., Bingol, Z., Alwasel, S., 2019. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1511-1526.
- Gülçin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, H.S., Kılıç, Ö., Bursal, E., 2020. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)- analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441.
- Gülçin, İ., Trofimov, B., Kaya, R., Taslimi, P., Sobenina, L., Schmidt, E., Supuran, C.T., 2020. Synthesis of nitrogen, phosphorus, selenium and sulfur-containing heterocyclic compounds–Determination of their carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -glycosidase inhibition properties. *Bioorganic Chemistry*, 103, 104171.
- Güleç, Ö., Türkeş, C., Arslan, M., Demir, Y., Yeni, Y., Hacımüftüoğlu, A., Beydemir, Ş., 2022. Cytotoxic effect, enzyme inhibition, and in silico studies of some novel N-substituted sulfonyl amides incorporating 1, 3, 4-oxadiazol structural motif. *Molecular Diversity*, 26(5), 2825-2845.
- Güllü, İ.H., Akalın, İ., 2005. Metastaz biyolojisi. *Üroonkoloji Dergisi*, 4, 16-19.
- Habib, F., Shah, W.H., 2004. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. *Food Chemistry*, 85(2), 215-220.
- Halfon, B., 2005. *Natural Products Lecture Notes*. Boğaziçi University Press, İstanbul.
- Halliwell, B., 1984. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, 62, 71-77.
- Halliwell, B., 1989. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurologica Scandinavica*, 80, 23-33.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 14-22.
- Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1-2), 9-19.

- Haniadka, R., Rajeev, A.G., Palatty, P.L., Arora, R., Baliga, M.S. 2012. Zingiber officinale (ginger) as an anti-emetic in cancer chemotherapy: a review. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 18(5), 440-444.
- Henry, Y., Ducrocq, C., Drapier, J.C., Servent, D., Pellat, C., Guissani, A., 1991. Nitric oxide, a biological effector. *European Biophysics Journal*, 20(1), 1-15.
- Hess, M.E., Haugaard, N., Min, W., Torbati, A., 1986. Metabolic effects of acarbose in normal and diabetic rats: long-and short-term administration. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, 283(1), 163-176.
- Hetts, S.W., 1998. "To die or not to die". *The Journal of The American Medical Association*, 279, 300-307.
- Higgins, M.R., Izadi, A., Kaviani, M., 2020. Antioxidants and exercise performance: with a focus on vitamin E and C supplementation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 8452.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hung, J.Y., Hsu, Y.L., Li, C.T., Ko, Y.C., Ni, W.C., Huang, M.S., Kuo, P.L., 2009. 6-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9809-9816.
- Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T., 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*, 9, 1163-1170.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E., Mandal, M., 2013. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(43), 7726.
- Jeong, C.H., Bode, A.M., Pugliese, A., Cho, Y.Y., Kim, H.G., Shim, J.H., Dong, Z., 2009. [6]-Gingerol suppresses colon cancer growth by targeting leukotriene A4 hydrolase. *Cancer Research*, 69(13), 5584-5591.
- Jittrepotch, N., Ushio, H., Ohshima, T., 2006. Effects of EDTA and a combined use of nitrite and ascorbate on lipid oxidation in cooked Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 99(1), 70-82.
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Wojtyczka, R.D., Buszman, E., Stojko, J., 2018. Caffeic acid versus caffeic acid phenethyl ester in the treatment of breast cancer MCF-7 cells: migration rate inhibition. *Integrative cancer therapies*, 17(4), 1247-1259.
- Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M., 2007. Endüstriyel atık maddelerden mikrobiyal yolla beta karoten üretimi. *Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 17(2), 61-66.
- Kalın, P., 2017. Bazı flavonların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri ile asetilkolinesteraz, bütirilkinesteraz ve laktoperoksidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kalkan, İ., 2007. Çeşitli pişirme yöntemlerinin sebzelerin fenolik bileşik antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Kandemir, F.M., Kucukler, S., Eldutar, E., Caglayan, C., Gülçin, İ., 2017. Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: a multi-biomarker approach. *Scientia Pharmaceutica*, 85(1), 4.
- Karabulut, H., Günay, M.Ş., 2016. Serbest radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.
- Karakuş, F., 2015. Asetazolamid'in kolorektal kanser hücreleri üzerine etkisi (*in vitro*). Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Kaviarasan, S., Naik, G.H., Gangabthagirathi, R., Anuradha, C.V., Priyadarsini, K.I., 2007. *In vitro* studies on antiradical and antioxidant activities of fenudreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103(1), 31-37.
- Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszevska, K., Adamus-Grabicka, A., Karwowski, B.T., 2020. Two faces of vitamin C—antioxidative and pro-oxidative agent. *Nutrients*, 12(5), 1501.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2014. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 643s, Erzurum.
- Kilic, D., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2017. Effect of mutation in active site residue Trp209 to Val, Leu, Ile and Pro on the catalytic activity and affinity for some benzenesulfonamides of human carbonic anhydrase II. *Turkish Journal of Biology*, 41(5), 935-942.
- Kim, J.M., Choi, S.H., Shin, G.H., Lee, J.H., Kang, S.R., Lee, K.Y., Lee, O.H., 2016. Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils commonly consumed in Korea. *Food Chemistry*, 213, 19-25.
- Kiokias, S., Proestos, C., Oreopoulou, V., 2020. Phenolic acids of plant origin—A review on their antioxidant activity *in vitro* (o/w emulsion systems) along with their *in vivo* health biochemical properties. *Foods*, 9(4), 534.
- Kocpinar, E.F., Gonul Baltaci, N., Ceylan, H., Kalin, S.N., Erdogan, O., Budak, H., 2020. Effect of a prolonged dietary iron intake on the gene expression and activity of the testicular antioxidant defense system in rats. *Biological Trace Element Research*, 195(1), 135-141.
- Koç, F., 2019. Rutinhidrat'ın antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz enzimleri üzerine etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Koçancı, F.G., Aslım, B., 2016. Structure and functions of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase inhibitory activity of plants. *Manas Journal of Agriculture and Life Science*, 6 (1), 19-35.
- Konovalov, D.A., Cáceres, E.A., Shcherbakova, E.A., Herrera-Bravo, J., Chandran, D., Martorell, M., Calina, D., 2022. *Eryngium caeruleum*: an update on ethnobotany, phytochemistry and biomedical applications. *Chinese Medicine*, 17(1), 1-17.
- Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk Sarıkaya, S.B., Bursal, E., 2009. *In vitro* antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 395-405.
- Köse, L.P., 2016. Bazı doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi, AChE ve BChE ile hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Krinsky, N.I., Deneke, S.M., 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *Journal of The National Cancer Institute*, 69(1), 205-210.
- Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C., Mancini, R.A., 2005. The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in n-3 oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70(4), 683-689.
- Lee, H.S., Seo, E.Y., Kang, N.E., Kim, W.K., 2008. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(5), 313-319.
- Li, F., Nitteranon, V., Tang, X., Liang, J., Zhang, G., Parkin, K.L., Hu, Q., 2012. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of 1-dehydro-[6]-gingerdione, 6-shogaol, 6-dehydroshogaol and hexahydrocurcumin. *Food Chemistry*, 135(2), 332-337.
- Li, Y., Hong, Y., Han, Y., Wang, Y., Xia, L., 2016. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger. *Journal of Chromatography B*, 1011, 223-232.
- Ling, H., Yang, H., Tan, S.H., Chui, W.K., Chew, E.H., 2010. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor- κ B activation. *British Journal of Pharmacology*, 161(8), 1763-1777.
- Liu, Q., Peng, Y.B., Qi, L.W., Cheng, X.L., Xu, X.J., Liu, L.L., Li, P., 2012. The cytotoxicity mechanism of 6-shogaol-treated HeLa human cervical cancer cells revealed by label-free shotgun proteomics and bioinformatics analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Liu, R., Mabury, S.A., 2020. Synthetic phenolic antioxidants: A review of environmental occurrence, fate, human exposure, and toxicity. *Environmental Science Technology*, 54(19), 11706-11719.
- Liu, R., Xu, Y., Chang, M., Tang, L., Lu, M., Liu, R., Wang, X., 2021. Antioxidant interaction of α -tocopherol, γ -oryzanol and phytosterol in rice bran oil. *Food Chemistry*, 343, 128431.
- Lolak, N., Akocak, S., Türkeş, C., Taslimi, P., Işık, M., Beydemir, Ş., Durgun, M., 2020. Synthesis, characterization, inhibition effects, and molecular docking studies as acetylcholinesterase, α -glycosidase, and carbonic anhydrase inhibitors of novel benzenesulfonamides incorporating 1, 3, 5-triazine structural motifs. *Bioorganic Chemistry*, 100, 103897.
