



**GLİKOZİT BİRİMİNİN ANTIOKSİDAN
MOLEKÜLLERDE AKTİVİTE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ –
LUTEOLİN VE LUTEOLİN GLİKOZİTLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA**

Adem ERTÜRK

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Doktora Tezi

Kimya Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**GLİKOZİT BİRİMİNİN ANTİOKSİDAN MOLEKÜLLERDE AKTİVİTE
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ – LUTEOLİN VE LUTEOLİN GLİKOZİTLERİNİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA**
(The Effect of the Glycoside Unit on Antioxidant Molecules' Activity – a Comparative Study
on the Biological Activities of Luteolin and Luteolin Glycosides)

DOKTORA TEZİ

Adem ERTÜRK

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Erzurum
Şubat 2023

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

“GLİKOZİT BİRİMİNİN ANTIOKSİDAN MOLEKÜLLERDE AKTİVİTE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ – LUTEOLİN VE LUTEOLİN GLİKOZİTLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Adem ERTÜRK 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.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Ercan BURSAL <i>Muş Alparslan Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

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

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

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Lisansüstü Tez Projeleri (LÜTP) kapsamında desteklenmiştir. (Proje No: FDK-2021-8871)

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında sunulan “**Glikozit Biriminin Antioksidan Moleküllerde Aktivite Üzerindeki Etkisi – Luteolin Ve Luteolin Glikozitlerinin Biyolojik Aktiviteleri Üzerine Karşılaştırmalı Bir Çalışma**” 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	21	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Metot	24	35
Bulgular	7	20
Tartışma	5	20
Tezin Geneli	16	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.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Adem ERTÜRK	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
2.2.2022	2.2.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

- Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.
- Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

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

Öncelikle çalışmalarında her türlü desteği sağlayan, danışmanlığımı üstlenen, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım, her alanda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Türkiye Bilimler Akademisi Asli Üyesi ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı çok kıymetli, saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

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

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT'a,

Doktora öğrenimim boyunca her türlü yardımlarını gördüğüm öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Gökhan AĞGÜL'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Leyla GÜVEN'e ve doktora arkadaşım Sayın Dr. Zeynebe BİNGÖL başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Ayrıca her alanda desteklerini esirgemeyen, her zaman ve her koşulda yanımda olan anneme, babama, kardeşlerime, tez çalışmalarım boyunca gösterdiği sabır ve anlayışları için sevgili eşim Hacer, çocuklarım Beyza, Yusuf ve Ömer Selim'e teşekkür ediyorum.

Adem ERTÜRK

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GLİKOZİT BİRİMİNİN ANTIOKSİDAN MOLEKÜLLERDE AKTİVİTE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ – LUTEOLİN VE LUTEOLİN GLİKOZİTLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA

Adem ERTÜRK

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Amaç: Bu doktora tez çalışmasında biyolojik açıdan etkili birer flavonoit olan Luteolin ve türevi glikozitlerin (Sinarozit, Orientin, İzoorientin) birçok global hastalıkla ilintili olan ve insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ile asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE) ve α -Glikozidaz gibi metabolik enzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin deneysel ve teorik (moleküler doking) olarak araştırılması ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Yöntem: Luteolin ve türevi glikozitlerin antioksidan kapasiteleri indirgeme yöntemleri, radikal giderme aktiviteleri ile belirlendi. Sonuçları değerlendirmek için standart antioksidanlar olan BHA, BHT, α -Tokoferol, Troloks ve askorbik asit kullanıldı. Ayrıca insan eritrositlerinden afinite kolon kromatografisi tekniği ile saflaştırılan hCA I, hCA II izoenzimleri ile ticari olarak temin edilen AChE, BChE ve α -glikozidaz enzimleri üzerine luteolin ve türevi glikozitlerin inhibisyon etkileri deneysel ve teorik (moleküler doking) olarak araştırıldı.

Bulgular: Luteolin ve türevlerinin antioksidan kapasiteleri farklı yöntemler kullanılarak standart antioksidanlar ile karşılaştırmalı olarak çalışıldı. Elde edilen sonuçlara göre sentetik antioksidan aktivitelerine yakın ya da daha iyi aktivite gösterdikleri belirlendi. Luteolin ve türevi glikozitlerin hCA I, hCA II izoenzimleri, AChE, BChE ve α -Glikozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemek için yapılan deneysel çalışma sonuçlarının, çalışılan moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları ile de örtüştüğü gözlemlendi. Deneysel olarak bulunan IC₅₀ değerlerine göre en iyi inhibitörlerin hCA I izoenzimi için Orientin (IC₅₀: 27,729), hCA II izoenzimi için Sinarozit (IC₅₀: 18,24) \approx Orientin (IC₅₀: 23,90), AChE enzimi için İzoorientin (IC₅₀: 1,93), BChE enzimi için Sinarozit (IC₅₀: 6,41) \approx Luteolin (IC₅₀: 7,45), α -Glikozidaz enzimi için Sinarozit (IC₅₀: 7,15) olduğu tespit edildi. Teorik olarak gerçekleştirilen moleküler docking çalışma sonuçlarına göre ise en iyi inhibitörlerin hCA I izoenzimi için Orientin (-9.90), hCA II izoenzimi için Orientin(-8.87) \approx Sinarozit(-8.78), AChE enzimi için Orientin (-14.35) \approx İzoorientin (-13.95), BChE enzimi için Orientin (-13.42), α -Glikozidaz enzimi için Sinarozit (-12.81) olduğu tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre Luteolin ve türevi glikozit bileşiklerinin yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu belirlendi. Ayrıca yapıların çalışılan enzimler üzerinde de oldukça etkili bir inhibisyona sahip oldukları hem deneysel hem de teorik olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Luteolin, Luteolin glikozitleri, antioksidan aktivite, karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, α -Glikozidaz.

Şubat 2023, 120 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

THE EFFECT OF GLYCOSIDE UNIT ON ANTIOXIDANT MOLECULES' ACTIVITY – A COMPARATIVE STUDY ON THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LUTEOLIN AND LUTEOLIN GLYCOSIDES

Adem ERTÜRK

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Purpose: In this doctoral thesis study, luteolin and its derivative glycosides (Cynaroside, Orientin, Isoorientin), which are biologically effective flavonoids, aimed to investigate the inhibition effects on metabolic enzymes such as carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and II) purified from human blood and associated with many global diseases and acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and α -Glucosidase,

Method: Antioxidant capacities of luteolin and its derivative glycosides were determined by reduction methods and radical scavenging activities. Standard antioxidants BHA, BHT, α -Tocopherol, Trolox and ascorbic acid were used to evaluate the results. In addition, the inhibition effects of luteolin and its derivative glycosides on hCA I, hCA II isoenzymes purified from human erythrocytes by affinity column chromatography technique and commercially available AChE, BChE and α -glucosidase enzymes were investigated experimentally and theoretically (molecular docking).

Results: Antioxidant capacities of luteolin and its derivatives were studied in comparison with standard antioxidants using different methods. According to the results obtained, it was determined that they showed activity close to or better than synthetic antioxidant activities. Overlap was observed that the results of the experimental study to determine the inhibition effects of luteolin and its derivative glycosides on hCA I, hCA II isoenzymes, AChE, BChE, and α -Glucosidase enzymes with the molecular simulation insertion results studied. According to the experimentally found IC_{50} values, it was determined that the best inhibitors were Orientin (IC_{50} : 27.73) for the hCA I isoenzyme, Cynaroside (IC_{50} : 18,24) isoenzyme \approx Orientin (IC_{50} : 23.90) for the hCA II, Isoorientin (IC_{50} : 1,93) for the AChE enzyme, Cynaroside (IC_{50} : 6.42) \approx Luteolin (IC_{50} : 7.45) for BChE enzyme, Cynaroside (IC_{50} : 7.15) for α -Glucosidase enzyme. According to the results of the theoretical molecular docking studies, the best inhibitors are Orientin (-9.90) for hCA I isoenzyme, Orientin (-8.87) \approx Synaroside (-8.78) for hCA II isoenzyme, Orientin (-14.354) \approx Isoorientin (-13,95) for AChE enzyme, Orientin (- 13.42), for BChE enzyme, Cynaroside (-12.81) for α -Glucosidase enzyme.

Conclusion: The obtained results were determined that luteolin and its derivative glycosides compounds have high antioxidant potential. In addition, it was determined both experimentally and theoretically that the structures had a very effective inhibition on the studied enzymes

Keywords: Luteolin, Luteolin glycosides, antioxidant activity, carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -Glucosidase.

February 2023, 120 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
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
GİRİŞ.....	1
Enzimler	1
Enzimlerin yapısal özellikleri, adlandırılması ve sınıflandırılması.....	1
Karbonik Anhidraz Enzimi	4
Asetilkolinesteraz Enzimi	7
Bütirikolinesteraz Enzimi	9
Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	11
Serbest radikaller.....	11
Oksidatif stres	12
Antioksidanlar	13
Sentetik antioksidanlar	14
Doğal antioksidanlar	15
Antioksidanların etkisi	18
Antioksidanların sınıflandırılması.....	19
Yaygın Kullanılan Antioksidan Metotlar.....	20
Fenolik Yapılar ve Flavonoidler	20
Luteolin	21
Sinarozit (Luteolin-7- <i>O</i> -glikozit).....	22
Orientin (Luteolin-6- <i>C</i> -glikozit)	23
İzoorientin (Luteolin-8- <i>C</i> -glikozit)	23
Moleküler Simülasyon Yerleştirme	24
Çalışmanın Amacı.....	24
KURAMSAL TEMELLER.....	26
MATERYAL VE YÖNTEM	30

Materyal	30
Kullanılan kimyasal maddeler.....	30
Yararlanılan alet ve cihazlar.....	31
Kullanılacak Çözeltiler ve Hazırlanışları	32
DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler	32
Fe ³⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili kullanılan çözeltiler.....	32
ABTS ^{·+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler.....	32
DMPD ^{·+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler	32
CUPRAC metodu ile ilgili çözeltiler	33
FRAP metodu ile çözeltileri.....	33
CA enziminin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler.	33
Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler.....	34
Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler	35
Bütirikolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler	35
α -Glikozidaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması	36
Yöntem.....	36
1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme kapasitesi.....	36
Fe ³⁺ indirgeme kapasitesi	36
2,2-Azino-Bis (3-Etilbenzo-Tiyazolin-6-Sülfonik Asit) (ABTS) radikali giderme kapasitesi	37
<i>N,N'</i> -Dimetil- <i>P</i> -Fenilendiamin Dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi....	37
Cu ²⁺ indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu).....	37
FRAP İndirgeme Aktivitesi	38
İnsan Kanından hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Saflaştırılma Çalışmaları	38
Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ile ilgili çalışmalar	38
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanılan afinite kromatografisi kolonunun hazırlanması	38
Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini	40
Esteraz aktivitesi	40
Protein Tayini.....	41
Kalitatif protein tayini	41
Kantitatif protein tayini	41
CA izoenzimleri'nin SDS-PAGE ile saflığının kontrolü.....	41

Karbonik Anhidraz (hCA I ve hCA II) İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Luteolin ve Türevlerinin Etkisinin Belirlenmesi.....	42
Luteolin ve Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	42
Luteolin ve Türevlerinin Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi	42
α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini.....	43
Moleküler Simülasyon Yerleştirme Çalışmaları	43
ARAŞTIRMA BULGULARI	44
Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	44
Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kuvveti bulguları	44
Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC Metodu) bulguları	44
FRAP indirgeme aktivitesi bulguları	45
DPPH \cdot serbest radikal giderme sonuçları.....	46
2,2- ABTS \cdot^{+} giderme aktivitesi sonuçları	47
DMPD \cdot^{+} giderme aktivitesi bulguları	49
Afinite Kromatografisi ile Yapılan hCA I ve II İzoenzim Saflaştırma Çalışmaları	51
Kalitatif protein tayini	51
Kantitatif protein tayini	52
SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi ile Molekül Ağırlığı ve Saflık Kontrolü.....	53
Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamidin hCA I İzoenzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları.....	54
inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	63
Moleküler Yerleştirme Çalışmaları.....	63
CAI ve CA II izoenzimleri moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları.....	64
AChE enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları.....	68
Şekil 56. AChE enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	69
BChE enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları	70
α -Glikozidaz enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları	72
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR.....	93
ÖZGEÇMİŞ.....	102

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. CA İzoenzimlerinin Katalize Ettiği Reaksiyonlar.....	6
Tablo 2. Yetişkin İnsan Vücudunda BChE ve AChE Enzimlerinin Dağılımı.....	9
Tablo 3. Reaktif Oksijen Türleri, Reaktif Nitrojen Türleri ve Serbest Olmayan Radikal Türleri.....	12
Tablo 4. Sentetik ve Doğal Antioksidanların Avantajları ve Dezavantajları	15
Tablo 5. Flavonoidlerin Kimyasal Yapısı (Gülçin 2012).	17
Tablo 6. Esteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Maddelerin Miktarları ve Uygulama Sırası .	40
Tablo 6. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Kullanım Sırası ve Miktarları.....	43
Tablo 7. Farklı Metotlarla Belirlenmiş Olan Luteolin ve Türevlerinin Antioksidan Yeteneklerinin Standart Antioksidanlar İle Karşılaştırmaları.....	51
Tablo 8. İnsan Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılan hCA I ve II İzoenzimleri İçin Hazırlanan Saflaştırma Tablosu.....	53
Tablo 9. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in Esteraz Aktivitesi ile hCA I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 ve K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri	55
Tablo 10. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in Esteraz Aktivitesi ile hCA II İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri	57
Tablo 11. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in AChE Enziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i değerleri ve İnhibisyon Türleri.....	59
Tablo 12. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in BChE Enziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri.....	61
Tablo 13. Luteolin ve Türevlerinin α -Glikozidaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri	63
Tablo 14. Luteolin ve Türevi Glikozitler ile Referans Moleküllerin hCA I ve hCA II İzoenzimleri, Asetilkolinesteraz, Bütilkolinesteraz ve α -Glikozidaz Enzimleri ile Moleküler Similasyon Yerleştirme Sonuçları	63
Tablo 15. Antioksidan Kapasitesi Belirleme Metotları	76

Tablo 16. Luteolin ve Türevlerinin Fe ³⁺ İndirgeme, FRAP İndirgeme ve CUPRAC İndirgeme Yöntemleri ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonucu Elde Edilen 10 µg/mL Konsantrasyonuna Karşılık Gelen % Absorbans Değerlerinin Birbirleriyle ve Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması	79
Tablo 17. Luteolin ve Türevlerinin DPPH, ABTS, DMPD Radikal Giderme Yöntemleri ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Amacı ile IC ₅₀ Değerlerinin Birbirleriyle Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması	84
Tablo 18. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC ₅₀ , K _i Değerleri ve İnhibisyon Türü	86
Tablo 19. AChE ve BChE Enzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC ₅₀ , K _i Değerleri ve İnhibisyon Türü	88
Tablo 20. AChE ve BChE Enzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC ₅₀ , K _i Değerleri ve İnhibisyon Türü	89
Tablo 21. Luteolin ve Türevi Glikozitler ile Referans Moleküllerin hCA I ve hCA II İzozimleri, Astilkolinesteraz, Bütirikolinesteraz ve α-Glikozidaz Enzimleri ile Moleküler Simülasyon Yerleştirme Sonuçları ile Deneysel IC ₅₀ Değerleri	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. CA enzimlerinin katalitik merkezleri (His 94, His 96 ve His 119) (Kürelerden geniş çaplı olanı Zn^{2+} iyonunu, bu büyük küre etrafındaki küçük olanlar ise kristal halde immobilize olmuş olan H_2O moleküllerini temsil etmektedir.....	4
Şekil 2. Karbonik anhidraz enziminin inhibisyon mekanizması.....	7
Şekil 3. AChE ve BChE aktif bölgeleri;((A) BChE (pembe, PDB ID: 1P0I) ve AChE (beyaz, PDB ID: 4EY7) aktif bölge geçidini kaplayan amino asitler açıl bağlama cebini içerir (BChE için Q119, V288, A328; Y124, F297, hAChE için Y338 (B) huAChE'nin aktif bölgesinin yüzey görünümü (C) huBChE'nin aktif bölgesinin yüzey görünümü)	10
Şekil 4. Yaygın sentetik antioksidanların kimyasal yapıları	14
Şekil 5. Flavonoidlere ait metal şelatlama mekanizması	18
Şekil 6. BHT'nin lipit peroksi radikalini giderme mekanizması.....	19
Şekil 7. Luteolin'in açık kimyasal yapısı	21
Şekil 8. Sinarozit'in açık kimyasal yapısı	22
Şekil 9. Orientin'in açık kimyasal yapısı	23
Şekil 10. İzorientin'in açık kimyasal yapısı	24
Şekil 11. p-nitrofenilasetatin p-nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	40
Şekil 12. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlarda ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması.....	44
Şekil 13. Luteolin ve Luteolin türevlerinin farklı konsantrasyonlarda kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması.....	45
Şekil 14. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlarda FRAP indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması	46
Şekil 15. DPPH· aktivitesinde kullanılan standart grafik	47
Şekil 16. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali giderme indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması.....	47
Şekil 17. ABTS· ⁺ aktivitesinde kullanılan standart grafik	48
Şekil 18. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin ABTS radikali giderme yeteneklerinin referans alınan antioksidanlar ile karşılaştırılması.....	49
Şekil 19. DMPD· ⁺ aktivitesinde kullanılan standart grafik.....	50
Şekil 20. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin DMPD radikal giderme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması	50

Şekil 21. Safılaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu sonucu yapılan kalitatif protein tayini grafiği.....	52
Şekil 22. Bradford yöntemi ile yapılan kantitatif protein tayini standart grafiği	52
Şekil 23. Safılaştırılan hCA I, II izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüsü (a: hCA I, b: hCA II, Kullanılan standart protein markırları: (6: 130 kDa, 5: 95 kDa, 4: 72 kDa, 3: 55 kDa, 2: 36 kDa, 1: 28 kDa)	53
Şekil 24. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	54
Şekil 25. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	54
Şekil 26. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	54
Şekil 27. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı İzoorientin konsantrasyonlarında çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	55
Şekil 28. Asetazolamidin farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] ve Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	55
Şekil 29. Luteoli'nin farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	56
Şekil 30. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	56
Şekil 31. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	56
Şekil 32. İzoorientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	57

Şekil 33. Asetazolamid'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Asetazolamid] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	57
Şekil 34. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk(Ki) grafikleri.....	58
Şekil 35. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	58
Şekil 36. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	58
Şekil 37. İzoorientin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	59
Şekil 38. Takrin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Takrin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	59
Şekil 39. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki).....	60
Şekil 40. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	60
Şekil 41. Orientin'in BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonunda çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	60
Şekil 42 İzoorientin'in BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonunda çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	61
Şekil 43. Takrin'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzim üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Takrin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri.....	61
Şekil 44. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri	62

Şekil 45. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (K _i) grafikleri	62
Şekil 46. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (K _i) grafikleri	62
Şekil 47. İzorientin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzorientin] b) Lineweaver-Burk (K _i) grafikleri	63
Şekil 48. CA I izoenzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	65
Şekil 49. CA II izoenzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	65
Şekil 50. CA I izoenzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	66
Şekil 51. CA II izoenzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	66
Şekil 52. CA I izoenzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	67
Şekil 53. CA II izoenzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	67
Şekil 54. CA I izoenzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	68
Şekil 55. CA II izoenzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	68
Şekil 56. AChe enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	69
Şekil 57. AChe enzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	69
Şekil 58. AChe enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	70
Şekil 59. AChE enzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	70
Şekil 60. BChE enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	71

Şekil 61. BChE enzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	71
Şekil 62. BChE enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	72
Şekil 63. BChE enzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri.....	72
Şekil 64. α-Glikozidaz enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri	73
Şekil 65. α-Glikozidaz enzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri	74
Şekil 66. α-Glikozidaz enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri	74
Şekil 67. α-Glikozidaz enzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri	75
Şekil 68. Neokuprin'nin antioksidan moleküllerin bulunduğu ortamda vermiş olduğu indirgenme tepkimesi	77
Şekil 69. FRAP indirgeme yöntemine göre Fe ³⁺ -TPTZ-Fe ²⁺ -TPTZ indirgeme tepkimesi	78
Şekil 70. Luteolin radikal moleküllerinin en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) dağılımı ve en düşük boş moleküler orbital (LUMO) dağılımı	80
Şekil 71. DPPH serbest radikalleri ve Luteolin arasındaki muhtemel reaksiyon şeması.....	81
Şekil 72. DPPH serbest radikalleri ile Orientin arasındaki muhtemel reaksiyon şeması.....	82
Şekil 73. K ₂ S ₂ O ₈ oksidan varlığında ABTS ^{·+} 'nin oluşum reaksiyonu	83
Şekil 74. DMPD ^{·+} oluşum ve sönümlenme reaksiyonu.....	84
Şekil 75. Moleküler docking çalışma sonuçlarına göre en iyi inhibitör etkisi gösteren yapılara ait enzim-inhibitör etkileşimleri	90

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{·+}	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikali
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin esteraz enzimi
BChE	Bütirikolinesteraz enzimi
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CA	Karbonik anhidraz enzimi
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
DPPH-H	İndirgenmiş 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DTNB	5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik asit)
E.C.	Enzim komisyon
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Mevcut enzim konsantrasyonu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _M	Maksimum hızın yarısına neden olan substrant konsantrasyonu
ROS	Serbest oksijen radikali
TCA	Triklorasetik asit
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-triazine
Tris	Trihidroksimetil amino metan

GİRİŞ

Enzimler

Kimyasal dönüşümler gerçekleştiren enzimler, enerjiyi bir biçimden diğerine dönüştüren biyolojik sistemlerdeki katalizörlerdir (Stryer *et al.* 2014). Enzimler katalitik RNA molekülleri hariç protein yapısında olup canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokimyasal katalizörlerdir. Enzimler %100'lük verim ile ürün oluşumunu sağlayan, en büyük ve en özelleşmiş protein gruplarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Biyokimyasal reaksiyonların merkezinde yer alan enzimler; basamaklı tepkimeleri katalizler, besin moleküllerinin parçalanmasını sağlar, tepkimeler sonucunda ortaya çıkan kimyasal enerjiyi dönüştürür ve korurlar. Ayrıca temel çıkış bileşiklerinden biyolojik öneme sahip olan makro moleküllerin sentezini de gerçekleştirirler (Nelson and Cox 2008; Berg *et al.* 2012).

Enzimlerin yapısal özellikleri, adlandırılması ve sınıflandırılması

Bütün enzimler, katalitik RNA molekülleri hariç protein yapısındadır. Enzimlerin var olan katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarıyla ilişkili olduğu için enzimlerin yapılarının bozulması, alt birimlerine ayrıştırılması veya aminoasit komponentlerinin yıkılması durumunda kaybolur. Enzimlerin katalitik aktivite gösterebilmesi için primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıya sahip olması esastır. Bazı enzimlerin katalitik aktivite sergilemeleri için kofaktörler olarak adlandırılan ek kimyasal gruplara ihtiyaçları vardır. (Nelson and Cox 2008). Enzim kofaktörleri koenzim olarak bilinen organik veya metaloorganik kompleks bileşikler olabildiği gibi inorganik iyonlar da (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} gibi) olabilmektedir. Enzimin kofaktörü ile katalitik olarak aktif şekillerine haloenzim denilir. Haloenzimin yapısında bulunan proteinler apoprotein veya apoenzim olarak bilinir. Haloenzimlerin yapısında bulunan kofaktör grupların kovalent olarak bağlanan grupları prostetik grup nonkovalent olarak bağlanan grupları ise kosubstrat olarak adlandırılır (Nelson and Cox 2008).

Optimal pH, enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH'dır. Enzimler genellikle fizyolojik pH'da yüksek aktivite gösterirler ancak bazı enzimlerde bu durum farklılık gösterebilmektedir. Örneğin proteinleri parçalamada etkili olan pepsin ve tripsin enzimlerinin optimal pH'ları sırası ile 2,0 ve 8,5'tir (Nelson and Cox 2008; Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Ortamdaki substrat miktarının reaksiyon hızını etkilediği bilinmektedir. Yeterli substrat konsantrasyonunun da enzim miktarı arttıkça reaksiyon hızı artar, ancak maksimuma ulaştıktan sonra sabit kalır. Bu noktada enzim substrat ile doymuştur. Enzimlerin bazıları sadece tek substrata etki ederken, bazı enzimler birden fazla substrata etki edebilirler. Bunlara ilaveten enzimlerin geneli stereo özgünlük gösterirler yani substratlarının stereo izomerlerine dahi etki etmezler (Keha ve Küfevioğlu 2020).

Enzimlerin çoğunun adlandırılması, ya enzimin etkilediği substratın sonuna -az son eki getirilerek (ürezaz, amilaz, arginaz, proteaz, lipaz) ya da enzimin katalizlediği tepkimeyi tanımlayan kelime veya sözcük grubunun sonuna -az son eki getirilerek (laktat dehidrogenaz, adenilat siklaz) yapılmaktadır. Ayrıca bu tanıma uymayan yani substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan enzimlerin (pepsin, tripsin) yanı sıra iki veya daha fazla ada sahip olan enzimlerde mevcuttur. Keşfedilen enzimlerin sayısının artması nedeniyle enzimlerin sınıflandırılması için Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (ECIUB) tarafından enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre altı ana grupta sınıflandırılmaları önerilmiştir (Nelson and Cox 2008).

Oksidoredüktazlar: Substratlar arasında redoks (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar ve peroksidazlar bu enzimlere örnek olarak verilebilir. Bu grupların koenzimleri ise FADH₂, NADH ve NADPH'tır.

Transferazlar: Hidrojen dışındaki grupların iki substrat arasında transferini katalizleyen enzimlerdir. Transfer edilen gruplara fosfat, aldehit, keton grupları örnek olarak verilebilir.