- Lu, W., Shi, Y., Wang, R., Su, D., Tang, M., Liu, Y., Li, Z., 2021. Antioxidant activity and healthy benefits of natural pigments in fruits: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4945.
- Luna-Dulcey, L., Tomasin, R., Naves, M.A., da Silva, J.A., Cominetti, M.R., 2018. Autophagy-dependent apoptosis is triggered by a semi-synthetic [6]-gingerol analogue in triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 9(56), 30787.
- Luo, H., Rankin, G.O., Li, Z., DePriest, L., Chen, Y.C., 2011. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chemistry*, 128(2), 513-519.
- Ma, W., Bi, J., Zhao, C., Gao, Y., Zhang, G., 2020. Design, synthesis and biological evaluation of acridone glycosides as selective BChE inhibitors. *Carbohydrate Research*, 491, 107977.

- Majidpoor, J., Mortezaee, K., 2021. Steps in metastasis: an updated review. *Medical Oncology*, 38, 1-17.
- Manessis, G., Kalogianni, A.I., Lazou, T., Moschovas, M., Bossis, I., Gelasakis, A.I., 2020. Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. *Antioxidants*, 9(12), 1215.
- Maoka, T., 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1-16.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Valette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiol*, 41(1), 31-91.
- Mattiuzzi, C., Lippi, G., 2019. Current cancer epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217.
- Meitha, K., Pramesti, Y., Suhandono, S., 2020. Reactive oxygen species and antioxidants in postharvest vegetables and fruits. *International Journal of Food Science*, 2020.
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (4).
- Moghtaderi, H., Sepehri, H., Delphi, L., Attari, F., 2018. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. *BioImpacts: BI*, 8(3), 185.
- Moldovan, L., Moldovan, N.I., 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 395-412.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W., 1996. Fizyolojik öneme sahip lipidler. N. Dikmen, T. Özgünen. *Harper'in Biyokimyası*, 24. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, 2(1), 1-10.
- Nair, H.K., Rao, K.V., Aalinkeel, R., 2004. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 11, 63-69.
- Nar, M., 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I VE hCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ngamwongsatit, P., Banada, P.P., Panbangred, W., Bhunia, A.K., 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, 73(3), 211-215.
- Nguyen, T.T., Tran, E., Ong, C.K., 2003. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *Journal of Cellular Physiology*, 197, 110-121.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J., Robin, G.C., 1999. Carboxyl /cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays*, 21(12), 1031-1042.

- Opara, E., 2002. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *The Journal of The Royal Society for The Promotion of Health*, 122(1), 28-34.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztürk Sarıkaya, S.B., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chemical Biology Drug Design*, 75(5), 515-520.
- Packer, L., 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(4), 1050-1055.
- Pan, M.H., Hsieh, M.C., Kuo, J.M., Lai, C.S., Wu, H., Sang, S., Ho, C.T., 2008. 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression. *Molecular Nutrition Food Research*, 52(5), 527-537.
- Panglossi, H.V., 2006. Antioxidants: New research. Nova Science Publishers, 9-13p, New York, USA.
- Park, Y.J., Wen, J., Bang, S., Park, S.W., Song, S.Y., 2006. [6]-Gingerol induces cell cycle arrest and cell death of mutant p53-expressing pancreatic cancer cells. *Yonsei Medical Journal*, 47(5), 688.
- Peng, W., Wu, J.G., Jiang, Y.B., Liu, Y.J., Sun, T., Wu, N., Wu, C.J., 2015. Antitumor activity of 4-O-(2 "-O-acetyl-6 "-Op-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 233, 8-13.
- Phillips, D.C., 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215(5), 78-93.
- Pirouzman, M., Nikzad Kojanag, B., Hosseini-Yazdi, S.A., Aghabeigy, N., 2022. Green synthesis of cobalt and iron incorporated citric acid/ β -cyclodextrin composites: Efficient H₂O₂ scavengers. *Applied Organometallic Chemistry*, 36(2), e6505.
- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 433-446.
- Prior, R.L., Cao, G., 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *HortScience*, 35(4), 588-592.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Qi, L.W., Zhang, Z., Zhang, C.F., Anderson, S., Liu, Q., Yuan, C.S., Wang, C.Z., 2015. Anti-colon cancer effects of 6-shogaol through G2/M cell cycle arrest by p53/p21-

- cdc2/cdc25A crosstalk. The American journal of Chinese medicine, 43(04), 743-756.