Hidrolazlar: Eter, ester, glikozit, peptit ve anhidrit gibi bağların yanı sıra C-X, P-N gibi çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalizleyen enzim grubudur. Esteraz, lipaz, glikozidaz, fosfataz, proteinaz ve bütün nükleaz enzimleri ise bu gruba girer.

Liyazlar: Substratlardan grup uzaklaştırarak çift bağ oluşturan veya çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen yani oksidasyon ve hidrolizden farklı bir mekanizma ile çalışan enzimlerdir. Bu grubun enzimleri hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizler.

İzomerazlar: Bir molekül içindeki yapısal, optik veya geometrik izomerlerin birbirine dönüşümlerini katalizleyen enzimlere izomerazlar denilmektedir. Epimerazlar, rasemazlar ve mutazlar bu grupta bulunan enzimlerdir.

Ligazlar: Yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin fosfat bağlarını kırarak açığa çıkan enerjiyi kullanarak iki molekül arasında (C ile C, O, S ve N bağlarını) bağ oluşumunu katalize eden enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Enzim inhibisyonu, enzimin bazı bileşikler tarafından *in vitro* ya da *in vivo* olarak aktivitesinin azalttığı veya yok edildiği durumdur. Enzimin aktivitesini düşüren ya da yok eden bu bileşikler çoğunlukla küçük molekül ağırlığına sahip bileşik ya da iyonlar olup inhibitör olarak adlandırılırlar. Enzim inhibisyonunun etki mekanizması ve metabolik yollarının aydınlatılması biyokimyacılar açısından için oldukça ilgi çekicidir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü (tersinir) ve geri dönüşümsüz inhibisyon (tersinmez) olarak iki başlık altında incelenebilir. İnhibitör ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini tekrar kazanıyorsa inhibisyon türü geri dönüşümlü inhibisyonudur.

Geri dönüşümlü inhibisyon: Enzimlere kovalent olmayan bağlarla bağlanan inhibitör ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini tekrar kazanmaktadır. Üç farklı geri dönüşümlü inhibisyon çeşidi vardır.

I. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif): İnhibitörler yarışmalı inhibisyonda enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile yarış halindedir. İnhibitörler yapısal olarak substrata benzerler; ancak enzim tarafından ürüne dönüştürülemezler. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör, enzimin aktif bölgesine bağlanarak substrat enzime bağlanmasını engeller ancak substratın konsantrasyonunun artırılması ile inhibitörün etkisi ortadan kaldırılabilir. Enzimin V_{max} değeri değişmez (Berg *et al.* 2012; Keha ve Küfrevioğlu 2020).

II. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif): Substrat ile yapısal olarak benzerlik göstermeyen inhibitör enzimin aktif bölgesine değil de enzimin başka bir bölgesine bağlanır. Bu nedenle substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla da enzimin inhibisyonu engellenemez. Yarışmasız inhibisyonda inhibitör etkisini turnover sayısını düşürerek gösterirken enzimin K_m değeri sabit kalırken, V_{max} değeri azalır. (Berg *et al.* 2012; Keha ve Küfrevioğlu 2020).

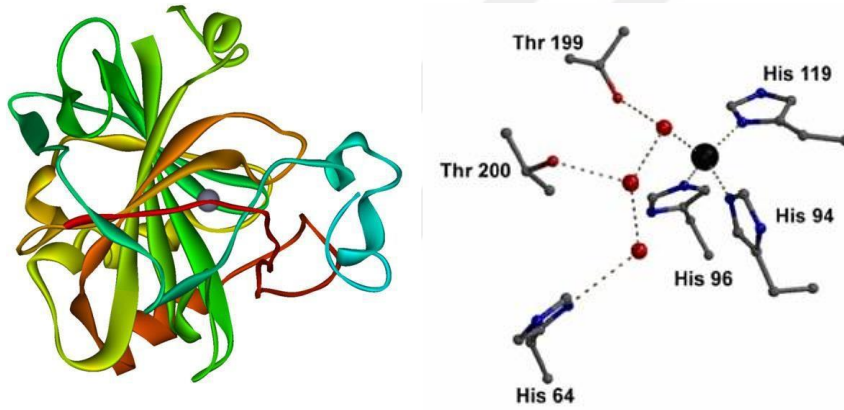
III. Yarı yarışmalı inhibisyon (Unkompetitif): İnhibitor, serbest enzime veya enzim substrat kompleksine bağlanabilir. Bu inhibisyon türünde inhibitör serbest enzimin aktif bölgesine bağlanmak yerine enzim-substrat kompleksine bağlanarak inhibisyon etkisi göstermektedir. Substratın konsantrasyonu arttırılırsa inhibisyonun artar. Oluşan enzim-substrat kompleksinin ortamdan uzaklaşması nedeniyle K_m azalırken ve ortamda oluşan enzim-substrat-inhibitör kompleksinin miktarının artmasından dolayı V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Geri dönüşümsüz inhibisyon: İnhibitörler, enzimlere kovalent olarak bağlanır veya ayrılması zor olan kovalent olmayan bağlara bağlanarak kompleksler oluşturur. Bu durumda, K_M sabit kalırken V_{max} azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Karbonik Anhidraz Enzimi

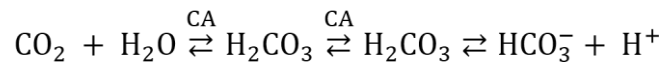
Karbonik anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1), su ve karbondioksiti (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) geri dönüşümlü olarak hidratlayan, 260 aminoasitten oluşan ve yaklaşık olarak 30 kDa ağırlığında olan metaloenzimlerdir. pH kontrolü, fotosentez ve solunum dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve fizyolojik süreçlerde yer alırlar (Burmaoğlu *et al.* 2021).

CA kataliz için elzem olan, Zn^{2+} iyonu içeren, bütün organizmalarda bulunan bir metaloenzimdir. Enzimlerdeki metal iyonları, pozitif yükler aracılığıyla kimyasal aktiviteyi artırma, kinetik olarak kararlı bağlar oluşturma ve bazı durumlarda çoklu oksidasyon durumlarında kararlı kalma yeteneğine sahiptir (Göçer 2013).



Şekil 1. CA enzimlerinin katalitik merkezleri (His 94, His 96 ve His 119) (Kürelerden geniş çaplı olanı Zn^{2+} iyonunu, bu büyük küre etrafındaki küçük olanlar ise kristal halde immobilize olmuş olan H_2O moleküllerini temsil etmektedir (Göçer 2013)

İlk olarak, sığır eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi, karbondioksit ve bikarbonat iyonu dönüşümlü reaksiyonlarında katalizör görevi yapar (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2001; Akıncıoğlu *et al.* 2013; Göçer and Gülçin 2013).



Solunum ve sindirim dokuları ile akciğerlere CO_2 ve HCO_3^- taşınmasında rol oynayan CA, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde, pH ve CO_2 açısından vücut dengesini sağlamada etkindir. Ayrıca CA çeşitli doku veya organlardaki elektrolit salgısından, glukoneogenez, lipogenez ve üre döngüsü gibi önemli biyokimyasal reaksiyonlarda ve kemik erimesi, kireçleme, tümörleşme birçok süreçte de rol oynamaktadır (Supuran and Scozzafava 2003).

Karbonik anhidraz enzimi için α -, β -, γ -, δ -, δ -, ϵ -, ζ - ve t olmak üzere sekiz ayrı CA kategorize edilmiştir. Bu izo enzimlerden α -grubu enzimler ilk bulunan ve üzerinde en fazla çalışılan monomerik yapıdaki enzimlerdir. α -CA'lar çeşitli ökaryot ve prokaryot soylarında yaygındır (Pedrood *et al.* 2021). β -CA izoenzimi bakterilerde, alglerde, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında, γ -CA izoenzimi archealar da ve yine bakterilerde, δ -CA deniz diatomlarının bazılarında bulunmaktadır (Supuran 2008; Atmaca *et al.* 2021).

Karbonik anhidraz enzim grubunun en bilineni α ailesidir. α -CA dokularda, hücre içinde dağılımları ve kinetik özellikleri farklı olan on altı farklı (CA I-XVI) izoenzimi belirlenmiştir. Bu CA izoenzimlerinden I, II, III, VII ve XIII sitoplazmada, IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı olarak, VA ve VB mitokondride ve VI tükürük bezlerinde salgılanmaktadır. CA XV ise insanlarda ve diğer primatlarda ve omurgalılarda bulunur (Hilvo *et al.* 2005; Bilgiçli *et al.* 2020; Yamali *et al.* 2020).

CA, genellikle bitkilerin kloroplastlarında, az miktarlarda da sitozollere de bulunur ve fotosentezin gerçekleşmesinde önemli görevleri vardır. Fotosentez gerçekleşirken elektron transportuna eklenir ve elektron transfer sistemine elektron vericisi olarak HCO_3^- iyonlarını sağlar. Bitki CA enzimlerinin işlevleri lokalizasyonu ile yakından alakalıdır. CA kloroplastlarda çözülmüş olarak stroma sıvısı içerisinde, bağlı olarak ta tilakoit membranlarında ve stroma tilakoitlerinde bulunmaktadır.

CA I ve II canlı organizmalarda en yaygın şekilde bulunan, çalışmaların odak noktasında olan ve üzerine en çok çalışılan izoenzimlerdir. Bu izoenzimler diğer izoformlarından farklı olarak disülfid bağları ya da fosfat grupları bulundurmazlar. CA I ve CA II izoenzimleri insan, balık ve fare eritrositlerinden, fare tükürüğünden, sığır kemiği ve lökositlerinden, tükürük bezlerinden, kaslardan, beyinden, sinir miyelin kılıfından, pankreas, prostat ve endometrial dokulardan, bakterilerde ve bazı bitki ürünlerinden saflaştırılabilirler. CA II, diğer izoenzimlerine nispeten daha kolay saflaştırılabilir (Akıncioğlu *et al.* 2013). hCA II izoenzimi insan eritrosit hücrelerinden hCA I'e oranla daha az miktarda saflaştırılmasının karşın miktarı ortalama olarak 1 g hemoglobinden 2 mg olarak hesaplanmıştır. 25 °C'de hCA I izoenzimin turnover sayısı da $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, hCA II izoenzimin 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur (Sly and Hu 1995; Ren and Lindskog 1992; Supuran and Scozzafava 2001). hCA II ve IV izoenzimlerin ise bol bulunduğu yerler göz lensi, kornea ve silyer epitelyumdur. CA izoenzimlerinin insanda bulunan formları incelenmiş sonuç olarak izoenzimlerin varlığı ve en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarından metabolizma sonucu oluşan CO_2 'i, HCO_3^- 'a, akciğerlerde ise HCO_3^- 'ın CO_2 'e yıkımı reaksiyonunu katalize ederek solunum sisteminde yer

aldığı belirlenmiştir (Göçer and Gülçin 2013). Tablo 1’de CA izoenzimlerinin katalize ettiği bazı tepkimeler verilmiştir (Supuran and Scozzafava 2001).

Tablo 1. CA İzoenzimlerinin Katalize Ettiği Reaksiyonlar (Supuran and Scozzafava 2001).

1. $O = C = O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
2. $O = C = NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
3. $NH = C = NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
4. $RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
5. $RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RSO_2H + ArOH$
6. $ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH^-$
7. $RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
8. $PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9. $RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$

X-ray kristalografi çalışma sonuçlarına göre, çinko metal iyonunun aktif bölgedeki 15 Å derinliğindeki bir su veya hidroksil-iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96 ve His 119) tarafından organize edilen, bir oyuğun tabanında konumlandığı görülmüştür. Çinko bağlı su, hidrojen bağı etkileşimleri ile Glu 106’nın karboksilat grubuna köprü konumunda olan Thr 199’un hidroksil grubu ile tutunmaktadır. Bu etkileşimler neticesinde, nükleofilik karakteri artan su (çinko bağlı) molekülü, nükleofilik etkileşim için uygun yerdeki CO₂’e yaklaşmaktadır (Arslan *et al.* 1996; Akbaba *et al.* 2014). CA enziminin CO₂’i hidratasyon reaksiyonunun katalizleme mekanizması için önerilen şema Şekil 2’de verilmiştir (Engstrand *et al.* 1995; Akıncıoğlu *et al.* 2013). İlk aşamada, Zn²⁺ iyonuna hidroksilin kenetlenmesi ile enzimin aktif hale gelir. İkinci basamakta güçlü nükleofilik karakteri ile enzimin aktif formu, CO₂’e saldırır ve üçüncü basamakta Zn²⁺ iyonuna bağlanmış HCO₃⁻ iyonunun oluşumu gerçekleşir. Dördüncü basamakta HCO₃⁻ iyonunun su molekülünün yer değiştirmesi ile çözeltiye geçmesi sonucu Zn²⁺ iyonu ile su molekülü birleşir ve bu durum enzimin asit formunun oluşmasını sağlar (Engstrand *et al.* 1995; Akbaba *et al.* 2014; Akıncıoğlu *et al.* 2013). Çözeltinin aktif kısmındaki proton etkileşimi veya çözeltide bulunan tampon sistemin aracılığı ile ilk bileşiğin rejenere olması için aktif bölgeden çevreye bir proton verilir (Scozzafava and Supuran 2003; Çetinkaya *et al.* 2012). Biyoanalitik, biyofiziksel ve biyoorganik amaçlar için kullanılabilen CA enzimi, özellikle ilaç dizaynı çalışmaları için oldukça uygun bir enzimdir. CA izoenzimleri protein-ligant etkileşimlerinin incelendiği biyofiziksel çalışmalarda ve inhibisyon çalışmalarında oldukça önemlidir. Tek zincirli protein yapısında olan CA enzimi, moleküler ağırlığı açısından ortalama bir ağırlıktadır (Akıncıoğlu *et al.* 2013).

görevli olmadıklarını, ACh'nin ayrıca biyoelektriksel akımın, sinir hücreleri ve kas lifleri boyunca oluşmasında da görevli olduğu bildirilmiştir (Wilson and Nachmansohn 1954).

Alzheimer hastalığı, ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıkan bilişsel veya hafıza ile ilgili olan, tam tedavisi, kesin mekanizması bilinmediği için halen bulunamamış olan bozukluklardan biridir. Alzheimer hastalığı, çoğunlukla ACh'nin etkili olduğu beyindeki nörotransmitterlerin azalması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (David *et al.* 2004). Asetilkolinesterazın (AChE), Alzheimer hastalığı ve diğer demansların tedavisi için uygun bir terapötik hedef olduğu bildirilmiştir. Bu amaçla, asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI'ler) yaygın olarak kullanılmaktadır (Köse *et al.* 2020).

AChE enzimini inhibe ederek çevresel ve merkezi sinir sistemi üzerine etki eden AChE'nin en önemli inhibitörleri organofosfatlı pestisitler olarak bilinmektedir. Bu organofosfatların sebep olduğu zehirlenmelerinin tedavisinde asetilkolin esteraz yeni bir yönelim ile biyotemizleyici olarak kullanılmaktadır. Bu biyotemizleyicilerin taşınması gereken yönleri şöyle bildirilmiştir (Tan *et al.* 2006).

- İlaç olarak kullanılabilmesi için gerekli oranlarda elde edilebilmeli,
- İleri derece de dönüşüm yeteneğine sahip olmalı,
- Dolaşımdaki yarı ömrü uzun olmalı,
- İmmünolojik olarak uygunluk göstermeli.

Ortalama yaşam süresi arttıkça yani yaş ilerledikçe yaşlılığa ait problemler artmakta ve toplumları hem sosyal hem de ekonomik olarak olumsuz bir şekilde etkilemektedir. %60'ını Alzheimer hastalarının oluşturduğu, halk arasında demans olarak bilinen hastalık özellikle yaşlı nüfusta daha sık görülen çağımızın önemli hastalıkları arasındadır (Adams *et al.* 1984; Bachman *et al.* 1992).

Alzheimer hastalığı genetik yatkınlığa bağlı olarak ortaya çıkabilir. Ancak çoğunlukla beyindeki kolinerjik kayıplar sonucu kolinerjik sinaps ve kavşaklardan salınan asetilkolin miktarının azalması neticesinde ortaya çıkar. (Quinn 1987; Francis *et al.* 1999). Bununla birlikte son yıllarda yapılmış olan başka bir araştırmada bütirikolinesteraz miktarının da Alzheimer hastalarının beyinlerinde hasta olmayanların beyinlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Massoulie *et al.* 1993).

Günümüzde Alzheimer hastalığının iyileştirilmesinde kullanılan ilaçlar arasında AChE inhibitörleri (AChEI), başarı oranının üst seviyelerde olduğu tek ilaç grubudur. Şimdiye kadar, farklı AChEI (donepezil, Takrin, galantamin ve rivastigmin vb.) Dünya sağlık örgütü tarafından onaylanmış ve Alzheimer hastalığının için bir ön tedavi olarak kullanılmıştır (Ma *et al.* 2020).

Normal ve yaşlı bireyler üzerinde yapılmış olan araştırmalarda Alzheimer hastalarının beyindeki asetilkolin düzeyleri arasındaki farkın %50 civarında olduğu bulunmuştur (Forette and Boller 2000).

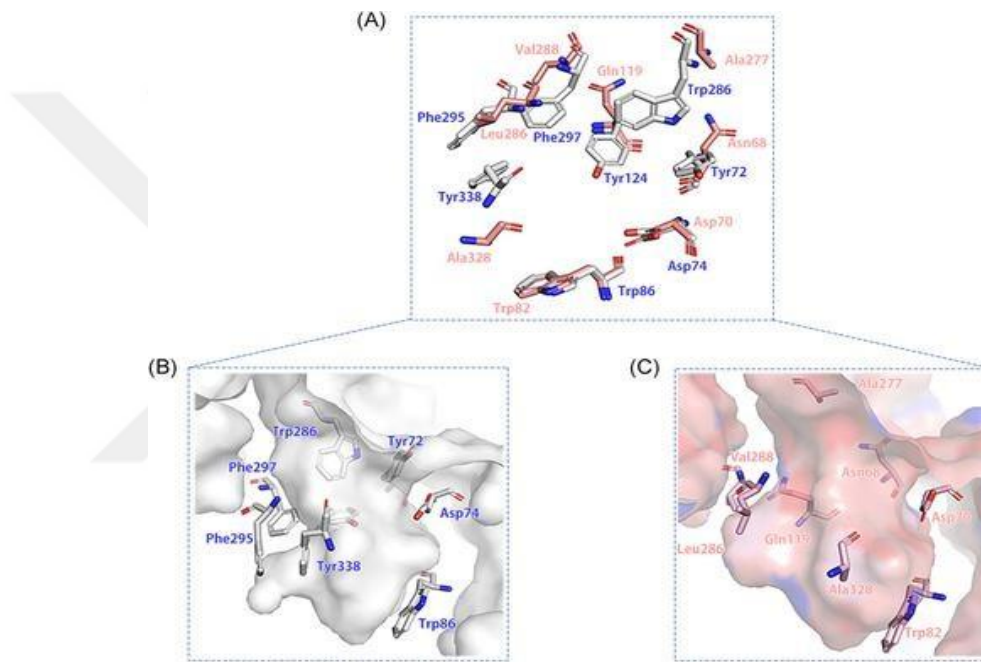
Bütirilkolinesteraz Enzimi

BChE esas olarak beyin hücrelerindeki endotelial ve glial hücrelerle ilişkilidir ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimi gibi nörotransmitterler olan asetilkolini (ACh) ve butirilkolini (BCh) sırasıyla kolin ve asetat/bütirata hidrolize eden kolinerjik bir enzimdir (Durmaz *et al.* 2022). İnsan vücudunda tahmin edilen toplam AChE ve BChE içeriği sırası ile 4,34 mg- 58 mg'dır. Sonuçta tahminlere göre yetişkin bir insanda AChE enziminden 10 kat daha fazla BChE bulunur (Tablo 2) (Lockridge 2015). AChE'nin yüksek seviyelerde kas, eritrosit ve beyinde bulunmasına rağmen, bütirilkolinesteraz (BChE) karaciğer tarafından üretilerek seruma salgılanan ve böbrek, barsak, karaciğer, akciğer ve kalpte bol miktarlarda bulunan bir enzimdir (Aras *et al.* 2019). Sağlıklı yetişkin insanlarda, 5 yıllık bir süre boyunca plazmadaki BChE takip edilmiş ve plazmada tutarlı bir BChE aktivitesi görüldüğü tespit edilmiştir. Bununla birlikte plazma BChE aktivitesi, hamilelik, karaciğer hastalığı, yetersiz beslenme, karsinom ve diğer rahatsızlıkları olan kişilerde ayrıca BChE geninin genetik olarak kalıtsal yanlış anlamlı mutasyonlarına sahip kişilerde azaldığı gözlenmiştir. Obez deneklerin plazmasında ve ayrıca BChE geninin Cynthiana ve C5+ varyantlarında yüksek BChE aktivitesi bulunduğu tespit edilmiştir (Lockridge 2015).

Tablo 2. Yetişkin İnsan Vücudunda BChE ve AChE Enzimlerinin Dağılımı (Lockridge 2015).

Doku	Doku ağırlığı (g)	BChE (mg)	AChE (mg)
Plazma	3500	16	0.003
Karaciğer	1400–1500	13	0.10
Deri	4000–5000	7	0.77
Bacak kası	3500	6	2.3
İnce barsak	800–900	4	0.14
Akciğerler	400	3	0.06
Beyin zarı	1200	3	0.46
Karın	300	1.8	0.05
Dalak	150–200	1	0.05
Böbrek	130–160	1	0.02
Beyincik	150	0,8	0.25
Kalp	300	0,6	0.06
<i>Medulla oblongata</i>	20-25	0.085	0.08
Tiroid	20	0.0085	0.002
Toplam		58	4.34

BChE'nin yapısı, yaklaşık %65'lik homolojik amino asit dizileri nedeniyle AChE'ye oldukça benzerdir. Katalitik bir üçlü, kolin bağlama cebi ve açıl bağlama cebinden oluşan aktif bölgelerinin her ikisi de ~ 20 Å derin bir geçidin dibine gömülüdür. BChE'deki katalitik üçlü, üç korunmuş kalıntıdan oluşur. AChE ile moleküler düzeydeki ana farkları, hidroliz sırasında substratların açıl yarımını barındırmaktan sorumlu olan geçitteki alt birim alanlarından biri olan açıl bağlama cebidir. AChE'nin açıl bağlama cebindeki Tyr124, Phe297 ve Tyr338 kalıntıları yerine BChE'de Gln119, Val288 ve Ala328 vardır ve bu farka BChE'ye neredeyse 300 Å³ ekstra kullanılabilir hacim sağlar (Şekil 3). Açıl bağlama cebindeki bu fark nedeniyle, BChE, butiriltiyokolin iyodür, süksinilkolin, kokain ve ghrelin gibi çeşitli hacimli substratlar için daha erişilebilirlik sağlar (Xing *et al.* 2021)



Şekil 3. AChE ve BChE aktif bölgeleri;((A) BChE (pembe, PDB ID: 1P0I) ve AChE (beyaz, PDB ID: 4EY7) aktif bölge geçidini kaplayan amino asitler açıl bağlama cebini içerir (BChE için Q119, V288, A328; Y124, F297, hAChE için Y338 (B) huAChE'nin aktif bölgesinin yüzey görünümü (C) huBChE'nin aktif bölgesinin yüzey görünümü (Xing *et al.* 2021))

Çeşitli hayvan türlerinde, BChE'nin ön tedavisinin, sinir ajanlarının toksisitesine karşı koruyucu bir etkinlik uyguladığı, askeri ve tarımda kimyasal silahlara ve organofosforlu (OP'ler) pestisitlere karşı BChE işlevleri sağladığı doğrulanmıştır (Ashani and Pistinner 2004). BChE ayrıca kokaini hidrolize etme yeteneğine sahiptir ve gelişmiş kokain hidrolaz aktivitesine sahip varyantları, insanların kokain bağımlılığının tedavisinde mevcut terapötik sonuçlar sergilemiştir. Büyük miktarlarda eksojen doğal BChE'nin kemirgenleri ve maymunları ölümcül bir dozda kokain toksisitesine karşı koruduğu bildirilmiştir (Sun *et al.* 2002) Ayrıca, BChE, nörodejeneratif hastalıklarda mekanik çalışmalar için bir araç olduğu kadar farmakolojik bir hedef olarak çok yönlülüğü nedeniyle çok dikkat çekmiştir. İlerlemiş Alzheimer hastalığı olan

hastaların beyinlerinde BChE aktivitesi artarken AChE aktiviteleri önemli ölçüde azalır. Bu nedenle, BChE, ilerleyen Alzheimer hastalarında ACh düzeyini artırmayı, dolayısıyla bilişsel işlevleri iyileştirmeyi amaçlayan bir hedef olarak görülebilir (Li *et al.* 2017) Ayrıca, BChE ve β -amiloid ($A\beta$) plaklarının birlikte yerleşimi de BChE ve $A\beta$ ayrışması arasındaki olası ilişkiyi göstermiştir (Gomez and Moran 1997). BChE'nin yağ metabolizmasını düzenlemedeki ve ghrelini hidrolize ederek duygusal davranışları etkilemedeki rolü de son yıllarda incelenmiştir. BChE nakavt (KO) fareleri, yüksek yağlı diyet altında obez durumlara ulaşmaya eğilimlidir, ancak BChE'nin periferik ekspresyonu, obez fareleri normal vücut kütlesine çevirebilir (Chen *et al.* 2016).

Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller

Serbest radikal, genellikle molekül ağırlıkları küçük olan, tek veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, oldukça reaktif olan, bağımsız olarak var olabilen kimyasal türlerdir. Serbest radikaller oldukça kararsız atomlar, moleküller veya iyonlardır. Serbest radikaller vücutta endojen olarak protein, yağ ve karbohidratların oksidasyonu sonucu, enerji kaynağı ATP'nin üretilme işlemi sırasında ve oksidatif stres sonucu oluşabilirler. Aynı zamanda ekzojen olarak da sigara kullanımı, bazı kirleticiler, organik çözeltiler ve pestisitler gibi unsurlar ile dışarıdan alınabilen bileşiklerdir (Gülçin 2012).

Serbest radikaller oksijen, azot ve kükürt elementlerinden oluşurlar. Oksijen merkezli serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinirler. ROS'lar yakın hücrelerdeki moleküllere hızla saldıran ve neden oldukları hasarın kaçınılmaz olduğu süperoksit ($O_2\cdot^-$), hidroksil ($HO\cdot$), peroksil ($ROO\cdot$), alkoksil ($RO\cdot$) ve nitrik oksit ($NO\cdot$) gibi radikal türleri içerirler. Ayrıca tekli oksijen ($1O_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan ROS vardır (Gülçin 2020). Çizelge 2'de reaktif oksijen türleri, radikal olmayan oksijen türleri ve nitrojen türleri verilmiştir (Gülçin 2012, 2020).

Tablo 3. Reaktif Oksijen Türleri, Reaktif Nitrojen Türleri ve Serbest Olmayan Radikal Türleri

Reaktif oksijen türleri		Serbest olmayan radikal türleri	
Superoksit radikal	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikal	HO^{\cdot}	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil radikal	HOO^{\cdot}	Ozon	O_3
Lipit radikal	L^{\cdot}	Lipit hidroperoksit	$LOOH$
Lipit peroksil radikal	LOO^{\cdot}	Hipoklorit asit	$HOCl$
Peroksil radikal	ROO^{\cdot}	Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
Lipit alkoksil radikal	LO^{\cdot}	Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Azot dioksit	NO_2^{\cdot}	Nitros asit	HNO_2
Nitrik oksit	NO^{\cdot}	Nitril klorit	NO_2Cl
Nitrosil katyonu	NO^+	Nitrosil anyonu	NO^-
Tiyil radikal	RS^{\cdot}	Peroksinitrit asit	$ONOOH$
Protein radikal	P^{\cdot}	P. Nitroz oksit	N_2O

Normal hücre fonksiyonu için fizyolojik konsantrasyonlarda ROS gerekli olabilir ve canlı organizmada birincil bağışıklık savunma sisteminin ihtiyacı olarak üretilirler. Fagositik hücrelerden nötrofiller, monositler veya makrofajlar, öldürme mekanizmalarının bir parçası olarak büyük miktarlarda $O_2^{\cdot-}$ veya NO^{\cdot} radikallerini sentezleyerek yabancı organizmalara karşı savunma yaparlar. Ancak aşırı ROS üretimi nükleik asitler, lipitler, proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri ve karbonhidratlar gibi önemli biyomolekül yapılarına zarar verebilir, kademeli oksidatif hasara, nihayetinde hücre fonksiyonunun bozulmasına ve sonuç olarak DNA ve RNA'ya zarar vererek hücre ölümüne neden olabilir (Ak and Gülçin 2008; Gülçin 2012).

Oksidatif stres

Normal, sağlıklı hücrelerde uygun bir prooksidan-antioksidan dengesi vardır. Ancak, oksijen türlerinin üretiminin büyük ölçüde artması veya antioksidan seviyelerinde meydana gelen azalma bu dengeyi prooksidanlara (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) doğru kaydırır. Meydana gelen bu durum oksidatif stres olarak tanımlanır (Gülçin 2012). Diğer bir tanıma göre oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve üretimi neticesinde biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri etkili bir şekilde detoksifiye edebilme veya oluşan hasarı onarma yeteneği arasındaki bozukluğu temsil eder (Kalın *et al.* 2015; Öztaşkın *et al.* 2019). Oksidatif stresin temel nedeni olarak iki ana mekanizma gösterilebilir. İlk mekanizma antioksidanların konsantrasyonunun, doğal antioksidan içerikli besinlerin alımının azalması veya mutasyona uğramış olan antioksidan enzimler ve toksinler nedeniyle azalması. İkicisi ise

aktif fagositlerden türetilen oksijen, nitrojen veya karbon temelli reaktif türlerin sayısının, kronik inflamasyon durumunda artması durumlarıdır (Gülçin 2012).

Aerobik organizmaların tamamında, hasar görmüş olan molekülleri onarmak veya uzaklaştırmak için antioksidan özellikte enzimler ve bileşenler içeren antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumunda hücresel hasarlar ve hücre ölümü meydana gelebilir. Kimyasal antioksidanlarda olduğu gibi, hücrelerde etkileşimli bir antioksidan enzim ağı tarafından oksidatif strese karşı korunur (Davies 2000). Ayrıca enzimler, bazı gıda uygulamaları da yeni doğal antioksidan türleri olarak metabolize olmuş oksijeni ve ROS'u uzaklaştırmak, lipit hidroperoksit oluşumunu azaltmak için başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar

Antioksidanlar

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin oksidatif oluşum süreçlerini ve bunların ortaya çıkardığı zararlı etkileri azaltmak için hem gıda sistemlerinde hem de insan vücudunda hayati rol oynayan maddelerdir (Göçer *et al.* 2013). Gıda sistemlerinde de antioksidan yapılar, üretim ve saklama aşamalarında gıda ve farmasötik üretim ürünlerinin bozulmasının en temel sebeplerinden olan lipit peroksidasyon oluşumunun engelleyerek serbest radikalleri temizleyebilir ve bunun sonucu olarak depolama sırasında gıda ürününün lezzet, renk ve dokusunun korunmasına yardımcı olabilirler (Bursal *et al.* 2013). Antioksidanlar, sonuç olarak gıda ürünlerinin raf ömrünü, lezzet, renk, doku gibi duyuşsal veya besleyici nitelikleri üzerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan uzatma gibi benzersiz özelliklerinden dolayı vazgeçilmez bir gıda katkı maddesi grubu haline gelmiştir (Gülçin 2020).

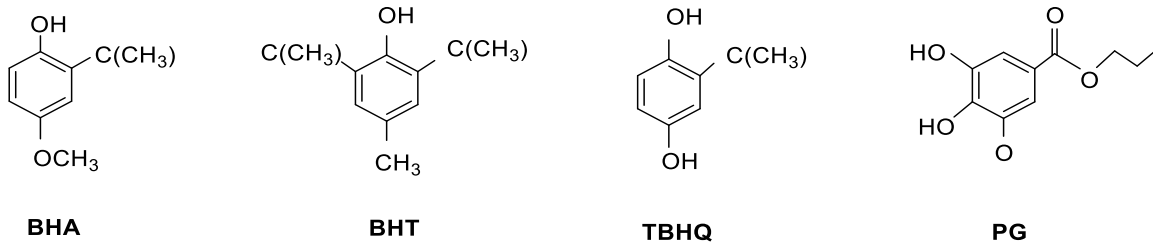
İnsan vücudu için ise antioksidanlar vücudu serbest radikaller ile ROS zararlarından koruyabilen, lipit peroksidasyonu ile çoğu kronik hastalığın oluşum ve ilerleme sürecini geciktiren sonuç olarak oksidatif hasara karşı doğal direncini artırabilen moleküllerdir. Bu nedenle son zamanlarda, güvenilir, doğal ve alternatif gıda antioksidan kaynaklarının belirlenmesine ve özellikle bitkisel doğal antioksidanların ilgi artmıştır (Shahidi *et al.* 2000; Gülçin 2006a). α -Tokoferol, askorbik asit, karotenoidler, aminoasitler, peptitler, proteinler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler gibi gıdalarda bulunan antioksidanlar vücudun oksidatif hasarlarına karşı doğal direncini artırabilirler. Yağlı tohum özlerinden, baharatlardan ve diğer bitki materyallerinden elde edilen doğal antioksidanlar sentetik antioksidanlara göre daha çok ilgi çekicidirler (Gülçin 2010).

Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılabilir. Doğal antioksidanların, yapılan araştırmalarda antibakteriyel,

antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik, antitrombotik ve vazodilatör aktiviteler olmak üzere pek çok biyolojik etkiler sergilediği gözlemlenmiştir (Gülçin 2010). Doğal antioksidanlar organizmalarda doğal bir şekilde bulunan, enzimatik ve nonenzimatik karakterde olmalarına bağlı olarak iki şekilde sınıflandırılan savunma sistemlerindedir (Akagün 2009).

Sentetik antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanların antioksidan aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak ölçümünde standartlar olarak ve gıdalara katkı maddesi olarak geliştirilmiştir. Gıdaların çeşitli işlem ve koşullara dayanabilmeleri ve raf ömürlerini uzatmaları amacıyla gıdalara eklenirler. Hemen hemen tüm işlenmiş gıda ürünlerinde sentetik antioksidanları kullanımın güvenli olduğu bildirilmiş olsa da bazı çalışmalar bunun aksini göstermektedir. Bu sentetik antioksidanlar bilinçli olarak gıda endüstrisinde yıllardır katı ve sıvı yağlar ile lipit içerikli besin maddelerinin işlenmesi ve depolanması aşamasında lipit oksidasyonunun gerçekleşmesini önlemek veya geciktirmek için katkı maddesi olarak ilave edilmektedir. Antioksidanlar için gıda ve içecek pazarının 500 milyar dolar civarında bir sektör olduğu ve yılda %5-7 büyüdüğü ve 2017 yılı boyunca bu oranda büyümesinin beklendiği bildirilmiştir (Shahidi and Ambigaipalan 2015). Yaygın olarak kullanılan Şekil 4’de yapıları görülen primer ya da fenolik sentetik antioksidanlar butillenmişhidroksianisol (BHA), butillenmişhidroksitoluen (BHT), tert-butilhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG) ve oktil galat (OG) gibi galatlardır (Gülçin 2012).



Şekil 4. Yaygın sentetik antioksidanların kimyasal yapıları (Gülçin 2012)

BHA, yağ asitlerinin kısa zincirli olanlarının oksidasyonunu kontrol etmede etkili iken BHT, BHA kadar etkili değildir çünkü moleküle BHA'dan daha büyük sterik engel gösteren iki tertbutil grubu bağlıdır (Nanditha and Prabhasankar 2009). TBHQ, doymamış bitkisel yağlar, yenilebilir hayvansal yağlar ve et ürünleri için oldukça etkili bir koruyucudur. Fakat yapılan birçok araştırma sonuçlarına göre endüstri alanında besinlerin işlenmesi sırasında kullanılan BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanların organizmalarda teratojenik ve karsinojenik etkiler sergilediklerine dikkat çekilmiş ve toksik olmalarından dolayı tartışmanın odak noktasındadırlar. Bundan dolayı bitki orijinli doğal antioksidan çalışmaları son yıllarda

artmış durumdadır (Gülçin 2011). Sentetik ve doğal antioksidanların avantajları ve dezavantajları Tablo 4'te özetlenmektedir (Ames 1993).

Tablo 4. Sentetik ve Doğal Antioksidanların Avantajları ve Dezavantajları

Sentetik antioksidanlar	Doğal antioksidanlar
Yaygın olarak kullanılır	Bazılarının kullanımı sınırlıdır.
Ucuzdur	Pahalıdır
Güvenli değildirler.	Zararsız ve güvenlidirler
Orta ile yüksek arası antioksidan aktivitesine sahiptirler.	Geniş bir aralıkta antioksidan sahiptirler.
Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır.	Kullanımları ve uygulamaları artmıştır
Çözünürlükleri düşüktür.	Geniş bir aralıkta çözünürler.
Bu antioksidanlara ilgi giderek azalmaktadır.	Bu antioksidanlara ilgi giderek artmaktadır.
Bazıları yağ dokusunda depolanır	Tamamen metabolize olurlar.

Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, sentetik antioksidanlara kıyasla daha güvenilir olması ve yan etkilerinin daha az olması gibi nedenlerle son zamanlarda daha fazla tercih edilir duruma gelmişlerdir (Shahidi and Ambigaipalan 2015). Doğal antioksidanlar dışarıdan diyetle besinlerle alınan antioksidanlar ya da organizma tarafından sentezlenen antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Organizmalarda sentezlenen antioksidanların sentezinin çeşitli nedenlerle ve yaş ilerledikçe azalması nedeniyle bu durumun tolere edilebilmesi için bitkisel kaynaklı antioksidanların kullanılabileceği uzmanlar tarafından ifade edilmektedir. En önemli bitkisel antioksidan kaynakları olan meyve ve sebzeler hücrelerin normal şekilde çoğalmalarının düzenlenmesinde ve oksidasyon sonucu meydana gelen hücre hasarını önleyen bir görev üstlenirler (Brown 1999). Diyetle alınan en önemli doğal antioksidanlara örnek olarak askorbik asit, tokoferoller, flavonoidler ve karotenoidler verilebilir. Bunlardan askorbik asit dışındaki antioksidanlar yapısal olarak farklı birçok bileşik bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak karotenoid grubu verilebilir. Karotenoid grubunda sadece %50'si karakterize edilmiş olan 600'den fazla farklı bileşik yapısı mevcuttur. Diyet sırasında tespit ve değerlendirilmesi oldukça zor olan diyetle bulunan farklı bileşikler arasında orkestra gibi düşünülebilen sinerjik bir etki meydana gelebilir (Diplock *et al.* 1998; Gülçin 2012).

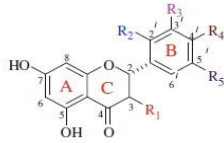
Doğal antioksidanlar neredeyse tüm bitkilerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hayvan dokularında bulunur. Fenolik yapılar ise bitkilerden elde edilen maddeler arasında

yapısal çeşitliliğe ve kimyasal bileşimde farklılıklara sahiptir ikincil bitki metabolitlerdir. Çok amaçlı biyoaktif bileşikler olarak işlev gördüğü bilinen fenolik bileşiklerin çoğu insan diyetinin ayrılmaz bir parçasıdır ve aynı zamanda tıbbi preparatlar olarak insanlar tarafından tüketilirler. Fenolik bileşiklerin sağlığı koruyucu etkilerinin önemli kısmı antioksidan, antikarsinojenik, antimutajenik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve diğer biyolojik özelliklere atfedilmiştir. Bitki fenolik bileşiklerin en önemli grupları arasında fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, lignanlar ve terpenler bulunur (Pokorny 1988; Nazck and Shahidi 2006; Shahidi and Ambigaipalan 2015)

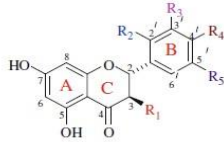
Fenolik asitler, hemen hemen tüm bitki ve bitkisel ürünlerde bulunan, insan diyetinin önemli bir kısmını oluşturan fenolik bileşiklerdir. Diyetteki ortalama günlük fenolik asit miktarı diyet alışkanlıkları ve tercihlerine göre değişmekle birlikte 200 mg civarında olduğu bildirilmiştir (Clifford and Scalbert 2000; Gülçin 2020). Fenolik asitler, bitkilerde serbest halde ya da bağlı şekilde bulunan ve diyet fenoliklerinin yaklaşık %30'unu oluşturur. Fenolik asitler koroner kalp rahatsızlıkları, felç ve kanser gibi hastalıklarda etkili olan tüm bitkisel kaynaklarda ortak olarak bulunan oksidatif flavonoidler, kronik hastalıklara karşı çok etkili antioksidan olan polifenolik bileşiklerdir. Çeşitli bitkilerin yumru, kök, yaprak ve tohumlarından saflaştırılmış 4 000'den fazlası flavonoid yapısında olmakla birlikte toplamda 8 000'e yakın polifenolik bileşik belirlenmiş olup sayıları her geçen gün artmaktadır (Harborne *et al.* 1999). Flavonoidler yapısal olarak Tablo 5'de görüldüğü üzere A, B ve C olarak işaretlenen üç halkalı ve 15 karbonlu flavan yapısından oluşmaktadır (Gülçin 2012).

Tablo 5. Flavonoitlerin Kimyasal Yapısı (Gülçin 2012).

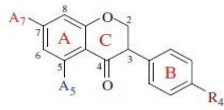
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavones	Apigenin	H	H	H	OH	H
	Chrysin	H	H	H	H	H
	Luteolin	H	H	OH	OH	H
Flavonols	Daiscetin	OH	H	OH	OH	H
	Quercetin	OH	H	OH	OH	H
	Myricetin	OH	H	OH	OH	OH
	Morin	OH	OH	H	OH	H
	Kaempferol	OH	H	H	OH	H



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavanones	Hesperetin	H	H	OH	OCH ₃	H
	Naringenin	H	H	H	OH	H



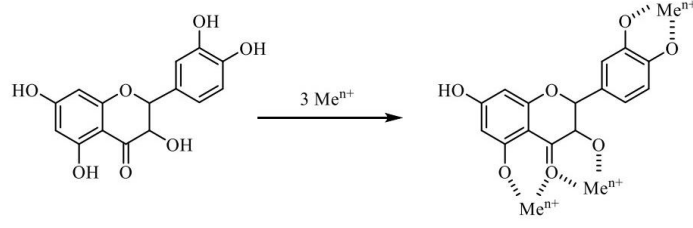
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Flavanonol	Taxifolin	OH	H	OH	OH	H



		A ₅	A ₇	R ₄
Isoflavones	Genistein	OH	OH	OH
	Genistin	OH	Oglc	OH
	Daidzein	H	OH	OH
	Daidzin	H	Oglc	OH
	Biochanin A	OH	OH	OCH ₃
	Formononetin	H	OH	OCH ₃

Flavonoidler diyetimizin başlıca antioksidan bileşenleri arasında olan çok etkin antioksidanlardır. Günlük alım miktarı 100 mg üzerindedir ve düşük yoğunluklarda lipoprotein yapılarının oksidasyonunu engelleyerek kalp veya kan damarı(kardiyovasküler) hastalıklarına karşı koruma sağladıkları bildirilmiştir. Flavonoidlerin önemli faydalarından biride oksidatif hasar oluşumuna karşı koruyucu özellikte olması ve bazı enzimler ile spesifik olarak etkileşim göstererek etkileşim gösterdiği enzimi aktivitesini arttırmasıdır (Rice Evans and Van Acker 1996; Middleton and Kandaswami 1992; Williams *et al.* 2004).

Flavonoidler, oluşumlarındaki aromatik halka yapılarında olan hidroksil grupları ile hidrojen indirgeme reaksiyonlarına girmesi ve sonuçta serbest radikalleri elimine edebilme özelliklerinden dolayı güçlü antioksidan bileşiklerdir. Ayrıca metal şelatlama yeteneğine sahip yapısal grupları ile OH⁻ ve O₂⁻ gibi ROS türlerinin oluşumunu engelleyebilirler (Gülçin 2012).



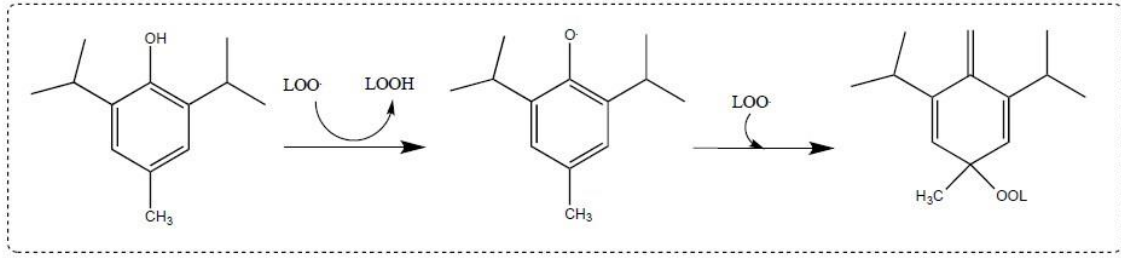
Şekil 5. Flavonoidlere ait metal şelatlama mekanizması (Gülçin 2012)

Krisin, Luteolin, datisetin, kuersetin, mirisetin, morin ve kaemferol sık rastlanan flavonoidlerdendir ve bitkilerdeki flavonoidlerin çoğu glikozitler olarak ortaya çıkar. Flavonoidler lipit peroksidasyonunu engelleme yeteneği hem doğal lipit ürünleri hem de model lipitler oldukları bilinmektedir (Gülçin 2012).

Antioksidanların etkisi

Son yıllarda antioksidanların vücuttaki önemi organizmaların veya dokuların veya cansız sistemlerin korunması oksidatif strese karşı belirgin hale gelmiştir. Bu değerlendirme çeşitli fizyoloji, farmakoloji, beslenme ve gıda işleme alanlarında yapılan çalışmalarla desteklenmektedir. Gıda açısından bakıldığında, antioksidanlar, gıdalarda oksidasyon sonucu meydana gelebilen acılaşıma veya diğer lezzet bozulmalarının gelişimini geciktirebilir veya önleyebilir herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Antioksidanlar indüksiyon süresini uzatarak kötü tatların gelişimini geciktirir (Taslimi *et al.* 2018).

Serbest radikaller üzerindeki etki biçimlerine göre antioksidanlar birincil antioksidanlar ve ikincil antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Birincil antioksidanlar, oluşmuş olan radikallerle reaksiyona girerek bu radikallerin daha zararlı olmalarını önleyen ayrıca yenilerinin de oluşumunu engelleyen α -Tokoferol gibi fenolik bileşiklerdir. İkincil antioksidanlar ise; serbest oksijen radikallerini sönmüleme ve metal şelatlama da dahil olmak üzere radikal olmayan oksijen türlerini hidroperoksit yapılarına dönüştürme özelliklerine sahip bir mekanizmayla radikali giderir. Antioksidan maddelerin antioksidan yetenekleri sadece onların yapısal özellikleri ve girdiği reaksiyonlar ile sınırlı değildir. Bunun yanında konsantrasyon, fiziksel şartlar (sıcaklık, ışık seviyesi, sistemin yüzey özellikleri), oksidan olarak hareket eden çok sayıda mikro parçalar ve aynı yönde etki gösteren yapılar(sinerjistler) gibi birçok faktörde antioksidan kapasiteleri üzerine etki etmektedirler (Gülçin 2012). Yani bazı antioksidanlar uygun şartlar altında iyi bir antioksidan aktivite gösterebilirken, sıcaklık değişimi ve UV ışınlarının bulunduğu ortamlarda ve zincir reaksiyonları esnasında antioksidan etki yerine oksidan etki gösterebilir yani serbest radikal oluşumunu tetikleyebilirler. Şekil 6'de BHT'nın lipit peroksidasyonunu önleme mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 6. BHT'nin lipit peroksi radikalini giderme mekanizması (Gülçin 2012)

İnsan vücudunda meydana gelen metabolik reaksiyon ve aktiviteler sonucunda serbest radikaller (O_2^- , H_2O_2 , O_2 ve azot radikalleri gibi ROS ve RNS) oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu radikaller günümüzde kanser başta olmak üzere, Alzheimer, Parkinson gibi çeşitli kronik hastalıkların sebebidir (Davies 2000; Finkel and Holbrook 2000; Gülçin 2012). Oluşan bu serbest radikallerin oluşumunu engellemek ya da etkisiz hale getirebilmek için antioksidan sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için insan vücudunda oksidan-antioksidan dengesini sağlayan bir sistem vardır. Ancak bu denge sisteminde meydana gelebilecek bir bozulma sonucu oksidatif stres oluşumuyla sıkıntılar oluşmaya başladığı için dışarıdan antioksidan takviyesi son zamanlarda daha da önem kazanmıştır.

Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan yapıda olan bütün maddelerin etki mekanizması farklı şekillerde olabilir (Gülçin 2012). Antioksidanlar serbest oksijen radikalleri üzerine etki ederek veya onları tutarak daha zayıf yeni moleküllere çevirerek toplayıcı bir etki mekanizması ile etkisini gösterebilir. Ayrıca antioksidanlar serbest radikallerin oluşturdukları zararın giderilmesi durumu ile de onarıcı bir etki gösterebilirler. Antioksidanlar bastırıcı bir etki ile etkilerini gösterebilirler. Bastırıcı etkilerini serbest oksijen radikalleri ile etkileşim göstererek vermiş olduğu hidrojen ile aktivitelerini azaltarak ya da inaktif hale getirerek gösterebilirler. Vitaminler, flavanoitler bu tarz bastırıcı bir etkiye sahiptirler. Antioksidanlar, mineraller, seruloplazmin ve hemoglobin de olduğu gibi serbest oksijen radikallerini bağlayarak ya da bağlarını kırarak fonksiyonlarını zincir kırıcı bir etki ile gösterebilirler.

Antioksidanlar vücutta savunma faktörü olarak etkisini gösterebilir ve aynı zamanda hücrel redoks durumunu ayarlar ve redoks sinyal transdüksiyonunu etkinleştirir. Günümüzde, yukarıda da belirtildiği üzere farklı sentetik antioksidanlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların kullanımı, toksik ve kanserojen etkileri üzerindeki şüpheler nedeniyle yasalar tarafından kısıtlanmıştır. Bu nedenle karotenoidler, flavanoitler, α -Tokoferol, A, C ve E vitaminleri gibi doğal antioksidan kaynaklarına yönelim insan sağlığına yararları ve gıda

koruma açısından önemleri nedeniyle giderek artmış ve antioksidanların doğal kaynaklarının keşfine yönelik çabalara hız verilmiştir (Gülçin 2006a, 2007, 2010).

Yaygın Kullanılan Antioksidan Metotlar

Gıda bileşiklerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi yani antioksidan aktivitenin ilkesi, serbest radikali nötralize edecek bir elektronun varlığına dayanmaktadır. Ayrıca antioksidan aktivite fenol halkasındaki hidroksilasyon düzeni doğası ve sayısı ile ilişkilidir. Hidrojen verici olarak davranması ve oksidasyonu inhibe etmesi, aromatik halkadaki OH gruplarının sayısının artmasıyla alakalıdır ve hidroksil gruplarının sayısı artıkça bu durum artmaktadır.

Son yıllarda antioksidan maddelere artan ilginin sonucu olarak bilim adamları bu alanda daha çok araştırma ve çalışma yapmaya yönelmiştir. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan antioksidan metotlar Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi, CUPRAC metodu ile kuprik iyonları (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, FRAP metoduna göre indirgeme kapasitesi, ABTS \cdot^+ giderme, DPPH \cdot giderme, DMPD \cdot^+ giderme aktiviteleri, ferrozin ve bipiridil reaktifleri ile ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktiviteleri ve ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini metotlarıdır.