- Radhakrishnan, E.K., Bava, S.V., Narayanan, S.S., Nath, L.R., Thulasidasan, A.K.T., Soniya, E.V., Anto, R.J., 2014. [6]-Gingerol induces caspase-dependent apoptosis and prevents PMA-induced proliferation in colon cancer cells by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. PloS One, 9(8), e104401.
- Rahaman, M.M., Hossain, R., Herrera-Bravo, J., Islam, M.T., Atolani, O., Adeyemi, O.S., Sharifi-Rad, J., 2023. Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. Food Science Nutrition.
- Rahman, M.M., Byanju, B., Grewell, D., Lamsal, B.P., 2020. High-power sonication of soy proteins: Hydroxyl radicals and their effects on protein structure. Ultrasonics Sonochemistry, 64, 105019.
- Rahmani, A.H., 2014. Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, 6 (2), 125.
- Raina, P., Santaguida, P., Ismaila, A., Patterson, C., Cowan, D., Levine, M., Booker, L., Oremus, M., 2008. Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: Evidence review for a clinical practice guideline. Annals of Internal Medicine, 148(5), 379-397.
- Ramsarma, T., Devasagayam, T.P.A., Bloor, K.K., 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). Indian Journal Biochem Biophys, 40, 300-308.
- Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczbott, J., Hoffmann, J., Jastorff, B., 2004. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. Ecotoxicology and Environmental Safety, 58(3), 396-404.
- Rashmi, H.B., Negi, P.S., 2020. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. Food Research International, 136, 109298.
- Rastogi, N., Duggal, S., Singh, S.K., Porwal, K., Srivastava, V.K., Maurya, R., Mishra, D. P., 2015. Proteasome inhibition mediates p53 reactivation and anti-cancer activity of 6-gingerol in cervical cancer cells. Oncotarget, 6(41), 43310.
- Ray, A., Vasudevan, S., Sengupta, S., 2015. 6-Shogaol inhibits breast cancer cells and stem cell-like spheroids by modulation of Notch signaling pathway and induction of autophagic cell death. PloS One, 10(9), e0137614.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9-10), 1231-1237.
- Reddi, A.R., Jensen, L.T., Naranuntarat, A., Rosenfeld, L., Leung, E., Shah, R., Culotta, V.C., 2009. The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. Free Radical Biology Medicine, 46(2), 154.
- Rezaei-Seresht, H., Cheshomi, H., Falanji, F., Movahedi-Motlagh, F., Hashemian, M., Mireskandari, E., 2019. Cytotoxic activity of caffeic acid and gallic acid against MCF-7 human breast cancer cells: An *in silico* and *in vitro* study. Avicenna Journal of Phytomedicine, 9(6), 574.

- Riss, D., Burian, M., Wolf, A., Kranebitter, V., Kaider, A., Arnoldner, C., 2015. Intranasal submucosal bevacizumab for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Head Neck*, 37(6), 783-787.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Rocchetti, G., Gregorio, R.P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Oliveira, P.G., Prieto, M.A., Lucini, L., 2022. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 811-842.
- Rowles, J.L., Erdman Jr, J.W., 2020. Carotenoids and their role in cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(11), 158613.
- Sağıroğlu, A., Özcan, H.M., 2007. Bitki ekstraktlarındaki flavonoid aglikonlarının tayini. 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Saldamlı, İ., Sağlam, F., 1998. Vitaminler ve mineraller. *Gıda Kimyası*, Ed: Saldamlı, İ., Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 337-398.
- Sales, M.S., Roy, A., Antony, L., Banu, S.K., Jeyaraman, S., Manikkam, R., 2018. Octyl gallate and gallic acid isolated from *Terminalia bellarica* regulates normal cell cycle in human breast cancer cell lines. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 103, 1577-1584.
- Sarma, A.D., Mallick, A.R., Ghosh, A.K., 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 185-192.
- Shafabakhsh, R., Asemi, Z., 2019. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 1-9.
- Sen, S., Chakraborty, R., 2011. The role of antioxidants in human health. in oxidative stress: diagnostics, prevention and therapy. *American Chemical Society*, 1-37.
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995. *Food Phenolics*. Technomic Publishing Company Book, Lancaster, USA, 1999-225.
- Sharp, E.N., Rupper, P., Miller, T.A., 2008. The structure and spectra of organic peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(27), 3955-3981.
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B., 2022. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 132531.