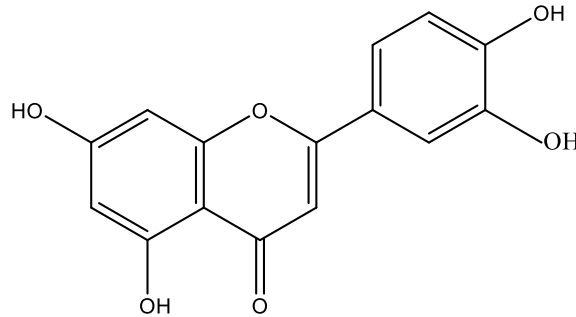
Fenolik Yapılar ve Flavonoitler

Meyve ve sebze tüketen bireylerde, kronik rahatsızlıkların en ciddi olanı koroner ateroskleroz da dahil bu bireylerde görülme oranının oldukça az olduğu bildirilmiş ve meyve sebze tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (Rimm *et al.* 1996a, b). Epidemiyolojik çalışmalar da aynı şekilde kronik kalp ve kanser hastalıkları gibi ilerleyen yaşlarda daha sık görülen hastalıkların, meyve ve sebze tüketimi ile mortalitelerinin düşüşünde etkili olduğunu göstermiştir (Ganesan *et al.* 2011; Eberhardt *et al.* 2000). Doğal meyve ve sebze kaynaklarının sağlık açısından faydalı olan en temel biyoaktif bileşikleri fenolikler yapılar ve flavonoitlerdir (Bocco *et al.* 1998). Fenolik açıdan zengin bitkilerin antioksidan özellikleri, düşük seviyelerdeki lipoprotein kolesterolün okside olmasında etkili inhibitörlerdir (Eberhardt *et al.* 2000). Sonuçta, meyve ve sebze tüketimi, koroner ateroskleroz görülme oranını düşürmektedir (Rimm *et al.* 1996a). Fenolik bileşiklerde içermiş oldukları aromatik halkalar sayesinde biyolojik olarak aktifler ve doğada doğal olarak buldukları bitkisel gıdaları lezzet, renk ve dokusal özelliklerin çoğunu sağlayan kısımlarını oluştururlar. 3-etilfenol ve 3,4-dimetilfenol gibi bir aromatik (fenolik) halkaya sahip olan, meyve ve tohumlarda bulunan fenoller monofenoller olarak adlandırılırlar. Monofenoller kafeikasit, ferulik asit içeren hidroksisinnamik asit, katekin içeren flavonoitler ve glikozitleri, proantosiyanidinler, antosiyaninler ve flavonollerdir.

Bitkilerin içermiş oldukları doğal antioksidanlar çoğunlukla fenolik yapılardır ve en önemlileri grupları flavonoidler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bitkilerin en yaygın bileşenlerini oluşturan tespit edilmiş grup flavonoidlerdir. Flavonoidler bitkilerin kök, sap, yaprak, meyve veya tohum gibi tüm kısımlarından izole edilmişlerdir. Yaklaşık 4.000'den fazlasını flavonoidlerin oluşturduğu 8.000'den fazla polifenolik yapı bildirilmiştir ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir. (Harborne *et al.* 1999; Beecher 1999). Flavonoidler, aromatik yapıdaki amino asitlerden (fenilalanin ve tirozin ile malonattan) çıkarak bitkilerde sentez edilir. (Harborne 1986). Normal bir insan diyeti için günlük fenolik madde alımı ortalama 1 g'a kadar yükselir, ancak normal diyetdeki tanımlanmış flavonoidlerin miktarı ortalama olarak günlük 10-30 miligramdan fazla değildir (Pokorny *et al.* 2000).

Luteolin

Luteolin, bitkilerin içermiş olduğu en yaygın flavonoidlerden olup başlıca kerevizde, yeşilbiberde, maydanozda, perilla yaprağında ve papatya çayında bol miktarlarda bulunur (Shimoi *et al.* 1998) Antioksidanların insan vücudunda, serbest radikal temizleyici, inflamasyon önleyici ajan, karbonhidrat metabolizma promotörü ve bağışıklık sistemi modülatörü olarak işlev gördükleri düşünülmektedir. Luteolinin bu özelliklerin yanı sıra, kanserin gelişmemesinde de önemli bir işlevinin olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak çoğu araştırma deneyi, Luteolinin, inflamasyon ve septik şok semptomlarını önemli ölçüde giderebilen biyokimyasal bir ajan olduğunu göstermiştir (Jang *et al.* 2008).



Şekil 7. Luteolin'in açık kimyasal yapısı

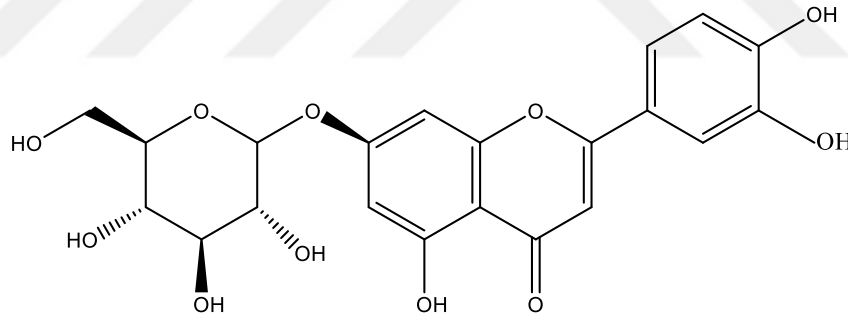
Yine bir diğer makalede Luteolin referans olarak alınabilecek olan bir diğer flavonoid yapısında olan Kuersetinden daha az pro-oksidan potansiyeli olan, ancak çalışma sonucuna göre daha güçlü güvenilirlik yeteneğine sahip olan doğal bir antioksidan olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca vitamin benzeri diğer antioksidan yapılarla etkileşebileceği ve daha karışık biyolojik sistemlerde test edilmiş ve sonuç olarak Luteolinin mükemmel radikal süpürücü olduğu ve sitoprotektif yetenekleri olduğu tespit edilmiştir (Seelinger *et al.* 2008)

Luteolin C5, C7, C3 've C4' pozisyonlarda dört hidroksil grubu taşıdığı için, birçok Luteolin türevi mevcuttur ve oluşturulabilir. Bu hidroksil grupları yerine farklı fonksiyonel gruplar ve / veya şeker molekülleri bağlanabilir. Sonuç olarak yapısal olarak benzer ancak farklı moleküller oluşabilir. Luteolinin en bilinen türevleri C ve O glikozitleri ve metil türevleridir (Narayana *et al.* 2001; Harborne *et al.* 1999)

Sinarozit (Luteolin-7-O-glikozit)

Sinarozit, antioksidan özelliği net bir şekilde tespit edilmiş flavonoidlerden biridir (Rice Evans *et al.* 1996). Sinarozit, çoğu tıbbi bitkinin doğal olarak yapısında bulunan Luteolin-7-O- β -D-glikozittir ve gerçekleştirilmiş laboratuvar ortamı (*in vitro*) deneyleri, Sinarozitin oksijensiz radikalleri temizlediğini ve düşük konsantrasyondaki lipoprotein oksidasyonunu azaltmada etkili olduğunu göstermiştir (Brown and Rice-Evans, 1998; Wu *et al.* 2005).

Yine izole sıçan kalplerinde yapılan bir araştırmaya göre Sinarozit'in antioksidatif özelliklerle ilişkili olabilecek anti-iskemik etkiler gösterdiğini tespit edilmiştir (Rump *et al.* 1994). Bu çalışmada da Quercetin (oksidatif stres ile bağlantılı olan kardiyak miyosit apoptozisine üzerine güçlü bir koruma etkisine sahip, daha önce çalışılmış flavonoid yapılarından), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Han *et al.* 2008).



Şekil 8. Sinarozit'in açık kimyasal yapısı

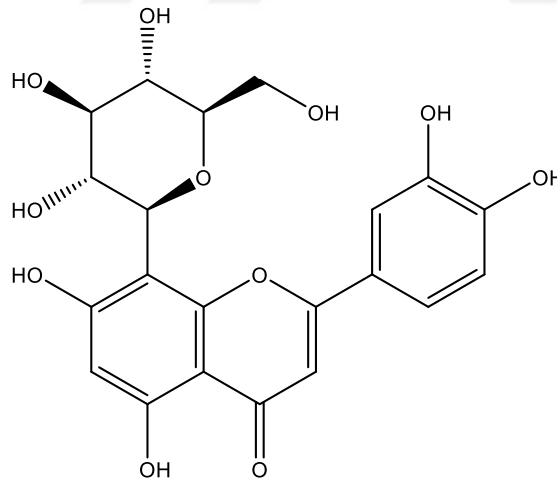
Karanfilgiller familyasından *G. tenuifolia* ve onun ana bileşeni Sinarozit'in (Luteolin-7-O-glukozit) etanol özütlü üzerine yapılan bir çalışmada da DPPH, süperoksit ve hidroksil radikallerini giderici etkisi olduğu görülmüştür. Yine, bakır sebebiyle oluşturulmuş düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu, azalmış elektroforetik hareketlilik ile malondialdehit ve konjüge dien oluşumu ile *G. tenuifolia* ve Luteolin-7-O-glukozit bastırmıştır. *G. tenuifolia* ve Sinarozit insan kan hücrelerinde (polimorfonükleer nötrofillerinde ve periferik mononükleer) N-formil-metiyonil-lösil-fenilalanin sebebiyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma sonucunda, *G. tenuifolia* ve Sinarozitin potansiyel reaktif oksijen türü temizleyicileri olduğu ve insan kan hücrelerinde (lökositler) LDL

oksidasyonunu veya ROS üretimini engelleyerek ateroskleroza önleyebilecekleri tespit edilmiştir (Ming-Jiuan *et al.* 2005)

Sinarozit üzerine yapılan diğer bir araştırmada antioksidatif özelliklere sahip bir flavonoid türü olduğu bildirilmiştir. Bu sonuca H9c2 kardiyomyoblast hücre hatlarında yapılan, Sinarozit'in H₂O₂ sebepli oluşturulmuş programlı hücre ölümü (apatoz) üzerine koruyucu etkisi araştırmalarında varılmıştır. H₂O₂ ile tedavi sonucunda Annexin V FITC / PI boyanması ve kaspaz proteaz aktivasyonu yoluyla hücre nükleer morfolojisinin analizi ile ortaya çıkan apoptozun eşlik ettiği H9c2 hücrelerinde ciddi yaralanmalara neden olduğu gözlenmiştir. Araştırmada H9c2 hücreleri, ilk aşamada 4 saat boyunca Sinarozit ile muamele edilmiş sonrasında 6 saat süre ile 150 µM H₂O₂ ile etkileştirilmiştir. Sinarozit ön işleminde, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazın endojen anti-oksidatif aktivitesini artırarak apoptotik hızı önemli ölçüde azaltmış ve böylece hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu inhibe edilmiştir (Xiao Sun *et al.* 2005)

Orientin (Luteolin-6-C-glikozit)

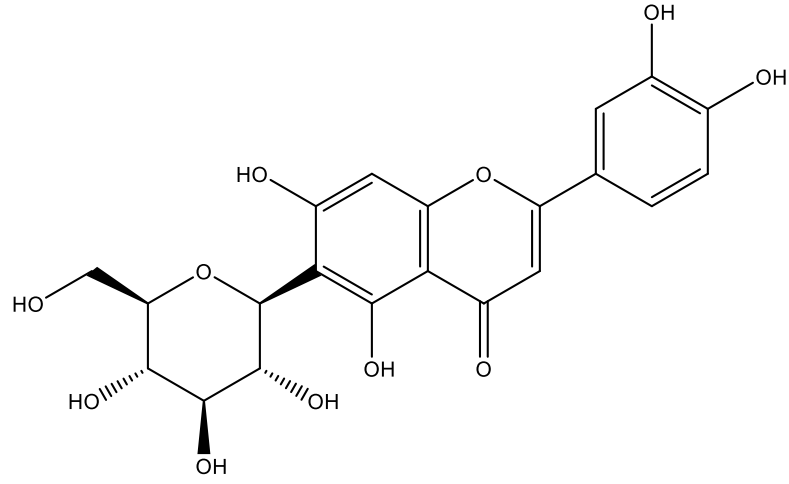
Passiflora mantarından, darıdan ve bambu yaprakları gibi bitkilerden ekstrakte edilebilen Orientin bir flavonoid C-glikozittir (Tian *et al.* 2018). Orientin, kanser ve inflamasyon önleyici antioksidan özellikte olan bir flavonoiddir (Czemplik *et al.* 2016).



Şekil 9. Orientin'in açık kimyasal yapısı

İzoorientin (Luteolin-8-C-glikozit)

Phyllostachys ve Patrinia gibi çeşitli bitkilerden ekstrakte edilebilen İzoorientin, insan diyetinde de yer almaktadır. İzoorientin, antioksidan, anti-nosiseptif ve antiinflamatuvar etkiler gibi çeşitli fizyolojik özelliklere sahiptir (Yuan *et al.* 2013).



Şekil 10. İzoorientin'in açık kimyasal yapısı

Moleküler Simülasyon Yerleştirme

Biyoinformatik kimyası, teknolojik ve bilişimsel gelişmelerin neticesinde büyük oranda etkilenen bir alandır ve yeni ilaç ve aktif maddelerin tasarımında yaygın olarak kullanımı artmaktadır (Kaya *et al.* 2016). Teorik olarak, biyoinformatik kimyada yeni ilaçların ve aktif maddelerin tasarımı için farklı programlar vardır. Moleküler simülasyon yerleştirme programı da bu amaçla geliştirilen programlardandır (Taslimi *et al.* 2021).

Çalışmanın Amacı

Reaktif oksijen türleri eğer ortamda yeterince antioksidan bulunmazsa lipitler karbohidratlar, proteinler ve DNA başta olmak üzere önemli biyolojik moleküllerin yapılarını bozarak kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir. Doğal antioksidanların kullanımı hastalıkların oluşma riskini profilaktik bir etki göstererek bu düşürmektedir. Doğal ve gıda kaynaklı antioksidan özellikleri sahip olan bitkilerin tespit edilme ihtiyacından dolayı son yıllarda bunlara olan ilgi oldukça artmıştır (Prieto *et al.* 1999; Gülçin *et al.* 2009a; Gülçin 2006b; 2007).

Bu çalışma kapsamında en yaygın flavonlardan olan Luteolin ve Luteolin glikozitleri'nin (Luteolin, Luteolin-7-*O*-glikozit, Luteolin 6-*C*-glikozit, Luteolin 8-*C*-glikozit) 1,1-difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme aktivitesi, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi, N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi, FRAP reaktif indirgeme aktivitesi, Fe³⁺ indirgeme kapasitesi, Cu²⁺ indirgeme kapasitesi metotları ile antioksidan kapasiteleri belirlenerek insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) ile asetilkoliesteraz, butirikolinesteraz, α -Glikozidaz gibi metabolik enzimler üzerine inhibisyon etkileri deneysel ve teorik (moleküler doking) olarak araştırıldı. Çalışma

sonuçlarının tedavi amaçlı kullanılacak ilaçların dizaynı ve farmokolojik uygulamaları için önemli bir katkı sağlayacağı düşünmektedir.



KURAMSAL TEMELLER

Serbest radikaller normal metabolik süreç esnasında canlı organizmalar da sürekli olarak oluşabildiği gibi güneş ışınları, sigara, radyasyon, çevre kirliliği gibi ekzojen etmenler de serbest radikallerin oluşumuna birer sebeptir. Dış orbitallerinde ortaklaşmamış elektron bulunduran atom, atom grupları veya moleküller olan serbest radikaller kararsız bir yapı gösterdikleri için ömürleri çok kısadır ve etrafındaki moleküllerle bir an önce etkileşime girerek kararlı hale gelmek isterler. Bu nedenle karbohidratlar, lipitler, proteinler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere birçok belirleyici biyomoleküler zarar verebilme potansiyeline sahiptirler. Sonuç olarak serbest radikaller oksidatif stres, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite, immün yetmezlik gibi birçok kronik bozukluklar için önemli bir etken olarak kabul edilmiştir. Antioksidanlar ise serbest radikallerin toksik etkilerini yok etmek ya da azaltmak için her zaman ihtiyaç duyulur kaynaklardır (Gülçin *et al.* 2012; 2020).

Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile alınabilen, hücre yıkımını azaltarak hücrelerin tümör oluşturma eğilimlerini ortadan kaldıran böylece yaşam kalitesini artıran maddelerdir. Baharatlar, şifalı bitkiler, çaylar, yağlar, tohumlar, tahıllar, hububatlar, meyveler, sebzeler, enzimler, proteinler doğal antioksidan kaynakları iken BHA, BHT, PG ve TBHQ gıdalarda en fazla kullanılan sentetik antioksidanlar olarak sayılabilmektedir. Günümüzde sentetik antioksidanların yüksek stabilite, yüksek etkinlik ve daha ucuz olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın kullanım alanı olmasına rağmen güvenilirlikleri üzerinde artan endişelerden dolayı bitkilerden doğal antioksidanların elde edilmesi büyük önem kazanmıştır. Doğal antioksidan kaynağı olan bitkilere ilginin fazlaca artması neticesinde, aromatik bitki ve uçucu yağların içerisindeki bazı aktif maddelerin güçlü antioksidan etki gösterdiği gerçeği ortaya çıkmıştır (Gülçin 2012).

Günümüze kadar farklı kaynaklardan saflaştırılan veya saf maddelerin antioksidan ve radikal giderme aktiviteleri yoğun bir şekilde araştırılmıştır ve araştırılmaya da devam edilmektedir. Bu çalışmalara örnek olarak; mantar çeşitlerinden (*Morchella vulgaris* ve *Morchella esculanta*) (Elmastaş *et al.* 2006), saçak ağacından lignanlar (*Chionannanthus virginicus*) (Gülçin *et al.* 2006), işgin (*Rheum ribes*) (Oktay *et al.* 2007), kurkumin (Ak and Gülçin 2008), karnabahar (*Brassica oleracea*) (Köksal and Gülçin 2008), melatonin ve serotonin (Gülçin 2008), türk meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*) (Tohma and Gülçin 2010), kiraz sapı (*Cerasus avium*) (Bursal *et al.* 2013), karanfil yağı (Gülçin *et al.* 2012), su mercimeği (*Lemna minor*) (Gülçin *et al.* 2010), resveratrol (Gülçin 2010), melisa (*Melissa officinalis*) (Köksal *et al.* 2011), devedikeni (*Onopordum illyricum L.*) (Topal *et al.* 2016), zencefil (*Zingiber officinale Rosc.*)

(Tohma *et al.* 2017), seçilmiş flavonoidler ve fenolik bileşikler (Huyut *et al.* 2017), türk kekiği (*Thymus vulgaris*) (Köksal *et al.* 2017), usnik asit (Çakmak and Gülçin 2019), tarçın (*Cinnamomum verum*) kabuğu (Gülçin *et al.* 2019), keten tohumu (*Linum usitatissimum L.*) kabuğu (Han *et al.* 2018), olivetol (Taslimi and Gülçin 2018), pennyroyalin (*Mentha pulegium*) (Gülçin *et al.* 2020), avakodo (*Folium perseae*) (Köse *et al.* 2020), adaçayı (*Salvia pilifera*) (Gülçin *et al.* 2019), *Stachys annua* (Bursal *et al.* 2020), M(II)-Shiff baz ligant kompleksleri (Buldurun *et al.* 2021), dağ nanesi (*Cyclotrichium leucotrichum*) (Gülçin *et al.* 2022), lignanlar (Köse and Gülçin 2021), bir endemik bitki olan (*Ferula orientalis L.*) (Kızıлтаş *et al.* 2021), geven (*Astragalus brachycalyx*) (Kızıлтаş *et al.* 2021), tüylü gündüz sefası (*Convulvulus betonicifolia*) (Bingöl *et al.* 2021), kinkor (*Ferulago stellata*) (Kızıлтаş *et al.* 2021), endemik *Tanacetum erzincanense* (Yapıcı *et al.* 2021) çalışmaları veririlebilir.

CA izoenzimleri su ve karbondioksiti (CO₂) kullanarak bikarbonat (HCO₃⁻) ve protona (H⁺) geri dönüşümlü olarak hidrasyonunu sağlayan, pH kontrolü, fotosentez ve solunum dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve fizyolojik süreçlerde yer alan, enzimatik aktiviteleri için gerekli olan aktif alan boşluğunda Zn²⁺ içeren metaloenzimlerdir (Akıncıoğlu *et al.* 2013; Aksu *et al.* 2013, Burmaoğlu *et al.* 2021).

İlk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmış karbonik anhidraz, sonrasında bitki, maya ve bakterilerden de CA rapor edilmiş ve kısmi olarak karakterize edilmiştir (Maren 1967; Supuran and Scozzafava 2000; Krungkrai *et al.* 2001). Memelilerden saflaştırılan CA'nın molekül kütlesinin 30 kDa olduğu, bitkilerden saflaştırılan CA'nın molekül kütlesinin 160-260 kDa aralığında ve hegzamerik yapıda olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984).

Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi tekniği kullanılarak keçi karaciğer dokusundan %68 verimle 125 kat oranında CA enzimi saflaştırıldığı literatürde mevcuttur (Çağlayan and Gülçin 2018). Aynı teknik kullanılarak van gölü balıkları üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışma da ise balıkların salungaçlarından %42 verimle 116 kat oranında CA I izoenzimi, %7 verimle 42 kat oranında CA II izoenzimi saflaştırılmıştır (Kuzu *et al.* 2018). Diğer bir çalışmada ise insan eritrositlerinden afinite kromatografisiyle %60 verimle 273 kat oranında CA I izoenzimi, %48 verimle 819 kat oranında CA II izoenzimi saflaştırıldığı belirtilmiştir (Bingöl 2016).

Birer metaloenzim olan CA'lar prokaryotlar olsun ökaryotlar olsun her ikisinde de bulunan, fizyolojik olarak birçok işlemin düzenlenmesinde önemli rolleri vardır. Örneğin glokom hastalığı, optik sinir uçlarında belirgin bir değişikliğe ve görme alanı kaybına sebep olan, kronik ve ilerleyici, yüksek göz içi basıncı ile karakterize, dejeneratif bir göz hastalığıdır. Optik sinirlerde ilerleyen hasar neticesinde körlükle sonuçlanabilir. Yapılan çalışmalar

sonucunda CA izoformları, göz içi basıncını düşürerek glokomu kontrol edebilen metalo enzimler olarak belirlenmiş ve insan gözünde CA I, II ve IV izoformlarının yaygın olarak dağıldığını CA I ve II'nin yalnızca kornea endotelinde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. CA'ların ilaç dizaynında hedef olarak belirlendiği rahatsızlıklar glokom epilepsi, uyku apnesi ve yüksek irtifa gibi hastalıklardır olduğu bildirilmiştir (Mishra *et al.* 2020). CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleri arasında asetazolamit, brinzolamit, dorzolamit gibi bazı sülfonamit türevi yapısındaki ilaçlar sayılabilir. Ancak yan etkileri nedeniyle kullanılan bu inhibitörleri içeren bu ilaçlar yerine daha güçlü ve daha az yan etkiye sahip yeni CA inhibitörlerinin araştırılması, sentezlenmesi ve biyolojik aktivite çalışmalarına devam edilmektedir (Akıncıoğlu *et al.* 2013).

Alzheimer, hafıza bozukluğu, bilişsel işlev bozukluğu, davranış bozuklukları ve günlük yaşam aktivitelerinde eksiklikler ile karakterize kronik bir nörolojik bozukluktur. AD tedavisi için kullanılan temel ilaçlar kolinesteraz inhibitörleridir. Bu amaçla semptomatik AD tedavisi için ilk olarak kullanılan lisanslı kolinesteraz inhibitörü Takrindir. Takrinin hepatotoksitesinden dolayı donepezil, rivastigmin ve galantamin gibi kolinesteraz inhibitörleri kullanılmaktadır (Marucci *et al.* 2021). Asetilkolinesteraz enzimi, beyin ve otonom sinir sisteminin kolinerjik sinaps kısımlarındaki asetilkolinin, asetil ve koline hidrolizini katalizler. Bütirikolinesteraz ise, AChE'in yedeği olarak sinaptik aralığın dışına yayılan asetilkolini hidrolizleyerek iş görür ancak BChE'in beyindeki rolü tam olarak açıklanamamış hala belirsizliğini korumaktadır (Gülçin *et al.* 2017).

Kolinesteraz inhibitörleri ile ilgili olarak literatürde birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde sentezlenmiş olan nitrojen bazlı heterosiklik bileşiklerin μM konsantrasyonda AChE enzimi üzerine inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (Gülçin *et al.* 2022). Diğer bir çalışmada AChE ve BChE enzimleri üzerine birer fitoöstrojen ve polifenolik bileşik olan kumestrol'ün inhibisyon etkileri incelenmiştir (Durmaz *et al.* 2022). 4-Dimetilamino salisilaldehit temelli tiyosemikarbazon bileşiğinin kolinesterazlar üzerindeki inhibisyon etkisi Alzheimer hastalığı tedavisi için ilaç geliştirmede umut verici sonuçlar göstermiştir (Hashmi *et al.* 2021).

Çok faktörlü küresel sağlık problemlerinden biride diabet mellitustur ve endişe verici oranlarda da yaygınlaşmaktadır. Bağırsaklarda nişasta hidrolizini kataliz eden α -Glikozidaz ve α -Amilazı enzimleri özellikle Tip 2-diyabetle ilişkili hiperglisemiyi kontrol etmek için etkili bir terapötik yaklaşıma sahiptir. Ancak akarboz, miglitol ve vogliboz, bu enzimler için onaylanmış sınırlı sayıdaki inhibitörlerdir ve glukoz emilimini geciktirse de istenmeyen gastrointestinal yan etkilere sahiptirler. Sonuç olarak çalışmalar etkinliği daha fazla olan, yan etkileri daha az olan

yeni inhibitörler aramaya yönelmiş ve bitkisel kökenli doğal ürünler, daha az toksisiteye sahip olan değerli terapötik ajan kaynağı olmuşlardır (Dirir *et al.* 2021).

Yapılan bir diğer çalışmada ise pu-erh çayının α -Amilaz ve α -Glikozidaz üzerinde inhibitör etkisi incelenmiş ve enzimleri iyi derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yang *et al.* 2019). Gülçin ve arkadaşları tarafından da bazı doğal antioksidan bileşiklerin bu enzimler üzerindeki inhibitör etkileri araştırılmış ve sonuçlar bu enzimlerin inhibitörü olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Gülçin *et al.* 2018). Diarilmetanon, bromofenol ve diarilmetan bileşiklerinin α -Amilaz ve α -Glikozidaz inhibitörleri olabileceğine yönelik yapılan bir diğer çalışmada ise, bu bileşiklerinde fonksiyonel hiperglisemide terapötik olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir (Taslimi *et al.* 2018).

Luteolin, çeşitli meyve ve sebzelerde hem aglikon hem de glikozitleri şeklinde bol miktarda bulunan önemli bir biyoflavonoiddir (Lopez-Lazaro 2009). Luteolin; brokoli, kereviz, soğan yaprağı, maydanoz, havuç, lahana, biber ve krizantem çiçekleri gibi farklı sebzelerde bulunan temel gıda temelli fitokimyasallardan biridir. Örneğin meyvelerde elmanın kabuğu zengin bir Luteolin kaynağı olarak kabul edilir (Mencherini *et al.* 2007). Luteolin bol bitkiler, iltihaplanma, kanser ve hipertansiyon rahatsızlıkları için Çin geleneksel ilaçlarının üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Selvi *et al.* 2015). Çoğunlukla belli grup sebzelerde bulunan Luteolin kaynakları; radichoio, 37,96 mg/100 g ile önemli bir Luteolin kaynağıdır, ardından 34,87 mg/100 g Luteolin içeren ham Çin kerevizi gelir. Otlar arasında kekik, 1.028,75 mg/100 g ile en yüksek içeriğe sahip en iyi Luteolin kaynağıdır. Meyveler ve bitkiler söz konusu olduğunda, kabuksuz çiğ limon ve taze adaçayı, sırasıyla 1,50 ve 16,70 mg/100 g Luteolin içeren önemli Luteolin kaynaklarıdır (Lin *et al.* 2008).

Başka bir çalışmada da taze ve kurutulmuş enginar (*Cynara scolymus* L.) yapraklarında Sinarozit (Luteolin 7-O-glukozit) araştırılmıştır. Ve ekstrakte edilebilir Sinarozit, 35 °C'de kurutulan enginar yapraklarında özellikle yüksek olduğu tespit edilmiştir (Nüblein *et al.* 2000).

Orientin (Luteolin-8-C-glukozit), biyoaktif bir C-glikosil flavon fesleğen, çarkıfelek meyvesi, bambu yaprağı, gündüz çiçeği ve güvercin bezelye yapraklarında bolca bulunur (Lam *et al.* 2016). İzorientin de yaygın bir C-glikosil flavon, glikozittir ve yılan otu, kuzukulağı, şeker otu ve hayıt ağacı gibi birçok farklı bitki türünde bulunduğu rapor edilmiştir (Harborne, 1994). İzorientin içinde antioksidan olarak işlev görme konusundaki olağanüstü yeteneği doğrulanmış ve çeşitli serbest radikal kaynaklı hastalıklara karşı koruma sağlayan bir antioksidan olabileceği ifade edilmiştir (Ko *et al.* 1998).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde adı	Kaynak
Neokuprin	Sigma Aldrich
Luteolin	”
Sinarozit	”
Orientin	”
İzoorientin	”
Bütiriltiyokoliniyodat	”
Butirilkolinesteraz	”
Asetiltiyokoliniyodat	”
Asetilkolinesteraz	”
α -Amilaz	”
α -Glikozidaz	”
4-Nitrofenil β -D-glikopiranozit	”
5,5'-Ditiyo-bis(2-nitro benzoik Asit (DTNB)	”
Siyonojen bromür	”
L-Tirozin	”
Coomassie parlak mavi G-250	”
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	”
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	”
Sodyum sitrat	”
Na ₂ SO ₄	”
NaHCO ₃	”
NaClO ₄	”
Na ₂ CO ₃	”
NaHCO ₃	”
Na ₂ HPO ₄	”
CH ₃ COONa.3H ₂ O	”
1,1-Difenil-2-pikril-hidrazil radikali (DPPH·)	”

Trikloroasetik asit (TCA)	”
%96’lık etanol	”
Aseton	”
Hidroklorik asit	”
Asetik asit	”
Neokuprin	”
ABTS	”
DPPH· radikali	”
DMPD	”
2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	”
Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)	”
Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)	”
α-Tokoferol	”
Troloks (FeCl ₃ .6H ₂ O)	”
Potasyum ferrisiyanür (K ₃ Fe(CN) ₆)	”

Yararlanılan alet ve cihazlar

Kullanılan alet ve cihazlar	Marka
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Soğutucular (-86- +4 °C)	Sanyo/ Samsung (Japonya)
Etüv	Philips Harris Ltd. Shenstone England
Hassas tartım ekipmanı	Mettler Toledo Balance XPR404S
Isıtıcı tablalı mıknatıslı karıştırıcı	Daihan
Otomatik pipet	Thermo Scientific Finnpiette
pH-metre	Hanna HI 9321,SN 396202
Saf su cihazı	Firstream Calypso
Ultrasonik banyo	Soltec Sonica ® 2200ETH N A99-00634
Ultraviyole-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ ’lük Kuartz küvet, 3 cm ³ ’lük cam küvet
Ultraviyole-Görünür Spektrofotometre	Shimadzu/ Ultraviyole-1280
Vorteks	IKA Vortex 1 Tüp Karıştırıcı 2800 rpm

Kullanılacak Çözeltiler ve Hazırlanışları

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler

DPPH• çözeltisi (1 mM): Işıktan korunmuş karanlık ortamda kaplanmış erlen içerisine 0,025 mg DPPH tartıldı, 100 mL %96'lık etanol eklenerek manyetik karıştırıcıda 16 saat boyunca karıştırılarak hazırlandı. Böylece 1 mM'lık radikal çözeltisi elde edildi.

Fe³⁺ indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili kullanılan çözeltiler

1. Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ tamponu (pH 6,6/0,2 M): 2,8 g Na₂HPO₄ tartıldı, 180 mL saf su içerisine ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda Na₂HPO₄ çözüldü. pH ölçer kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim 200 mL'ye saf su ile tamamlandı.

2. K₃Fe(CN)₆ çözeltisi (%1): 3 g K₃Fe(CN)₆ tartıldı az miktar saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 300 mL'ye tamamlanarak çözelti hazırlandı.

3. TCA çözeltisi (%10): 30 g TCA tartılıp az miktar saf suda çözüldü, saf su ile son hacim 300 mL'ye tamamlandı.

4. FeCl₃ çözeltisi (%0,1): FeCl₃.6H₂O 0,333 g alındı az miktar saf suda çözüldü ve saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

ABTS^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ tamponu (pH 7,4 olan ve 0,1 M): 4,26 g Na₂HPO₄, 250 mL saf suda çözüldü 0,1 M'lık asit/baz kullanılarak pH 7,4'e ayarlandı. Saf su ile hacim 300 mL'ye tamamlandı.

2. ABTS^{•+} çözeltisi (2 mM): 0,15 mg ABTS tartılarak 100 mL saf suda çözüldükten sonra 0,04 g K₂O₈S₂, yavaş yavaş ilave edilerek, 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandı.

DMPD^{•+} giderme aktivitesi tayini ile ilgili çözeltiler

1. CH₃COOH/CH₃COO⁻ tamponu (0,1 M): pH 5,25 asetat tamponu hazırlamak için CH₃COONa maddesinden 1,23 g alındı 120 mL saf suda çözüldü. 0,1 M'lık asit/baz çözeltisi ile pH ayarlandı. Saf su ile hacim 150 mL'ye tamamlandı.

2. DMPD^{•+} çözeltisi (1 mM): DMPD maddesinden 210 mg tartıldı, 10 mL distile suda çözüldü. Böylece 0,1 M'lık çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 2 mL alındı 200 mL'lik ve 0,1 M'lık CH₃COOH/CH₃COO⁻ tamponu eklendi. Daha sonra çözelti üzerine 0,05 M FeCl₃ 0,4 mL karışım üzerine ilave edildi. Böylece 0,001 M'lık DMPD çözeltisi hazırlandı.

CUPRAC metodu ile ilgili çözeltiler

1. Bakır klorür çözeltisi (0,01 M): 0,134 g Bakır klorür tartılıp 100 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

2. Neocuprin çözeltisi (7,5 mM): 0,078 g Neocuprin tartıldı ve 50 mL etanol içinde çözüldü.

3. CH₃COOH/CH₃COO⁻ tamponu (1 M/pH: 6,5): 2,05 g CH₃COONa tartıldı 18 mL saf suda çözüldü, sonrasında pH ölçer ile 0,1 M'lık asit/baz çözeltileri ile pH:6,5'e ayarlandı. Son olarak saf su ile hacim 25 mL'ye tamamlandı.

FRAP metodu ile çözeltileri

1. CH₃COOH/CH₃COO⁻ tamponu (0,3 M): Sodyum asetat 3,69 g tartıldı 130 mL saf suda çözüldü. 0,1 M'lık asit/baz ile pH 3,6'ya pH ölçer ile ayarlandı ve hacim 150 mL'ye tamamlandı.

2. HCl çözeltisi (40 mM): 0,668 mL HCl (%37) çözeltisinden alındı. Son hacim 100 mL olacak şekilde saf su eklendi.

3. TPTZ çözeltisi (10 mM): 200 mL HCl (40 mM) içerisinde 0,624 g TPTZ çözüldü.

4. FeCl₃ çözeltisi (20 mM): 150 mL saf su içerisinde 0,81 g tartılan demir III klorür (FeCl₃.6H₂O) çözüldü.

5. FRAP reaktifi: 100 mL CH₃COOH/CH₃COO⁻ tamponu (0,3 M), 10 mL TPTZ (10 mM) ve 10 mL demir III klorür FeCl₃.6H₂O (20 mM) çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

3. 4-Nitrofenil β-D-glikopiranozit çözeltisi (5 mM): Substrat olarak kullanılan 4-Nitrofenil β-D-glikopiranozit 0,0564 g tartıldı, 37,5 mL CH₃COOH/CH₃COO⁻ (0,1 M) tamponu içerisinde çözüldü.

CA enziminin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler.

1. CA izoenzimlerin saflaştırılmasında, imha edilmesi için ayırt edilen insan kanı kullanılmıştır. Bu kan örnekleri Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi Kan Merkezinden temin edilmiştir. Artan kan örnekleri farklı çalışmalarda kullanılması için buzdolabında 2-8 °C arasında saklanmıştır.

2. NaHCO₃/NaH₂CO₃ tamponu (0,2 M, pH 8,8): Sodyum asetat tamponu Sefaroz-4B matriksi hazırlamak için kullanıldı. 475 mL saf suda 8,4 g NaHCO₃ çözüldü ve pH: 8,8'e 0,1 M'lık asit/baz ile ayarlandı. Hacim saf su ile 0,5 L'ye tamamlandı.

3. Dengeleme çözeltisi (Tris-HCl (25 mM, pH 8,7) / Sodyum sülfat (Na₂SO₄) (0,1 M)) tamponu: Dengeleme çözeltisi olarak kullanılan bu tamponun hazırlanmasında, 950 mL suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄ çözünerek 0,1 M'lık asit/baz yardımıyla pH:8,7'ye ayarlanıp, hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

4. Yıkama çözeltisi (Tris-HCl (25 mM, pH 8,7) / Sodyum sülfat (Na₂SO₄) (22 mM): 3,026 g Tris/HCl ile 3,124 g (Sodyum sülfat) Na₂SO₄ tartıldı ve yaklaşık olarak 975 mL distile suda çözüldü. 0,1 M'lık asit/baz yardımıyla pH 8,7'ye ayarlandı. Ardından toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

5. hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan Na₂HPO₄ (pH 6,3 25 mM) / NaCl (1 M) tamponu: 200 mL distile suda 2,2 g (sodyumbifosfat) Na₂HPO₄ ve 14,625 g tuz (NaCl) çözüldü. Ardından 0,1 M'lık asit/baz yardımıyla pH: 6,3'e ayarlanmış ve hacim 0,25 L'ye su ile tamamlandı.

6. hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan (CH₃COONa (pH 5,6 0,1 M) / NaClO₄ (0,5 M)) tamponu: 12,24 g NaClO₄ ve 2,72 g 150 mmol CH₃COONa.3H₂O 180 mL su içerisinde çözüldürüldü. pH:5,6'ya 0,1 M'lık asit/baz yardımıyla ayarlanıp hacim 200 mL olacak şekilde saf su eklendi.

7. Hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan Na₂CO₃ (pH 7,4 0,05 M)/Tris Sülfat 0,05 M tampon: 4,54 g Tris 700 mL saf suda çözüldürüldü ve 0,1 M'lık asit/baz dengesiyle pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim 0,75 litre olacak şekilde ayarlandı.

8. Luteolin ve türevlerinin çözeltilerinin hazırlanması: Luteolin ve türevleri ayrı ayrı 3 mg tartılıp antioksidan çalışmaları için 3 mL etanolde, inhibisyon çalışmaları için 3 ml DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı.

9. Para-nitrofenilasetat substratı hazırlanışı: 0,0135 gr PNF substratı tartılarak ve 1000 µL C₃H₆O'da çözüldü. Sonrasında ise yavaş bir şekilde 24 mL saf suya ilave edilerek hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

1. Tris-HCl tampon hazırlanışı: Toplam hacim 10 mL olacak şekilde şu maddeler eklendi: Tris-HCl (pH 6,8)'den 0,65 mL, brom timol mavisinden (% 0,1) 1 mL, SDS'den (%10) 1 mL, ve saf gliserin'den 1 mL. Ardından saf su ile hacim 10 mL'ye ayarlandı. Tampon çözelti kullanmadan önce 50 µL β-merkaptetanolden ve 950 µL'de örnek tamponundan çözeltilere ilave edildi.

2. SDS-PAGE yürütme tamponu hazırlanışı: Toplam hacim 50 mL olacak şekilde 7.2 g glisin ve 1.5 g Tris tartılarak saf suda çözüldü. Hazırlanmış olan bu çözelti üzerine SDS (%10) 5 mL eklendi. Hacim saf su kullanılarak 500 mL'ye tamamlandı.

3. Bisakrilamit-Akrilamit çözeltisi: 0,008 mg bisakrilamit ile 0,003 mg akrilamit tartılıp 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

4. Elektroforez jel malzemesi boyama çözeltisi: R-250 Coomassie parlak mavi'den 0,1 g tartıldı. Metanol (%50), asetik asit (%10) ve saf su (%40) karışımı içine R-250 Coomassie parlak mavi ilave edildi.

5. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 0,01 mg SDS 90 mL saf suda çözüldü.

6. Tris-HCl (pH 8,8 olan 1 M) çözeltisi: 54,45 g Tris tartılarak 72 mL 1 M'lık HCl ile karıştırıldıktan sonra son hacmi 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

7. Jel yıkama çözeltisi: Yüzde olarak sırası ile 50-40-10 oranlarında metanol, distile su ve asetik asitten içeren karışım hazırlandı.

8. Jel sabitleme çözeltisi: Yüzde olarak sırası ile 10-40-50 oranlarında izopropil alkol, distile su ve TCA karıştırıldı.

Asetilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler

Tris-HCl tamponu: 24,216 g Tris ve 0,296 g EDTA tartılmış 180 mL saf suda çözüldü. pH ölçer kullanılarak derişik asit/baz çözeltileriyle pH'sı 8'e ayarlandı. Hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı. Böylece 1 M ve pH'sı 8 olan tampon çözelti hazırlandı.

10 mM Asetiltiyokoliniyodat çözeltisi: Alüminyum folyo kaplı bir beher alınarak içerisinde 0,145 g asetiltiyokoliniyodat tartıldı. 50 mL saf su ile çözüldü.

10 mM'lık DTNB çözeltisi: Alüminyum folyo ile kaplı bir beher alınarak içerisine 10 mg DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat eklendi. Son hacim 50 mL'ye saf su ile ayarlandı.

Bütirilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılacak çözeltiler

Tris-HCl tamponu: 24,216 g Tris ve 0,296 g EDTA tartılmış 180 mL saf suda çözüldü. pH ölçer kullanılarak derişik asit/baz çözeltileriyle pH'sı 8'e ayarlandı. Hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlandı. Böylece 1 M pH 8 tampon hazırlandı.

0,5 mM'lık bütiriltiyokoliniyodat çözeltisinin hazırlanması: Alüminyum folyo kaplı bir beher alınarak içerisine 0.008 g bütiriltiyokoliniyodat eklendi. Sonra 50 mL saf su ile hacim ayarlandı.

10 mM'lık DTNB çözeltisi: Alüminyum folyo ile kaplı bir beher alınarak içerisine 10 mg DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat eklendi. Son hacim 50 mL'ye saf ile ayarlandı.

α -Glikozidaz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. Aktivite ölçümü için, pH'sı 6,9 olan 0,1 M'lık Sodyum Fosfat Tamponu: 8,98 g sodyum fosfat tartıldı. 700 mL distile su içerisinde çözüldü. pH'sı derişik asit/baz dengesiyle 6,9'a ayarlandı. Son hacim distile su ile 0,75 L'ye tamamlandı.

2. 5 mM'lık substrat çözeltisi (4-Nitrofenil β -D-glikopiranozit): 37,6 mg substrattan tartıldı. Önceden hazırlanmış olan 0,1 M'lık 25 mL fosfat tamponunda çözüldü.

Yöntem

1,1-Difenil 2-Pikril Hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme kapasitesi

Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzorientin maddelerinin DPPH \cdot radikal süpürücü aktivitesi Blois (1958) metoduna göre yapıldı. Serbest radikal olan DPPH \cdot 10^{-3} M konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonunda Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzorientin maddeleri etanolde çözülerek stok çözeltisi kullanılmıştır. 10, 20 ve 30 μ g/ μ L konsantrasyonda olacak şekilde numuneler deney tüplerine aktarılmış ve 2 mL toplam hacimleri olacak şekilde çözücü ile tamamlanmıştır. Ardından 500 μ L stok DPPH \cdot çözeltisi her bir numune tüpüne aktarılmıştır. Otuz dakika 25 $^{\circ}$ C'de ve karanlık bir ortamda reaksiyonun gerçekleşmesi için bekletilmiştir. Ardından etanolden oluşan kör ile 517 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kontrol çözeltisi olarak, 2000 μ L etanol ve 500 μ L DPPH \cdot çözeltisi kullanılmıştır. Serbest radikal giderme aktivitesi, azalmış olan DPPH \cdot çözeltisinin geriye kalan miktarını vermiştir.

Fe $^{3+}$ indirgeme kapasitesi

Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzorientin maddelerinin indirgeme kuvveti tayini Oyaizu metodunun (1986) hafif modifiye edilmiş şekline göre yapılmıştır (Gülçin 2009). Stok çözeltisi için numuneler etanolde çözerek 1000 μ g/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 10, 20, 30 μ g/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde falkon tüplere aktarılmış, hacim distile suyla 750 μ L'ye tamamlanmıştır. Ardından her bir tüpe 0.2 M fosfat tamponu 1 mL (pH:6.6) ve %1'lik K $_3$ Fe (CN) $_6$ 1 mL ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 30 dk boyunca 50 $^{\circ}$ C'de bekletilmiştir. Daha sonra karışıma %10'luk triklorasetik asit 1 mL, %0,1 FeCl $_3$ 250 μ L ilave edilmiştir. Ardından 700 nm'de absorbans köre karşı okunmuştur. Kör olarak distile su kullanılmıştır. Kontrol için numune yerine distile su kullanılmıştır.

2,2-Azino-Bis (3-Etilbenzo-Tiyazolin-6-Sülfonik Asit) (ABTS) radikali giderme kapasitesi

Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin maddelerinin ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve ark. yaptığı çalışma metoduna göre belirlenmiştir (1999). 7 mM ABTS solüsyonu hazırlanmıştır. 2.45 nM persülfat çözeltisi bu çözeltiliye eklenmiş ve ABTS radikalleri üretilmiştir. ABTS radikal solüsyonu kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm’de absorbanısı 0.1 M ve pH’sı 7.4 olan fosfat tamponu vasıtasıyla 1.00 ± 0.05 nm’ye ayarlanmıştır. ABTS radikal giderme aktivitesini incelemek için çeşitli konsantrasyonlarda (20-40 µg/mL) Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin numunelerine 250 µL ABTS radikal solüsyonu eklenmiş ve 25-30 dakika bekletilmiştir. Absorbanslar 734 nm’de etanolden oluşan köre karşı kaydedilmiştir.

N,N’-Dimetil-P-Fenilendiamin Dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi

Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin maddelerinin DMPD radikali giderme aktivitesi tayini, Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlenmiştir (1999). Bu niyetle, renkli katyon ($DMPD^{*+}$) elde etmek için, 400 mL pH’sı 5.25 olan 100 mM DMPD çözeltisi, final konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde 0.8 mL $FeCl_3$ eklenmiştir. 505 nm’de çözeltinin absorbanısı ölçülmüştür. $DMPD^{*+}$ radikal solüsyonu kullanmadan önce kontrol solüsyonunu 505 nm’de konsantrasyonu 0.1 M ve pH 5.25 olan asetat tamponu ile 0.400 ± 0.500 nm’ye ayarlanmıştır. $DMPD^{*+}$ solüsyonu deney yapılacağı gün hazırlanmalı ve absorbanısı 12 saat sabit olmalıdır. Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin maddelerini içeren çözelti ve standart antioksidanların çözeltileri 20–40 µg/µL miktarında deney tüplerine eklenmiş ve hacim 0.5 mL’ye saf suyla tamamlanmıştır. Ardından üzerine 1 mL $DMPD^{*+}$ solüsyonu eklenmiştir. Elli ila elli beş dakika arasında karanlık bir ortamda absorban değerleri 505 nm’de ölçülmek üzere bekletilmiştir. Tampon çözeltisi ise kör olarak kullanılmıştır

Cu^{2+} indirgeme kapasitesi (CUPRAC metodu)

Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin maddelerinin Cu^{2+} indirgeme aktiviteleri Cu^{2+} iyonları indirgeme metodu Apak ve arkadaşlarının metodunun (2006) hafif bir modifikasyonu ile yapılmıştır (Ak and Gülçin 2008). 10, 20, 30 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan numune tüplerine 0.125 mL 0.01 M $CuCl_2$ çözeltisi, 0.125 mL 7.5×10^{-3} M etanolik neokuprin çözeltisi ve 0.125 mL 1 M CH_3COONH_4 tampon çözeltisi (pH: 6.5) sırasıyla eklenmiştir. 25-30 dk sonra karanlıkta absorban değerleri 450 nm’de köre karşı ölçülmüştür ve kör olarak distile su kullanılmıştır. Kontrol için ise numune yerine distile su kullanılmıştır.

FRAP İndirgeme Aktivitesi

İlk önce deney tüplerine 15, 30 ve 45 µg/mL konsantrasyonlarına uygun gelecek şekilde Luteolin, Sinarozit, Orientin, İzoorientin maddelerinin ve standart çözeltiler aktarılmıştır. Tampon çözeltisi ile hacimleri 0.5 mL'ye tamamlanmıştır. Ve daha sonra toplam hacim 5 mL'ye tamamlanacak şekilde sırasıyla deney tüplerine 2250 µL 20 mM'lık FeCl₃ çözeltisi ve 2250 µL FRAP reaktifi eklenmiştir. Daha sonra deney tüpleri karıştırıcıda karıştırılmıştır. 8-10 dakika sonra absorbanslar 593 nm'de kaydedilmiştir. Asetat tamponu kör olarak kullanılmıştır. Kontrol olarak da uçucu yağ hariç geriye kalan çözelti kullanılmıştır.

İnsan Kanından hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Saflaştırılma Çalışmaları

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılma çalışmalarında kullanılacak olan insan kanı eritrositleri, kan merkezinden (Bölge Eğitim Araştırma hastanesi) imha edilecek kanlardan temin edildi. Saflaştırma işlemlerine ilk olarak alınan insan kanı eritrositlerinin hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu suda hemoliz edilmesi ile başladı. Daha sonrasında 2-8 °C'de 10000xg'de yirmi beş-otuz dakika süre ile santrifüje edildi. Santrifüje olmuş hemolizatın üst kısmı dikkatle alınarak çalışmalarda kullanıldı.

Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ile ilgili çalışmalar

Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüe edilmesi: Tris yardımıyla pH'sı dikkatlice 8,7'ye ayarlanan hemolizat kolona yüklendi. Sonra daha önce hazırlanmış olan yıkama çözeltisi ile kolon 1,5-2 saat süre ile yıkandı. Böylelikle hCA enzimi kolona tutunmuş ve hCA dışındaki safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Ardından elüsyon tamponu kolona yüklenerek hCA I enzimi elüe edildi. 15 dakikalık yıkama tamponunun kolona geçirilmesi takiben hCA II elüsyonu kolondan geçirilerek hCA II enzimi elüatları toplandı. Toplanan elüatların 280 nm'deki absorbanslarına bakılarak uygun absorbans gösterenlerin -20 °C'de daha sonra çalışmak üzere saklanmıştır.

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanılan afinite kromatografisi kolonunun hazırlanması

1. Afinite jeli (Sefaroz-4B-L-Tirozin): Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sefaroz-4B matriksi kullanılarak afinite jeli hazırlandı. İlk aşamada kovalent bağla L-Tirozin kolon materyaline bağlandı ve diazollanan sülfanilamitte L-Tirozine kenetlendirildi. Hazırlanmış olan afinite jelindeki L-Tirozin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmı oluşturmaktadır. CA'nın spesifik inhibitörü olan sülfanamit burada jel içerisinde enzimin yüksek seviyede saflaştırılmasını gerçekleştiren kısımdır (Söyüt 2006).