- Shih, H.C., Chern, C.Y., Kuo, P.C., Wu, Y.C., Chan, Y.Y., Liao, Y.R., Wu, T.S., 2014. Synthesis of analogues of gingerol and shogaol, the active pungent principles from the rhizomes of *Zingiber officinale* and evaluation of their anti-platelet aggregation effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 3926-3951.
- Shim, S., Kim, S., Choi, D.S., Kwon, Y.B., Kwon, J., 2011. Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2734-2740.
- Shivakumar, A., Kumar, M.S.Y., 2018. Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(3), 214-236.

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Boyd, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 82(13), 1107-1112.
- Stahl, W., Sies, H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species. Research Monographs, 7, 1-2.
- Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine, 24, 345-351.
- Stevenson, D.E., Hurst, R.D., 2007. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? Cellular and Molecular Life Sciences, 64(22), 2900-2916.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine Metabolic Agents, 1(1), 61-97.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şahin, H., Yazıcı, T., 2007. Alzheimer hastalığı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Samsun. Klinik Gelişim Dergisi, 48-52.
- Şehitoğlu, M.H., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I VE hCA-II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Çiftci, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 31(11), 2036-2039.
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., Wang, Y., 2013. Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. Biomedical Chromatography, 27(2), 148-155.
- Taslimi, P., 2017. Olivetol'un antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve bazı metabolik enzimler üzerinde inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taslimi, P., Gülçin, İ., 2017. Antidiabetic potential: *In vitro* inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 31(10), e21956.
- Taslimi, P., Caglayan, C., Gulcin, İ., 2017. The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 31(12), e21995.
- Taslimi, P., Sujayev, A., Mamedova, S., Kalın, P., Gulçin, İ., Sadeghian, N., Mamedov, S., 2017a. Synthesis and bioactivity of several new hetaryl sulfonamides. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 137-145.
- Taslimi, P., Köksal, E., Gören, A.C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Gülçin, İ., 2020. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. Arabian Journal of Chemistry, 13(3), 4528-4537.

- Teke, D., 2016. Filoretin: Biyolojik aktivitesi ve yapı-aktivite ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tohma, H., Altay, A., Köksal, E., Gören, A.C., Gülçin, İ., 2019. Measurement of anticancer, antidiabetic and anticholinergic properties of sumac (*Rhus coriaria*): analysis of its phenolic compounds by LC–MS/MS. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1607-1619.
- Topal, F., 2014. Bazı eugenol türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Torun, M., Yardım, S., 1993. Serbest radikallerin kalp-damar hastalıkları ile ilişkisi ve savunma mekanizmaları. *FABAD Journal Pharmacy Science*, 18, 173-184.
- Uçak, S., Kızıltan, G., 2021. Akdeniz diyeti ve kanser. *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi-BÜSBİD*, 6(2).
- Üç, E.M., 2022. Koniferil'in antioksidan kapasitesi ve bazı metabolik enzimler üzerindeki etkisi: Alkol ve aldehit gruplarının karşılaştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Üner, M.H., Yılmaz, İ., 2021. Oksidatif stres ve antioksidanların iş sağlığına etkileri. *Karaelmas İş Sağlığı ve Güvenliği Dergisi*, 5(1), 79-87.
- Üstüner, M.V., 1999. Tip II diyabetli deney hayvanlarına akarboz ve rumex patientia L. (labada)'nın etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Vafadar, A., Shabaninejad, Z., Movahedpour, A., Fallahi, F., Taghavipour, M., Ghasemi, Y., Mirzaei, H., 2020. Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Bioscience*, 10(1), 1-17.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Van Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., Faulkner, J.A., 1997. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *Journal Applied Physiology*, 83(3), 817-823.
- Varan, G., 2015. Yeni tanı almış prediyabetik ve diyabetik hastalarda akarboz kullanımının metabolik parametreler üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Hatay.
- Vater, C., Hlawaty, V., Werdenits, P., Cichoń, M.A., Klang, V., Elbe-Bürger, A., Valenta, C., 2020. Effects of lecithin-based nanoemulsions on skin: Short-time cytotoxicity MTT and BrdU studies, skin penetration of surfactants and additives and the delivery of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 580, 119209.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 147-154.
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.
- Voigt, W., 2005. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In *Chemosensitivity* (pp. 39-48). Humana Press.