2. L-Tirozin uzantı kolunun CNBr ile aktifleştirilmiş olan matrikse takılması: 2 g tartılan Sepharose-4B 50 mL soğuk suda çözüldükten sonra nüce erleninden süzüldü. CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B, 250 mL soğuk NaHCO₃ tamponu (pH 10) ile yıkanmış ve bir beher içerisine alınmıştır. Aynı tamponun 20 mL'sine tirozin (80 mg) ilave edilmiş ve soğuk bir şekilde behere eklendi ve yaklaşık 2 saat süre ile manyetik karıştırıcıda yavaşça karışması sağlandıktan sonra 4°C'de 16 saat boyunca bekletildi ve yıkama suyu ile 280 nm'deki absorbans göstermeyinceye kadar yıkama işlemine devam edilerek reaksiyona girmeyen tirozin uzaklaştırıldı. Yıkamaya pH'sı 8.8 olan 0,2 M'lık NaHCO₃ tamponu ile devam edilerek tirozin bağlanmış olan jel aynı tamponun (pH'sı 8.8 olan 0,2 M'lık NaHCO₃) 40 mL'si içine aktarıldı.

3. Sülfanilamit kenetlendirilme işlemi: Sülfanilamitten 25 mg tartılarak 10 mL, HCl (0°C, 1 M'lık) içerisinde çözümlenerek içerisine 5 mL 75 mg NaNO₂'in içeren çözelti damla damla eklendi. Reaksiyon için beklenen 10 dakikalık süre sonunda diazolanmış sülfanilamit, daha önce hazırlanmış olan Sepharose-4B-L-Tirozin süspansiyonuna (40 mL) ilave edilerek karışımın pH'sı 1 M'lık NaOH/HCl kullanılarak 9,5'e ayarlandı ve üç saat boyunca oda sıcaklığında vortekste yavaşça karıştırıldıktan sonra nüce yardımıyla saf su (1 L) ve 0,05 M'lık Tris-SO₄ (pH 7,4, 200 mL) tamponu ile yıkandı (Söyüt 2006).

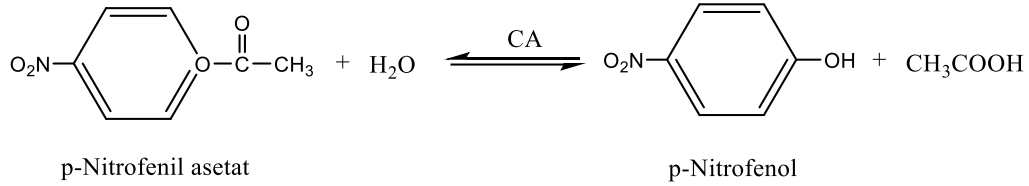
4. Afinite kolonunun paketlenmesi: Daha önce hazırlanmış olan jel ve süspansiyon edilmek üzere Tris-HCl (pH'sı 8,7) dengeleme tamponuna alındı. Sonrasında 1x10 cm'lik kapalı hacme sahip kolona (soğutmalı) aktarıldı. Jelin çökmesi beklendikten sonra peristaltik pompa kullanılarak kolon dengeleme tamponu dengelendi. Kolonun dengelendiğini anlamak amacıyla toplanan eluatın 280 nm'de absorbansına bakıldı ve absorbans değerinin sıfır olduğu an kolonun dengelendiği anlaşıldı ve dengelenme bitirildi.

5. Kolona numune tatbiki ve elüsyonların toplanması: Dengelenmiş olan kolona pH'sı 8,7'ye katı tris kullanılarak ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edilir. Hemolizatın kolondan geçirilmesinden sonra daha önce hazırlanmış olan yıkama çözeltisi (pH'sı 8,7 olan 25 mM tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄) geçirilerek hCA enzimi kolona tutunması ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi kolondan toplanan eluatın pH'sı 8,7 olduğu ana kadar devam etti. Sonrasında öncelikle hCA I enzimini elüe etmek amacı ile kolona 1 M NaCl ve 25 mM Na₂HPO₄ içeren pH'sı 6,3 olan çözelti tatbik edilerek elüatlar ependorf tüplerine toplandı. 280 nm'deki absorbansları ölçüldü. hCA II izoenzimi için ise kolona 0,1 M NaCH₃COO ve 0,5 M NaClO₄ içeren pH'sı 5,6 olan çözelti tatbik edilerek yine elüatlar ependorf tüplerine toplandı ve 280 nm'deki absorbansları ölçüldü.

Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini

Esteraz aktivitesi

CA enziminin esteraz olarak aktivite göstermesi esasına dayanan metoda göre substrat olarak *p*-nitrofenilasetat kullanılmıştır. CA enzimi, *p*-Nitrofenilasetatı, *p*-nitrofenol ve asetata hidrolizler ve yöntem oluşan *p*-Nitrofenol'ün 348 nm'de absorbans vermesi esasına dayanmaktadır.



Şekil 11. *p*-nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması (Göçer 2014).

Aktivite tayini ölçümleri 348 nm dalga boyunda kuvars küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin miktarları ve uygulama sırası aşağıda verilen çizelgeye göre gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6. Esteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Maddelerin Miktarları ve Uygulama Sırası

Kullanılan maddeler	Numune tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
Tris-SO ₄ (0,05 M, pH:7,4)	400	400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	360	360
Saf su	220	240
Enzim çözeltisi	25	-
Toplam hacim	1000	1000

Tablo 2'deki gibi reaksiyon karışımı pipetlendikten sonra 348 nm de üç dakika süre ile ve 1 dakikada bir absorbans değeri okunacak şekilde ayarlanmış olan spektrometrede kinetik olarak çalışıldı. Bir ve üçüncü dakika sonundaki absorbans değerleri okunarak ikisi arasındaki fark alındı ve aşağıda verilmiş olan formüle göre EU hesaplandı.

$$EU/mL = \frac{\Delta OD}{\epsilon \cdot t} \cdot \frac{V_T}{V_E} \cdot SF$$

EU : Enzim ünitesi

ΔOD : 1 dakikadaki absorbans değişimi

ϵ : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Küvette bulunan enzimin hacmi

T : Zaman (dakika)

Protein Tayini

Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayininde kullandığımız yöntemin esası, proteinlerin yapı taşlarını oluşturan aromatik aminoasitlerinin (tirozin, triptofan ve fenilalanin) 280 nm dalga boyunda yüksek absorbans vermesidir (Segel 1968). Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış olan CA I ve CA II izoenzimleri eşit hacimlerde tüplere alındıktan sonra her bir tüpten belirli miktarlarda kuvars küvetlere alınarak 280 nm’de absorbans değerleri kaydedildi. Ölçümlerde kör olarak saflaştırma işlemlerinde kullanılan CA I ve CA II elüsyon çözeltileri kullanıldı.

Kantitatif protein tayini

Saflaştırılan CA izoenzimleri ve hemolizatta bulunan protein miktarlarının kantitatif olarak tayini Coomassie parlak mavi G-250’nin bağlanması ile elde edilen kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermesi gerçeğine dayanan yöntem ile yapıldı. (Bradford 1976). İlk olarak tüplere standart sığır albümininden 10-100 μ L ilave edildi ve tüplerin son hacmi saf su eklenerek 100 μ L’ye tamamlandı. 5 mL renklendirme reaktifinden de ilave edilerek karışım iyice karıştırıldı. 10 dk’lık karanlık ortamdaki inkübasyondan sonra köre (900 μ L renklendirme reaktifi ve 100 μ L tampon karışımı hazırlandı) karşı 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre standart bir grafik çizilerek miktar tayini yapıldı.

CA izoenzimleri’nin SDS-PAGE ile saflığının kontrolü

CA izoenzimlerinin saflaştırılmasından sonra saflaştırılmış olan enzimlerin saflık derecelerinin kontrolü Laemmli (1970) tarafından belirlenmiş olan SDS-PAGE tekniği ile yapıldı. SDS-PAGE yöntemiyle CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra enzim saflığının derecesi Laemmli (1970) tarafından belirlendiği gibi kontrol edildi. İlk olarak temizlenmiş olan elektroforez camları üst üste yerleştirilerek özel kısaçları ile sabitlendi. Bu sabitlenmiş olan cam plakalar jel hazırlama tankına uygun bir şekilde yerleştirildi. Ayırma jeli çözeltisiyle plakalar arasındaki boşluk 0,6 cm kalana kadar dolduruldu. Donmuş olan ayırma jeli üzerine yağma jeli çözeltisi dikkatli bir şekilde doldurularak üzerine elektroforez tarakları yerleştirildi. Daha sonra taraklar yağma jelinin donmasından sonra dikkatlice çıkartılarak numuneleri yüklemek için uygun kuyucuklar oluşturulmuş oldu. Cam plakalar elektroforez tankına yerleştirilerek tank yürütme tamponu ile dolduruldu. Akabinde saflaştırılmış olan enzimlerden

numune tamponundan ve gliserolden 100 µL eklenmesi ile oluşturulmuş olan karışım 5 dk süre ile kaynar suda denatüre edildi. Bu şekilde denatüre olmuş belli konsantrasyonlardaki CA I, CA II izoenzimleri ve standart protein kuyucuklara dikkatlice yüklendi ve elektroforez tankı kapatıldı. 30 dk 80 V akım uygulandıktan sonra akım 120 volta çıkarılarak 2 saat boyunca numuneler yürütüldükten sonra jel plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve 20 dakika boyunca hazırlanmış olan sabitleme çözeltisinde bekletildi. 20 dakika sonunda sabitleme çözeltisinden çıkarılan jel iki saat boyama çözeltisine ardından yıkama çözeltisine konuldu. Protein bantları iyice belirgin hale gelene kadar jel çalkalayıcıda bekletildikten sonra jel dikkatli bir şekilde çıkartılarak fotoğrafı çekildi.

Karbonik Anhidraz (hCA I ve hCA II) İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Luteolin ve Türevlerinin Etkisinin Belirlenmesi

Luteolin ve türevlerinin saflaştırılan CA I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Araştırmalar esteraz aktivite tayin metoduna göre gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucu IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi. Standart karbonik anhidraz inhibitörü olarak asetozolamit çalışıldı ve sonuçlar Luteolin ve türevlerinin IC₅₀ ve K_i değerleri ile kıyaslandı.

Luteolin ve Türevlerinin Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Luteolin ve türevlerinin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme kapasiteleri Ellman metoduna göre araştırıldı. Araştırmalar sonucu IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi. Ellman metodu kolinesterazların, asetilkolinoyodanın tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlemesi ve açığa çıkan tiyokolinin ortama eklenen DTNB ile reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin 412 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır (Ellman *et al.* 1961).

Luteolin ve Türevlerinin Bütirilkolinesteraz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Luteolin ve türevlerinin BChE üzerindeki etkisi aynı şekilde asetilkolinesterazdaki gibi Ellman metoduna göre araştırıldı. Araştırmalar sonucu IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi. Ellman metodu kolinesterazların, bütirilkolinoyodanın tiyokoline parçalanması reaksiyonunu katalizlemesi ve açığa çıkan tiyokolinin ortama eklenen DTNB ile reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin 412 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır (Ellman *et al.* 1961).

α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Tayini

Ticari olarak temin edilen α -Glikozidaz enzim aktivitesi, Tao ve ekibinin geliştirmiş oldukları metoda göre p-NPG substratı kullanılarak araştırıldı. Çalışmada kullanılacak numuneler diğer enzim çalışmalarındaki gibi hazırlandı. Aktivite ölçümleri için pipetlemeler aşağıdaki tabloda verilen reaksiyon karışımına göre 3 dakika süre ile 405 nm'de kaydedildi. İnhibe etme yetenekleri belirlenmek istenen Luteolin ve türevleri için IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi.

Tablo 6. α -Glikozidaz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin Kullanım Sırası ve Miktarları

Çözeltiler	Numune tüpü (μL)	Kontrol tüpü (μL)
Tampon (NaH ₂ PO ₄)	100	100
Saf su	Değişken	840
Subsrat (<i>p</i> -NPG)	50	50
Enzim(α -Glikozidaz)	10	10
İnhibitörler	Değişken	-
Toplam hacim	1000	1000

Moleküler Simülasyon Yerleştirme Çalışmaları

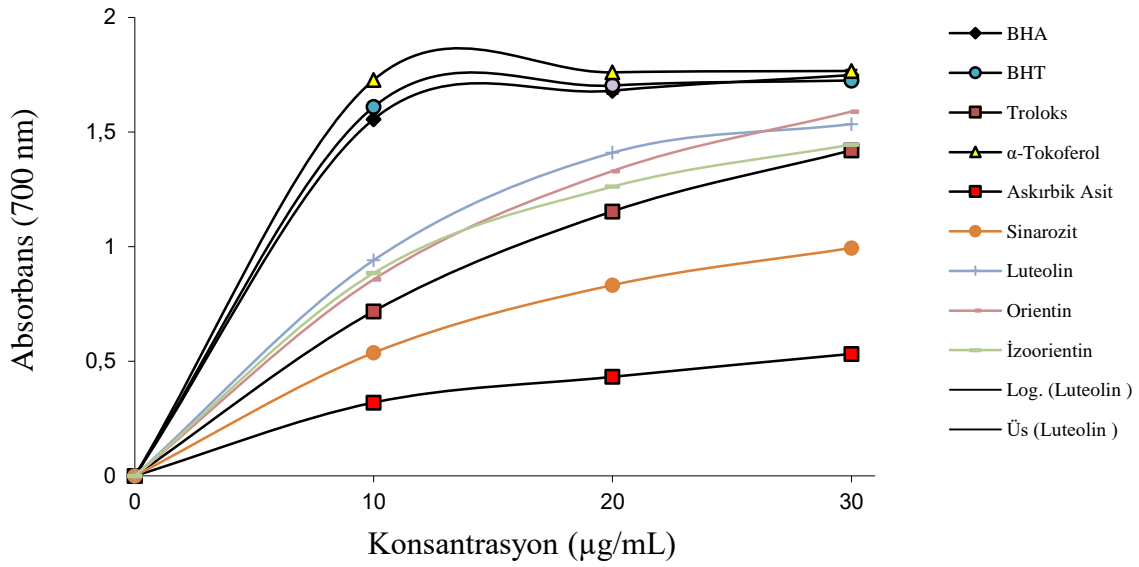
Teorik olarak, biyoinformatik kimyada yeni ilaçların ve aktif maddelerin tasarımı için birçok program vardır. Moleküler yerleştirme bunun için geliştirilen yöntemlerden biridir (Taslimi *et al.* 2021). Bu çalışmada Luteolin ve türevi glikozitlerin moleküler doking yöntemi kullanılarak moleküllerin biyolojik aktivite değeri hesaplanmış ve deneysel çalışma sonuçları ile karşılaştırılmıştır. İlk aşamada moleküllerin yapıları Chemdraw programı ile çizildi ve dosyalar pdb uzantılı oluşturuldu. Enzim yapıları, RCSB Protein Veri Bankası web sitesinden elde edildi. Luteolin ve türevi glikozitler için her bir enzim ile olası etkileşimleri ve bağlanma afiniteleri moleküler yerleştirme programı Schrödinger Molecular Modeling Suite (Maestro 12.9'un yerleştirme programı) ile belirlendi (Schrödinger 2021).

ARAŞTIRMA BULGULARI

Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kuvveti bulguları

Luteolin ve türevleri ile standart olarak kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin Fe³⁺ iyonlarını indirgeme yetenekleri 700 nm’de kaydedilen absorbans değerleri ile belirlendi. Sonuçta Şekil 12’de görüldüğü üzere Luteolin ve türevlerinin indirgeme kapasitesi artan konsantrasyon ile arttığı gözlemlendi.

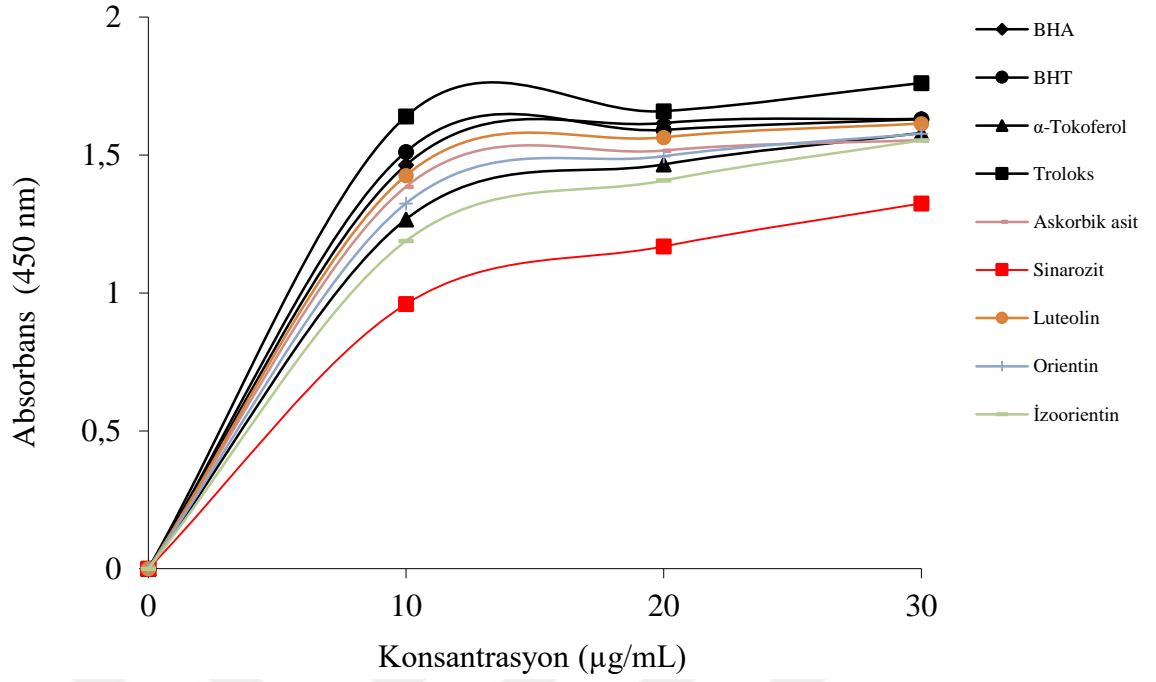


Şekil 12. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlarda ferrik iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması

Luteolin ve türevleri ile standart antioksidanların, ferrik (Fe³⁺) iyonlarını ferröz (Fe²⁺) iyonlarına indirgeme yeteneklerine ait değerler Tablo 3’te verilerek birbirleriyle mukayeseleri yapıldı.

Cu²⁺ -Cu⁺ indirgeme kapasitesi (CUPRAC Metodu) bulguları

Luteolin ve türevleri ile standart olarak kullanılan antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin Cu²⁺ iyonlarını indirgeme kapasiteleri 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri ile belirlendi. Sonuçta Luteolin ve türevlerinin kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme yetenekleri, konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 13).

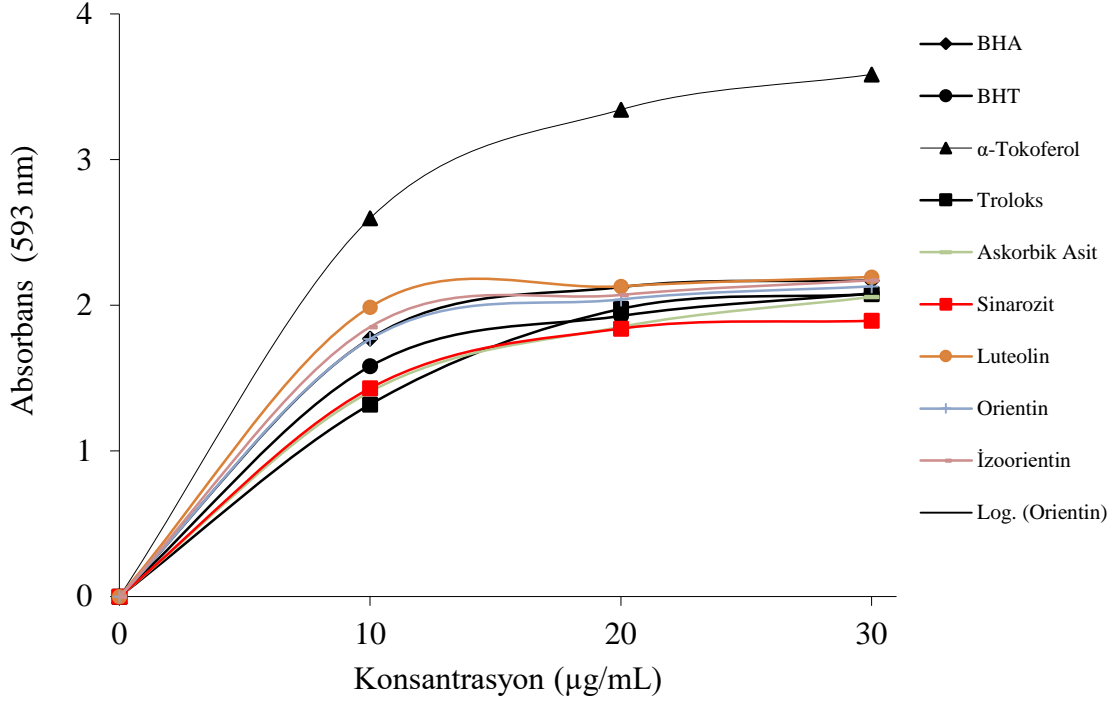


Şekil 13. Luteolin ve Luteolin türevlerinin farklı konsantrasyonlarda kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması

Standart antioksidanlar ile Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme yeteneklerini gösteren grafikler çizilerek her bir için 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kaydedilen absorbans değerleri Tablo 3'te verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

FRAP indirgeme aktivitesi bulguları

Bu yöntem Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına indirgenmesi ile yani elektron vererek antioksidan etki göstermesi ve oluşan Fe^{2+} iyonları 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) varlığında mavi renk bileşik oluşturarak 593 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. Çalışma sonucu Luteolin ve türevleri ile standart antioksidan çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarda ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitelerinin artan konsantrasyonla birlikte arttığı gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlarda FRAP indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması

DPPH· serbest radikal giderme sonuçları

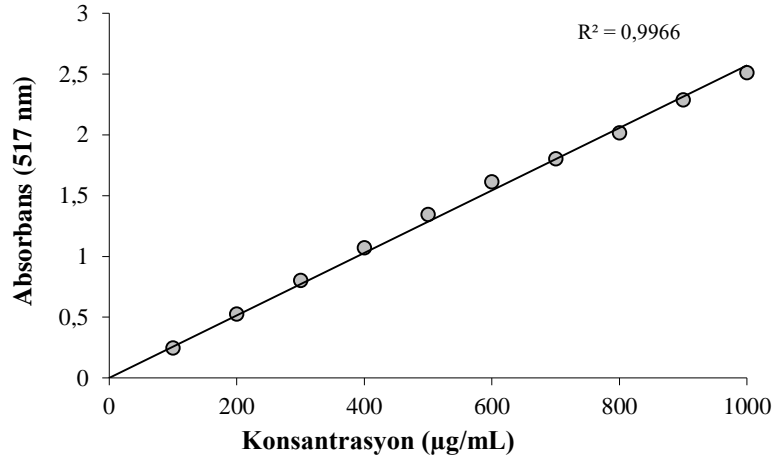
Luteolin ve türevleri ile antioksidan bileşikler olarak bilinen BHA, BHT, α-tokoferol, Troloks ve askorbik asit için DPPH· radikali giderme aktivite tayini ölçümleri 517 nm dalga boyunda kaydedildi. İlk olarak DPPH· giderme aktivitesi için standart bir grafik çizildi. Çizilmiş olan bu standart grafikten ve aşağıda verilen denklemlerden, geriye kalan DPPH radikali miktarı ve yüzdesel olarak DPPH miktarındaki azalma hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{517}) = 0,0028x [\text{DPPH}\cdot]$$

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

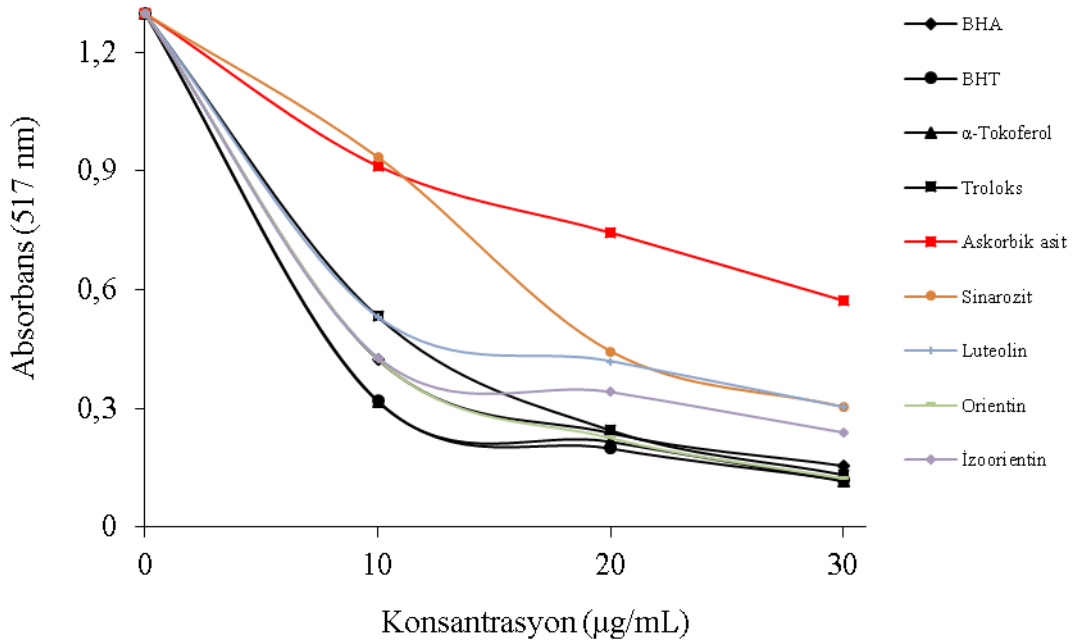
λ_{517} -N: Numune ilavesinden sonra kaydedilen absorbans değeri

λ_{517} -K: Kontrol numunesi için kaydedilen absorbans değeri



Şekil 15. DPPH· aktivitesinde kullanılan standart grafik

Antioksidan kapasitesi belirleme grafiği çizilerek sonuçlar kaydedildi. Moleküllerin DPPH· radikali giderme yeteneklerinin konsantrasyon artışı ile paralel olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 16).



Şekil 16. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikali giderme indirgeme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması

2,2- ABTS·⁺ giderme aktivitesi sonuçları

Re ile arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntemle göre Luteolin ve türevlerinin ABTS·⁺ giderme aktivitesi belirlendi (1999). Başlangıçta 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanarak ABTS bileşiğinden ABTS·⁺ oluşturmak için içerisinde 2,45 mM'lık persülfat çözeltisinden ilave edildi. Kontrol çözeltisinin 0,1 M ve fosfat tamponu (pH'sı 7,4)

kullanılarak 734 nm’de absorbansı ayarlandı. Bu aşamadan sonra standart bir grafik çizilerek Luteolin ve Luteolin türevi glikozitler ile standart antioksidanların ABTS^{·+} giderme aktiviteleri belirlendi (Şekil 17). Bu grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden, reaksiyona girmeyen ABTS^{·+} miktarı aşağıdaki gibi bulundu.

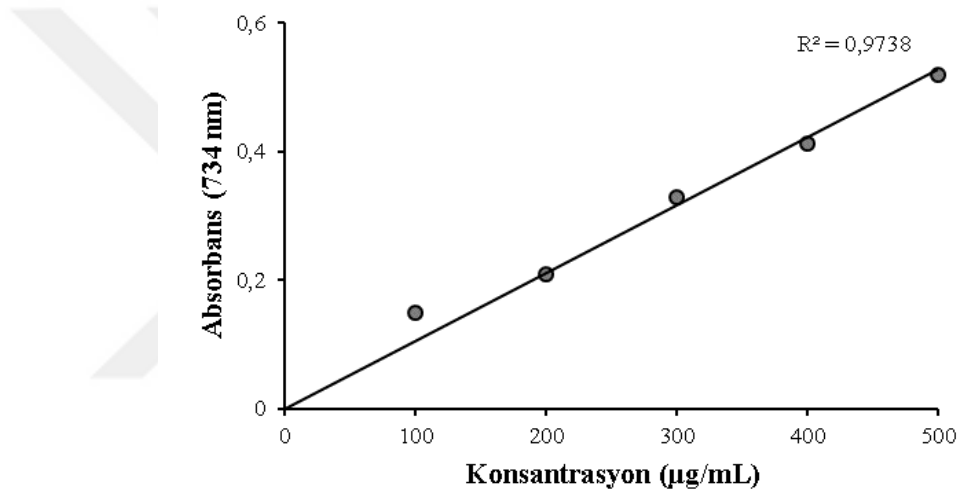
$$\text{Absorbans } (\lambda_{734}) = 0,001 \times [\text{ABTS}^{\cdot+}]$$

Aşağıda verilen eşitlikten ABTS^{·+} miktarındaki azalma yüzdesi hesaplandı.

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

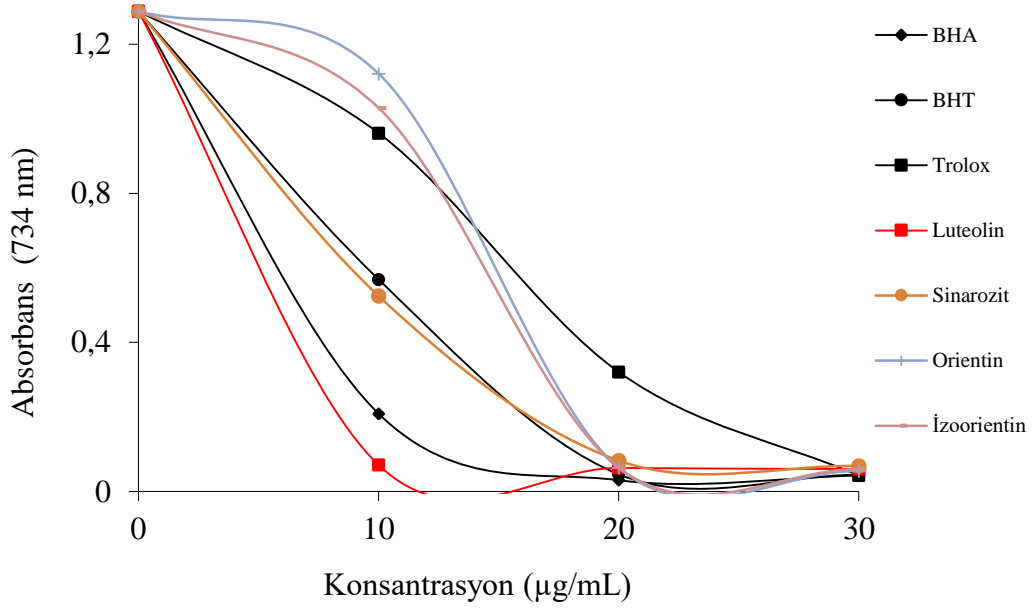
λ_{734-N} : Numune ilavesinden sonra kaydedilen absorbans değeri

λ_{734-K} : Kontrol numunesinin kaydedilen absorbans değeri



Şekil 17. ABTS^{·+} aktivitesinde kullanılan standart grafik

Luteolin ve Luteolin türevi glikozitler ile standart antioksidanların farklı konsantrasyonlarına birer mL hazırlanmış olan ABTS radikali eklenerek yarım saat süre ile karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 734 nm’de sıfırlama etanol ile yapılarak absorbansları kaydedildi. Çizilen konsantrasyon-absorbans grafiğinden her bir standart antioksidanlar ile Luteolin ve türevleri için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı.



Şekil 18. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin ABTS radikali giderme yeteneklerinin referans alınan antioksidanlar ile karşılaştırılması

DMPD^{•+} giderme aktivitesi bulguları

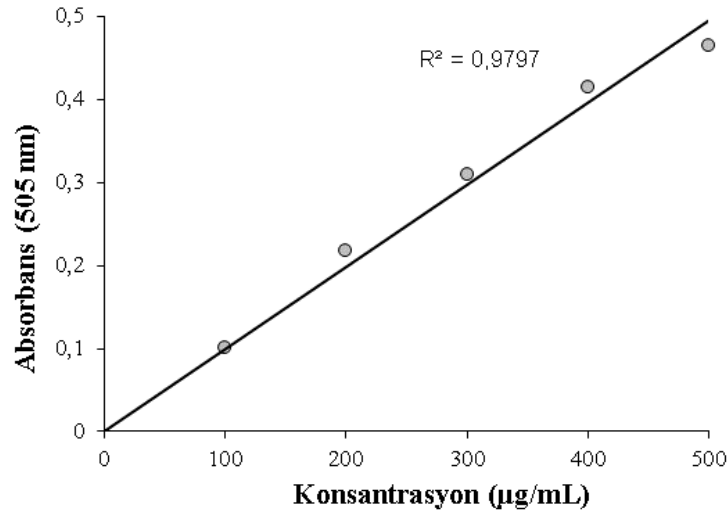
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan referans alınan antioksidan çözeltiler ile Luteolin ve glikozit türevlerinin DMPD radikalini giderme yetenekleri, 505 nm’de kaydedilen absorbans değerlerine göre belirlendi. Öncelikle diğer radikal giderme çalışmalarında olduğu gibi standart grafik hazırlandı ve hazırlanan grafikten aşağıdaki denklemler kullanılarak geriye kalan DMPD^{•+} miktarı ve yüzde olarak azalan kısmı hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{505}) = 1,1 \cdot 10^{-3} \times [\text{DMPD}^{•+}]$$

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

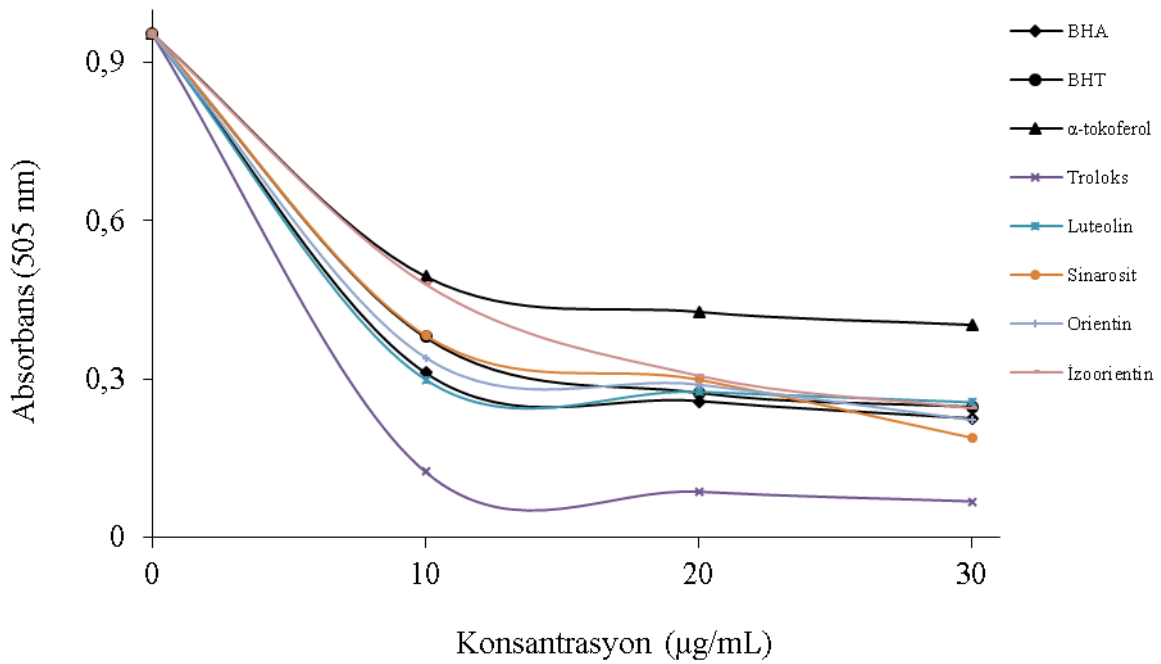
λ_{505-N} : Numune içeren küvet için kaydedilen absorbans değeri

λ_{505-K} : Kontrol küveti için kaydedilen absorbans değeri



Şekil 19. DMPD•⁺ aktivitesinde kullanılan standart grafik

Referans antioksidanlar (BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks) ile Luteolin ve türevi glikozitler'in farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan çözeltileri üzerine 1 mL DMPD•⁺ çözeltisi ilave edildi. Elli dakika süre ile karanlık ortamdaki inkübe edildi. 505 nm'de sıfırlama tampon çözelti ile yapılarak absorbans değerleri kaydedildi (Şekil 20).



Şekil 20. Luteolin ve türevlerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin DMPD radikal giderme yeteneklerinin standart antioksidanlar ile karşılaştırması

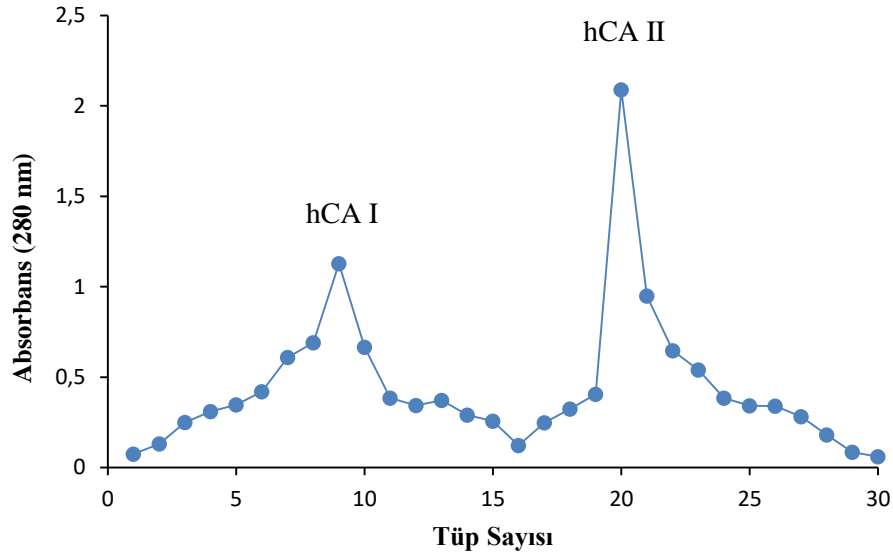
Tablo 7. Farklı Metotlarla Belirlenmiş Olan Luteolin ve Türevlerinin Antioksidan Yeteneklerinin Standart Antioksidanlar İle Karşılaştırmaları

		BHA	BHT	α Tokoferol	Troloks	Askorbik asit	Luteolin	Sinarozit	Orientin	İzoorientin
DPPH	IC ₅₀	8,89	7,88	7,97	8,77	24,75	12,84	14,15	8,35	11,00
Metodu	r ²	0,978	0,961	0,955	0,990	0,952	0,962	0,9809	0,980	0,994
DMPD	IC ₅₀	11,95	13,08	19,80	6,60	-	12,84	11,95	12,38	13,87
Metodu	r ²	0,952	0,975	0,968	0,943	-	0,940	0,960	0,949	0,856
ABTS	IC ₅₀	4,99	5,55	4,92	7,30	-	5,38	6,42	6,24	6,30
Metodu	r ²	0,975	0,995	0,934	0,975	-	0,932	0,999	0,851	0,882
Fe³⁺	$\lambda_{700/10}$	1,56	1,61	1,73	0,72	0,32	0,94	0,54	0,86	0,88
indirgeme	r ²	0,954	0,954	0,937	0,999	0,999	0,990	0,999	0,943	0,998
Metodu										
FRAP	$\lambda_{593/10}$	1,78	1,58	2,60	1,32	1,41	1,99	1,43	1,77	1,85
Metodu	r ²	0,988	0,989	0,993	0,995	0,911	0,956	0,998	0,980	0,970
Kuprac	$\lambda_{450/10}$	1,46	1,51	1,27	1,64	1,39	1,43	0,96	1,33	1,19
Metodu	r ²	0,983	0,959	0,994	0,928	0,981	0,980	0,997	0,990	0,951

Afinite Kromatografisi ile Yapılan hCA I ve II İzoenzim Saflaştırma Çalışmaları

Kalitatif protein tayini

İlk olarak 15 dakika süre ile bir beher içerisinde belirli hacimde alınan eritrosit buz banyosunda hemoliz amacıyla manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Santrifüj tüplerine aktarılan hemolizat 13000 rpm’de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonunda dikkatli bir şekilde süpernatant bir behere alındı. Dikkatli bir şekilde tris tane tane eklenerek pH’sı 8,7’ye ayarlanarak önceden dengelenme tamponu ile dengelenmiş olan kolona yüklendi. Hemolizatın kolondan geçmesinden sonra, kolondan belli bir süre yıkama tamponu geçirilir. Sonrasında hCA I enzimini elüe etmek için kolondan pH’sı 6,3 olan 1 M NaCl ve 25 mM Na₂HPO₄ tamponu geçirildi. hCA II enzimini elüe etmek için ise, kolondan 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH’sı 5,6) tamponu geçirildi. Elüatlar, fraksiyon toplayıcısı yardımı ile 2’şer mL halinde tüplere toplanarak 280 nm’de absorbanları kaydedilerek grafiğe aktarıldı.

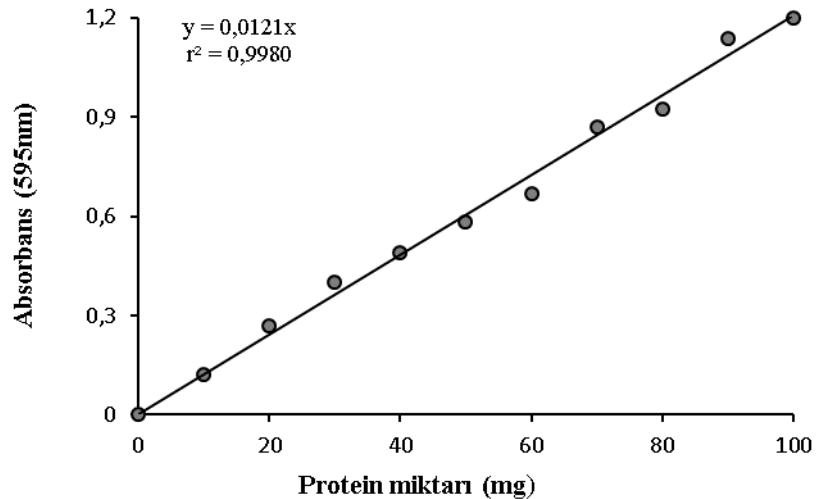


Şekil 21. Saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu sonucu yapılan kalitatif protein tayini grafiği

Toplanan fraksiyonlar dikkatli bir şekilde diyaliz torbasına konularak ağızları kapatıldı. 24 saat boyunca safsızlıkların uzaklaştırılması için diyaliz tamponu içerisinde, soğuk ortamda ve manyetik karıştırıcı üzerinde düşük hızda bekletildi. Diyaliz sonrası eppendorf tüplerinde toplanan enzimler inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C soğutucuda muhafaza edildi.

Kantitatif protein tayini

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemine göre Coomassie Brilliant Blue reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi (1976). İlk aşamada sığır serum albümin kullanılarak standart grafik elde oluşturuldu. İnsan eritrositlerinden hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan izoenzimdeki protein miktarları standart grafik yardımıyla belirlendi.



Şekil 22. Bradford yöntemi ile yapılan kantitatif protein tayini standart grafiği

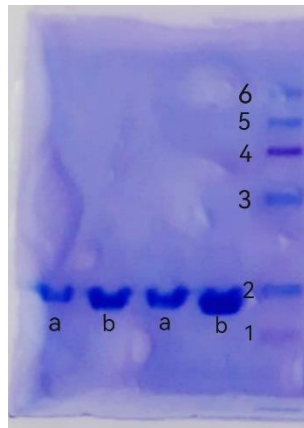
İnsan eritrositlerinden izole edilen hemolizat ve izoenzimler için kantitatif protein tayini yapıldı. Bulunan değerlerden hemolizatın afinite kolonundan geçirilmesi sonucu spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve verim yüzdesi hesaplandı. Elde edilen sonuçlar hesaplanarak saflaştırma tablosuna aktarıldı.

Tablo 8. İnsan Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi Tekniği ile Saflaştırılan hCA I ve II İzoenzimleri İçin Hazırlanan Saflaştırma Tablosu

Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	0,496	22	18,866	415,054	10,912	0.0263	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid Afinite Kolon Kromatografisi	hCA I	4,5	0,126	0,5662	2.610	4,606	23,919	175,336
	hCA II	3	0,167	0,501	3.528	7,045	32,331	267,960

SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi ile Molekül Ağırlığı ve Saflık Kontrolü

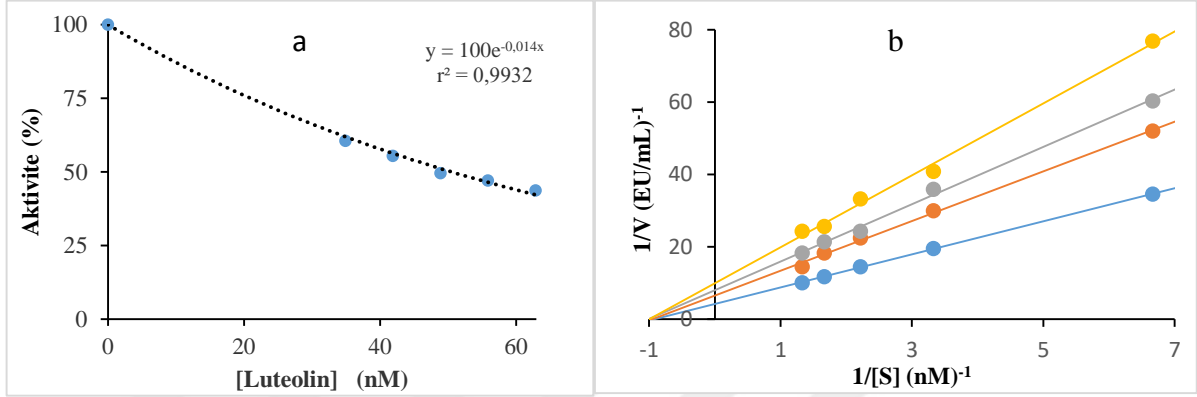
SDS-PAGE, saflaştırılan CA izoenzimlerinin saflığını ve molekül kütlelerini belirlemek amacıyla yapıldı. Burada standart olarak molekül ağırlıkları bilinen protein markırları kullanıldı. İlk olarak enzimler denetüre edilerek elektrofrezeye yüklendi. Belirli aşamalardan sonra jeller ilk olarak Coomassie Brilliant Blue boyama çözeltisi sonrasında da yıkama çözeltisi ile muamele edilerek protein bantları belirginleştirilerek standart protein markırları ile mukayese edildi ve yaklaşık olarak molekül ağırlığı belirlendi. Jelde gözlenen tek bant bize enzimin saf olduğunu gösterdi.



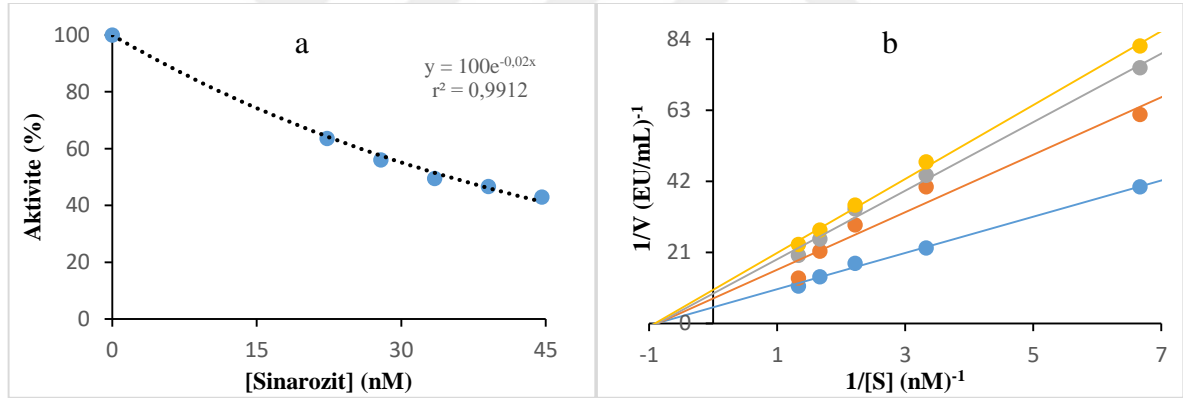
Şekil 23. Saflaştırılan hCA I, II izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüsü (a: hCA I, b: hCA II, Kullanılan standart protein markırları: (6: 130 kDa, 5: 95 kDa, 4: 72 kDa, 3: 55 kDa, 2: 36 kDa, 1: 28 kDa)

Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamidin hCA I İzoenzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları

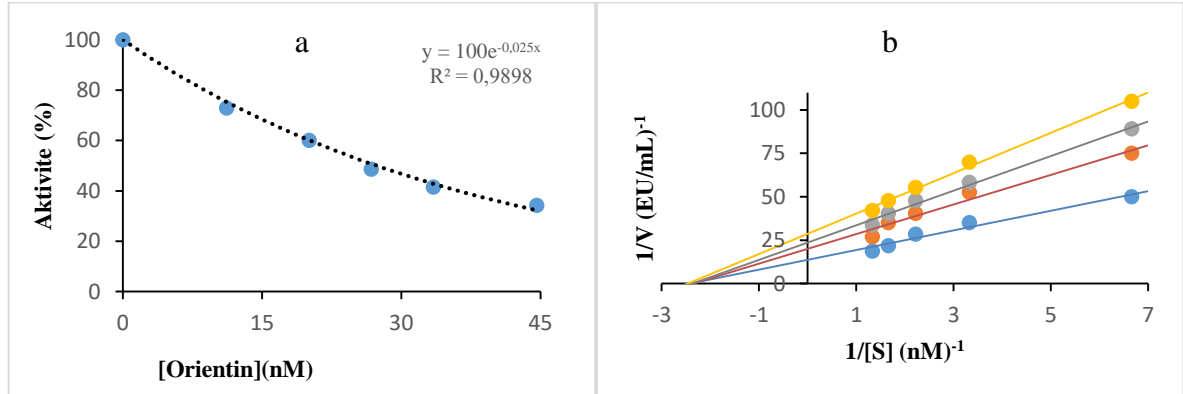
İnsan eritrositinden izole edilen hCA I izoenzimi üzerine, enzimin standart inhibitörü olan asetazolamid ile Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırıldı. Her biri için ayrı ayrı Aktivite (%)-Konsantrasyon ve K_i grafikleri çizilerek IC_{50} , r^2 ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.