- Volstatova, T., Marchica, A., Hroncova, Z., Bernardi, R., Doskocil, I., Havlik, J., 2019. Effects of chlorogenic acid, epicatechin gallate, and quercetin on mucin expression

- and secretion in the Caco-2/HT29-MTX cell model. *Food Science Nutrition*, 7(2), 492-498.
- Wang, L., Lee, I.M., Zhang, S.M., Blumberg, J.B., Buring, J.E., Sesso, H.D., 2009. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *The American journal of clinical nutrition*, 89(3), 905-912.
- Wang, L., Du, H., Chen, P., 2020. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 131, 110673.
- Wang, L., Zhang, N., Li, Y., Kong, W., Gou, J., Zhang, Y., Qu, L., 2021. Mechanism of nitrogen-doped Ti3C2 quantum dots for free-radical scavenging and the ultrasensitive H2O2 detection performance. *ACS Applied Materials Interfaces*, 13(36), 42442-42450.
- Wang, W., Huang, D., Wang, D., Tan, M., Geng, M., Zhu, C., Zhou, D., 2022. Extensive production of hydroxyl radicals during oxygenation of anoxic paddy soils: Implications to imidacloprid degradation. *Chemosphere*, 286, 131565.
- Wei, Y.H., Pang, C.Y., 2005. The role of mitochondria in human aging process. *Biotech International*, 17, 8-13.
- Weng, C.J., Chou, C.P., Ho, C.T., Yen, G.C., 2012. Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. *Molecular Nutrition Food Research*, 56(8), 1304-1314.
- Wu, C.H., Hong, B.H., Ho, C.T., Yen, G.C., 2015. Targeting cancer stem cells in breast cancer: potential anticancer properties of 6-shogaol and pterostilbene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(9), 2432-2441.
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol research health*, 27(4), 277.
- Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A., 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351, 146-148.
- Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.R., Wang, X., Martínez, M.A., 2021. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food chemistry*, 353, 129488.
- Yamagata, K., Izawa, Y., Onodera, D., Tagami, M., 2018. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1), 9-19.
- Yan, Z., Zhong, Y., Duan, Y., Chen, Q., Li, F., 2020. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition*, 6(2), 115-123.
- Yapıcı, İ., Altay, A., Öztürk Sarıkaya, B., Korkmaz, M., Atila, A., Gülçin, İ., Köksal, E., 2021. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activities of extracts of endemic *Tanacetum erzincanense* together with phenolic content by LC-ESI-QTOF-MS. *Chemistry and Biodiversity*, 18(3), e2000812.
- Yokus, B., Cakir, D.U., Akdag, M.Z., Sert, C., Mete, N., 2005. Oxidative DNA damage in rats exposed to extremely low frequency electro magnetic fields. *Free Radical Research*, 39(3), 317-323.
- Yokuş, B., Çakır, D.Ü., 2002. *In vivo* oksidatif DNA hasarı biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Klinik Journal Medicine Science*, 22, 535-543.

- Yokus, B., Akdag, M.Z., Dasdag, S., Cakir, D.L.U., Kızıl, M., 2008. Extremely low frequency magnetic fields cause oxidative DNA damage in rats. *International Journal of Radiation Biology*, 84(10), 789-795.
- Yokuş, B., Çakır, D.Ü., 2012. Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.
- Yoshida, T., Konishi, M., Horinaka, M., Yasuda, T., Goda, A.E., Taniguchi, H., Sakai, T., 2008. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(1), 129-133.
- Zhang, L., Liu, Z., Sun, Y., Wang, X., Li, L., 2020. Effect of α -tocopherol antioxidant on rheological and physicochemical properties of chitosan/zein edible films. *Lwt*, 118, 108799.
- Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R.K., Chen, J., Zhang, F., 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 100, 30-47.
- Zhang, S., Chen, X., Sen, B., Bai, M., He, Y., Wang, G., 2021. Exogenous antioxidants improve the accumulation of saturated and polyunsaturated fatty acids in *Schizochytrium sp.* PKU Mn4. *Marine Drugs*, 19(10), 559.
- Zhang, T., Wen, Y., Pan, Z., Kuwahara, Y., Mori, K., Yamashita, H., Qian, X., 2022. Overcoming acidic H₂O₂/Fe (II/III) redox-induced low H₂O₂ utilization efficiency by carbon quantum dots Fenton-like catalysis. *Environmental Science and Technology*, 56(4), 2617-2625.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	İsmail YAPICI
Eğitim	
Lise:	Artvin Yusufeli İmam Hatip Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya
Yüksek lisans:	Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (2018)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Yayınlar	