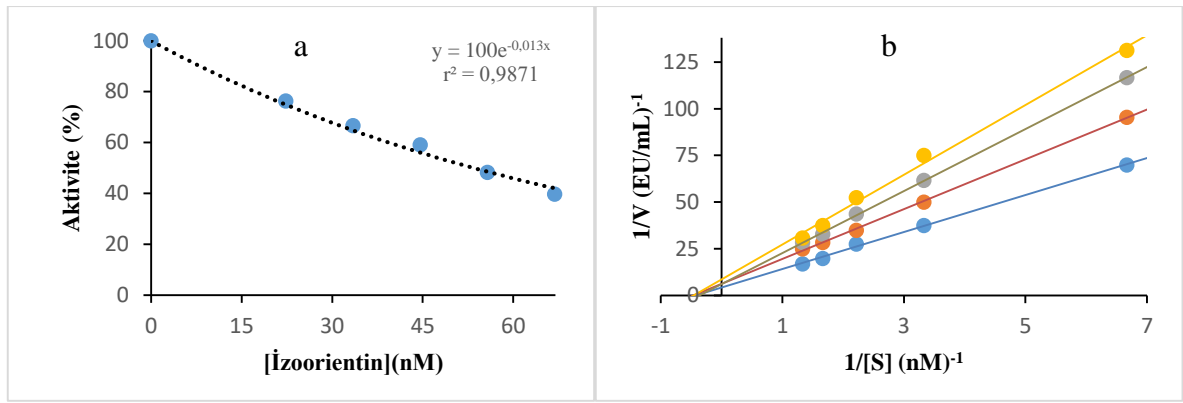
Şekil 24. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



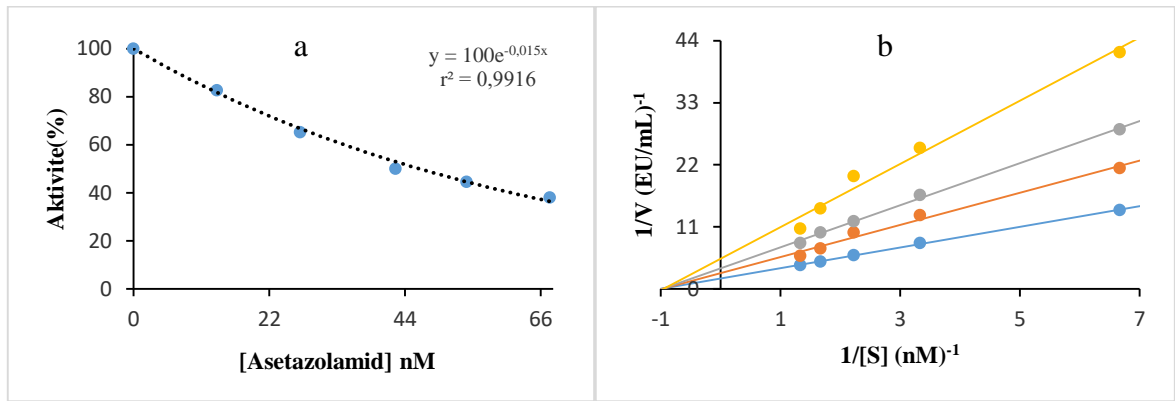
Şekil 25. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



Şekil 26. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



Şekil 27. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan farklı İzoorientin konsantrasyonlarında çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



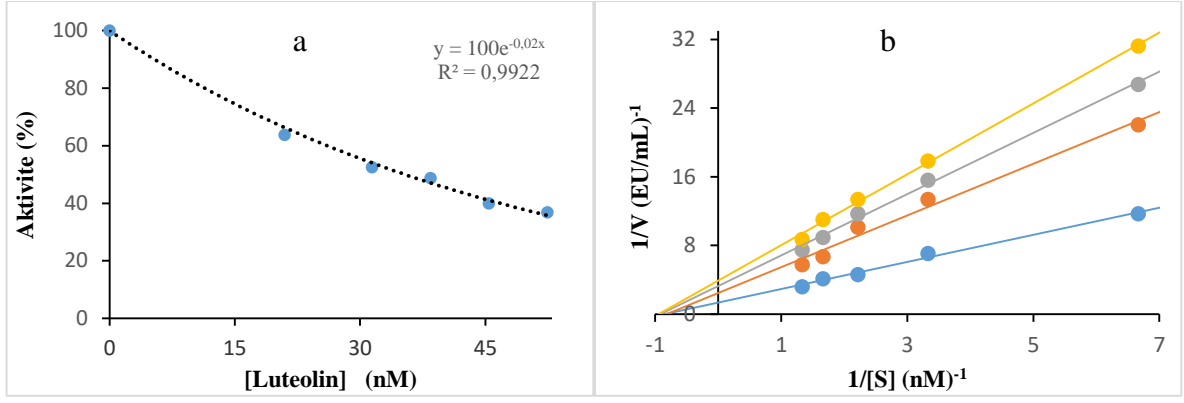
Şekil 28. Asetazolamidin farklı konsantrasyonlarda hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen Aktivite (%)-[Asetazolamid] ve Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri

Tablo 9. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in Esteraz Aktivitesi ile hCA I İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC₅₀, r² ve K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri

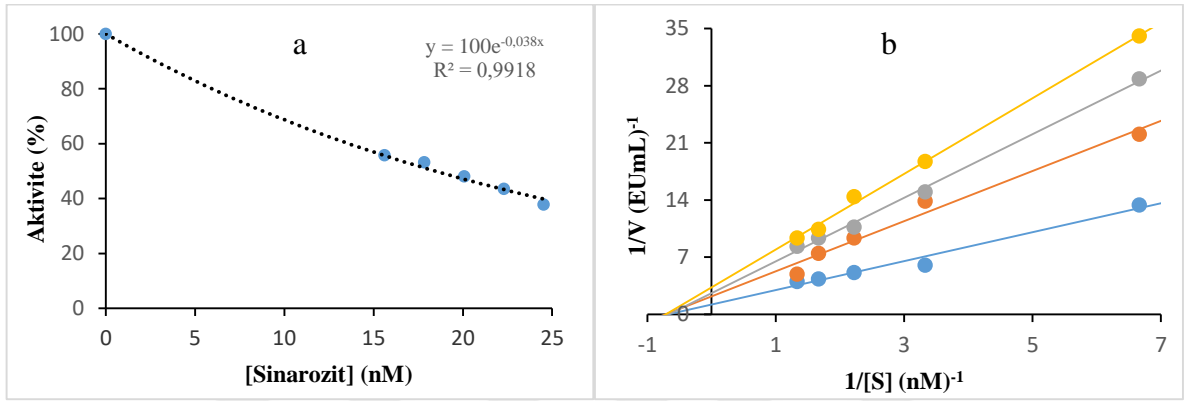
İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	r ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
Luteolin	49,51	0,9932	53,1359 ± 9,1887	Yarışmasız
Sinarozit	34,66	0,9912	40,4791 ± 9,3241	Yarışmasız
Orientin	27,73	0,9898	33,5889 ± 8,8474	Yarışmasız
İzoorientin	53,32	0,9871	94,5155 ± 29,1388	Yarışmasız
Asetazolamit	46,20	0,9922	36,3990 ± 9,0102	Yarışmasız

Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamidin hCA II İzoenzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları

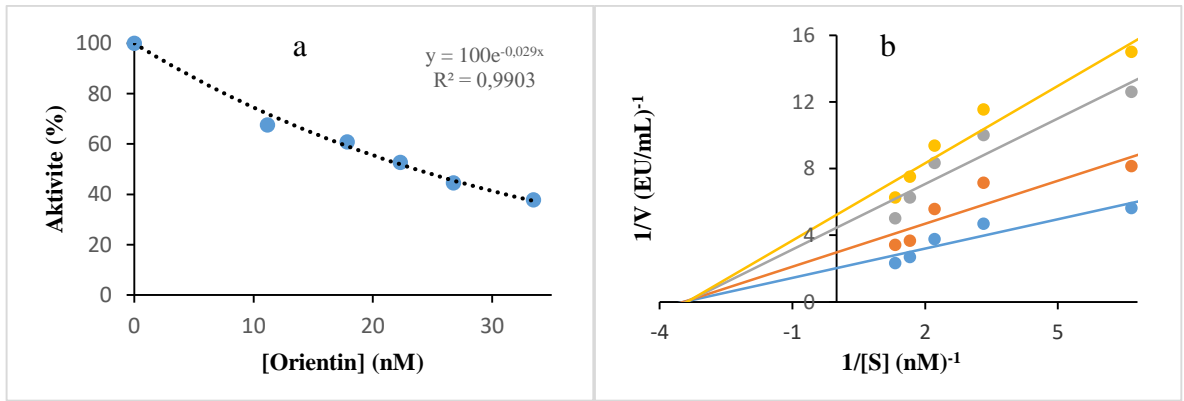
İnsan eritrositinden izole edilen hCA II izoenzimi üzerine, enzimin referans inhibitörü olan asetazolamit ile Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırıldı. Her biri için ayrı ayrı Aktivite (%)-Konsantrasyon ve K_i grafikleri çizilerek IC₅₀, r² ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.



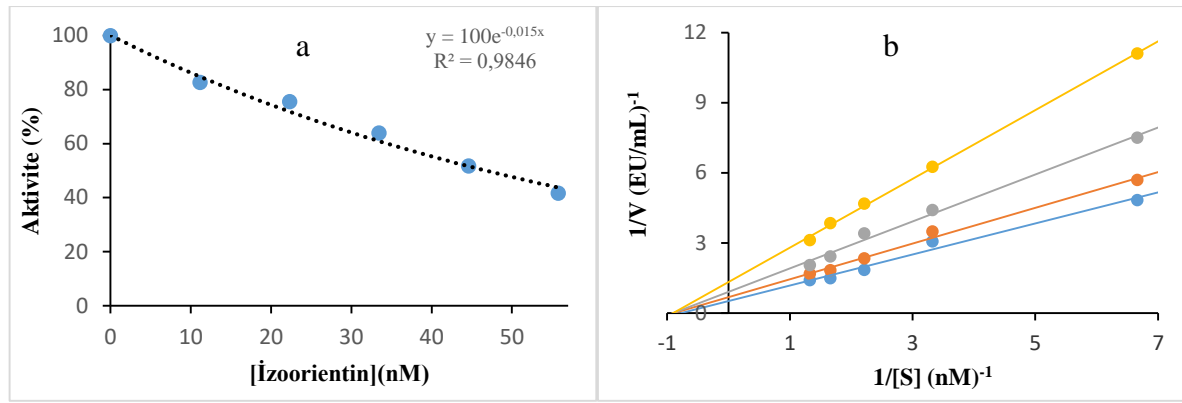
Şekil 29. Luteoli'nin farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



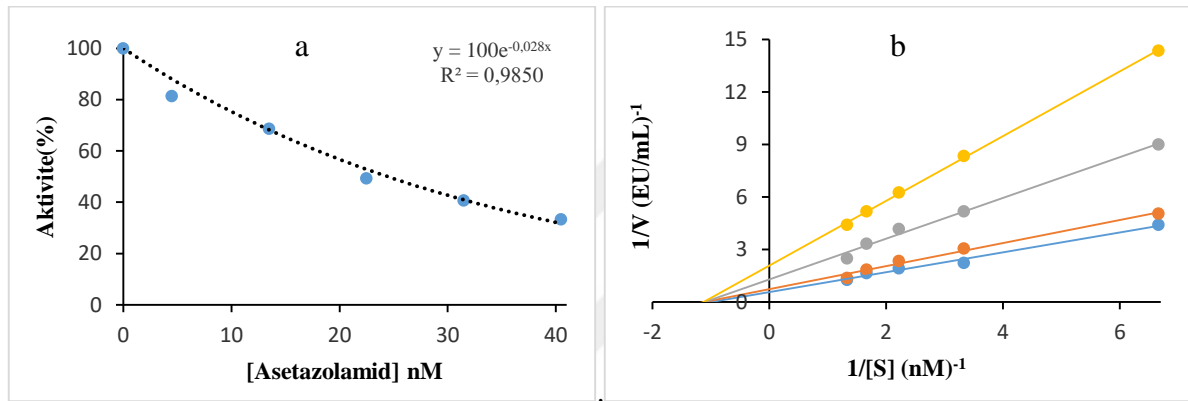
Şekil 30. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 31. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 32. İzoorientin'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



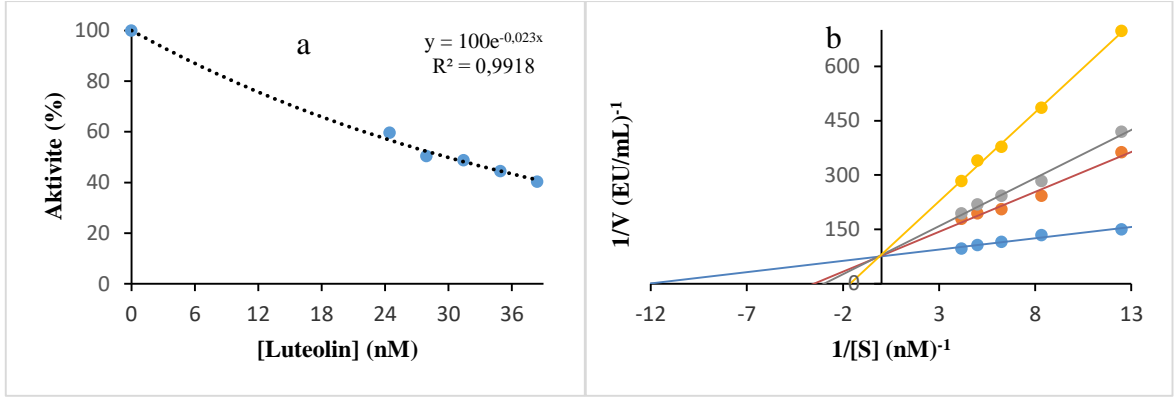
Şekil 33. Asetazolamid'in farklı konsantrasyonlarda hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Asetazolamid] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri

Tablo 10. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in Esteraz Aktivitesi ile hCA II İzoenziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri

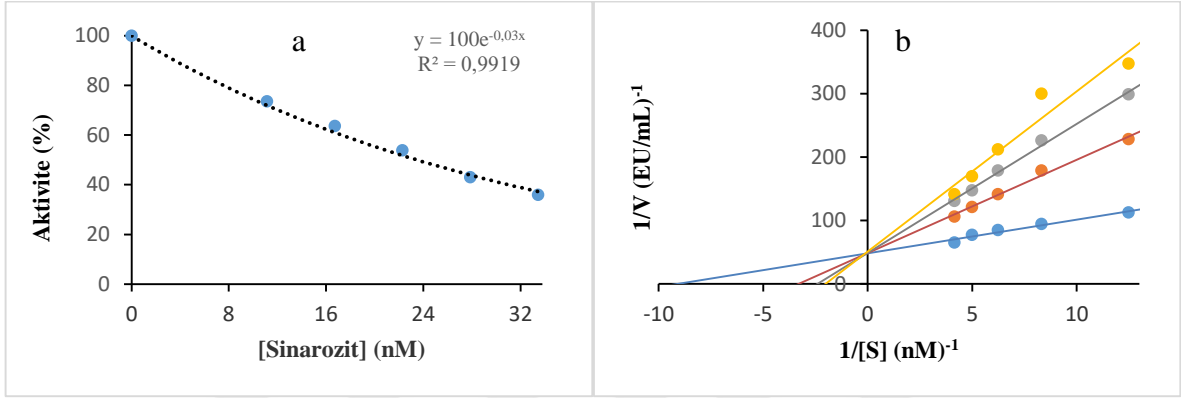
İnhibitör	IC_{50} (nM)	r^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Luteolin	34,66	0,9922	$26,9180 \pm 1,0778$	Yarışmasız
Sinarozit	18,25	0,9918	$16,1906 \pm 1,0072$	Yarışmasız
Orientin	23,90	0,9903	$21,2315 \pm 2,6920$	Yarışmasız
İzoorientin	46,21	0,9846	$55,2235 \pm 12,3025$	Yarışmasız
Asetazolamid	24,75	0,9850	$16,6020 \pm 1,2900$	Yarışmasız

Luteolin ve Türevleri ile Takrin'in AChE Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları

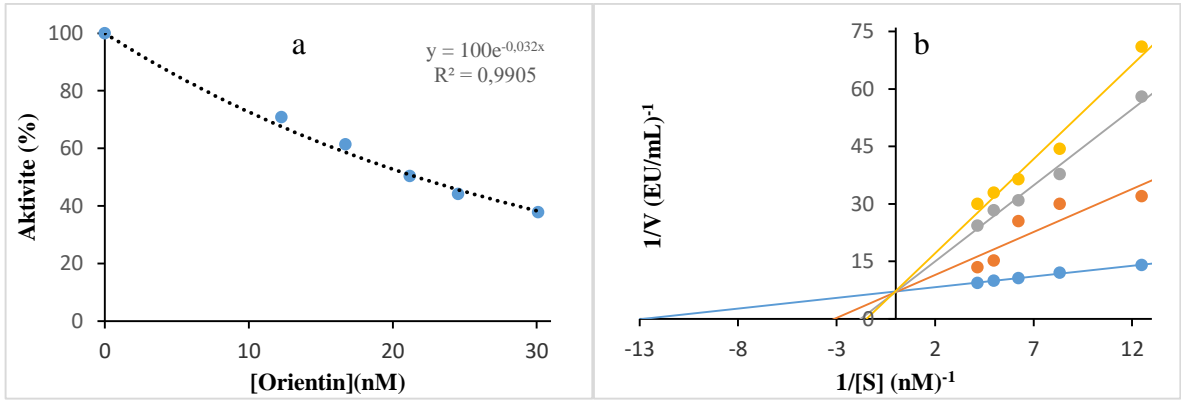
AChE enzimi üzerine, enzimin standart inhibitörü olan Takrin ile Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırıldı. Her biri için ayrı ayrı Aktivite (%)-Konsantrasyon ve K_i grafikleri çizilerek IC_{50} , r^2 ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.



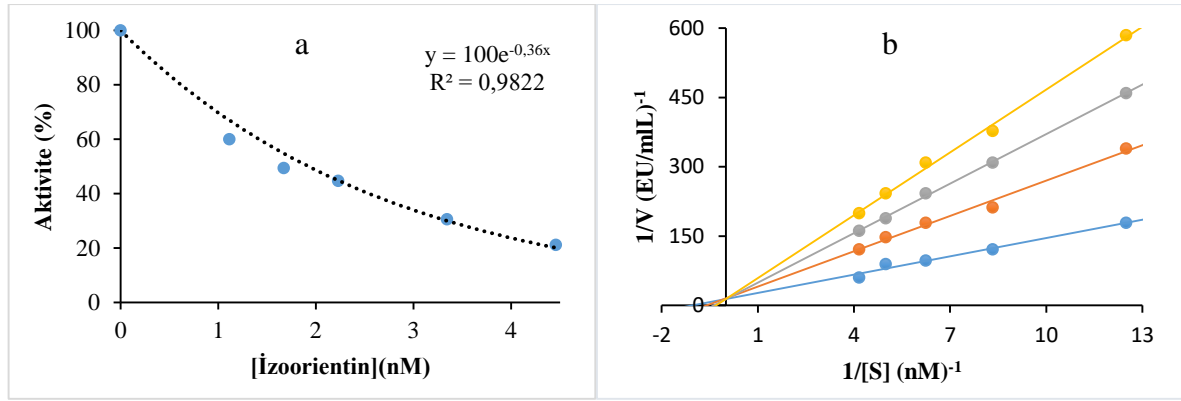
Şekil 34. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk(Ki) grafikleri



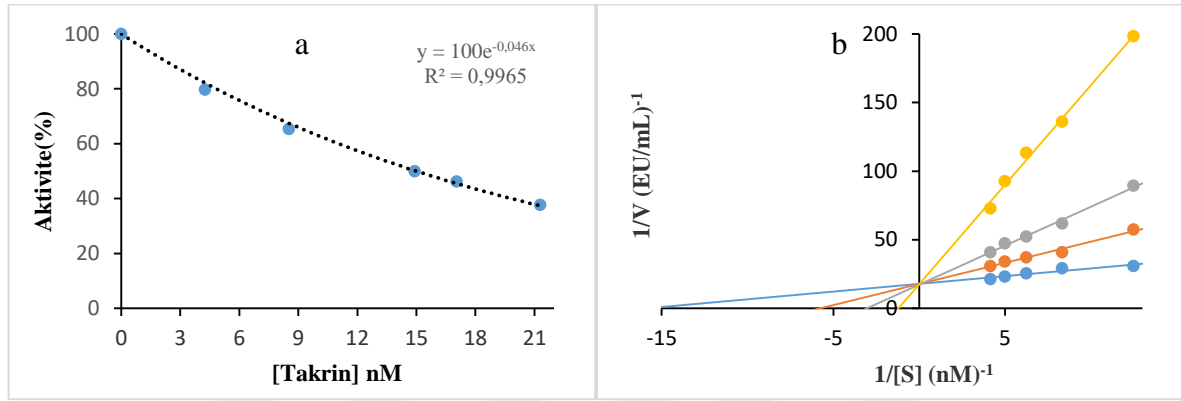
Şekil 35. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 36. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 37. İzoorientin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzoorientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



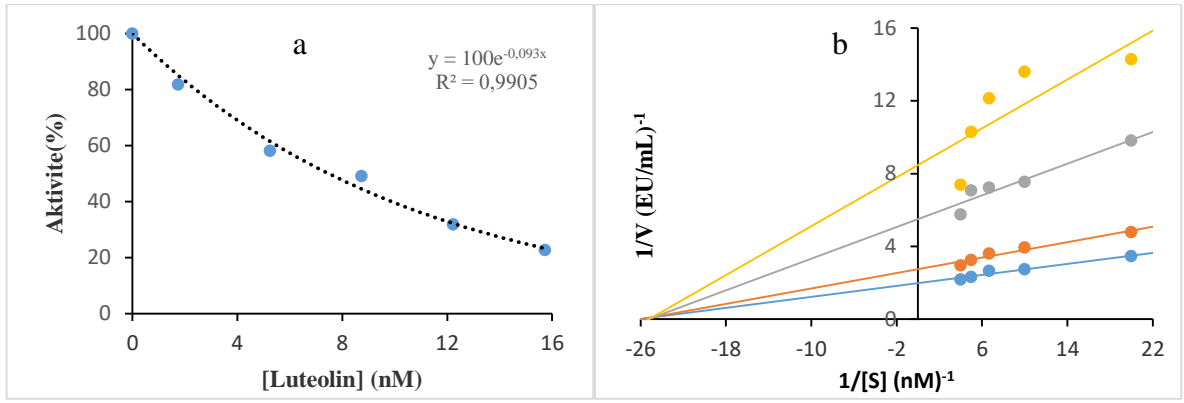
Şekil 38. Takrin'in farklı konsantrasyonlarda AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Takrin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri

Tablo 11. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in AChE Enziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i değerleri ve İnhibisyon Türleri

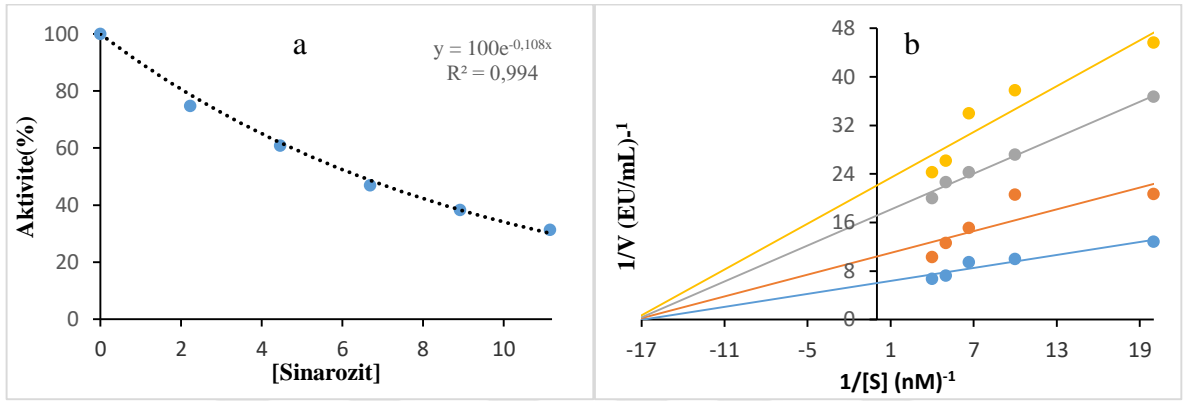
İnhibitör	IC_{50} (nM)	r^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Luteolin	49.51	0,9932	9,242±2,820	Yarışmalı
Sinarozit	34.65	0,9912	8,499±0,870	Yarışmalı
Orientin	21,66	0,9905	4,0153±1,1883	Yarışmalı
İzoorientin	1,93	0,9822	1,4214±0,1301	Yarışmalı
Takrin	15,06	0,9965	2,586±0,90	Yarışmalı

Luteolin ve Türevleri ile Takrin'in BChE Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları

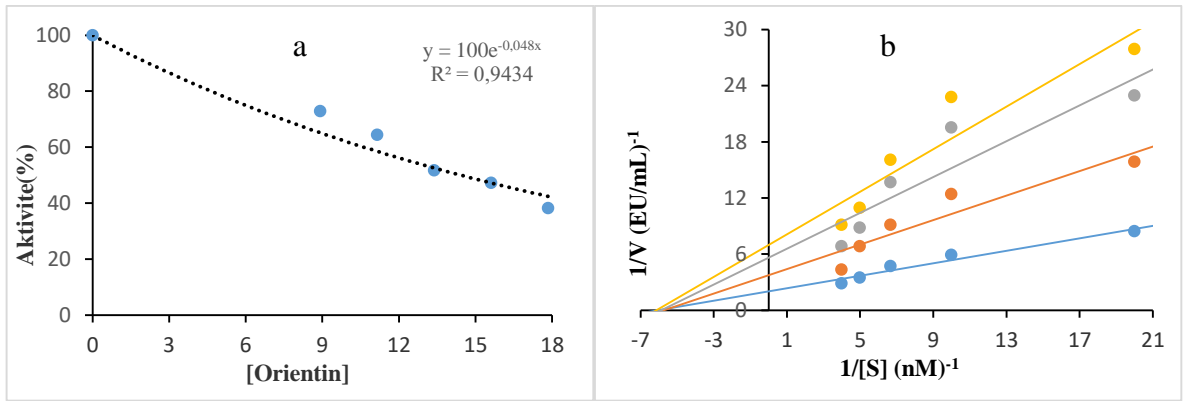
BChE enzimi üzerine, enzimin standart inhibitörü olan Takrin ile Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırıldı. Her biri için ayrı ayrı Aktivite (%)-Konsantrasyon ve K_i grafikleri çizilerek IC_{50} , r^2 ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.



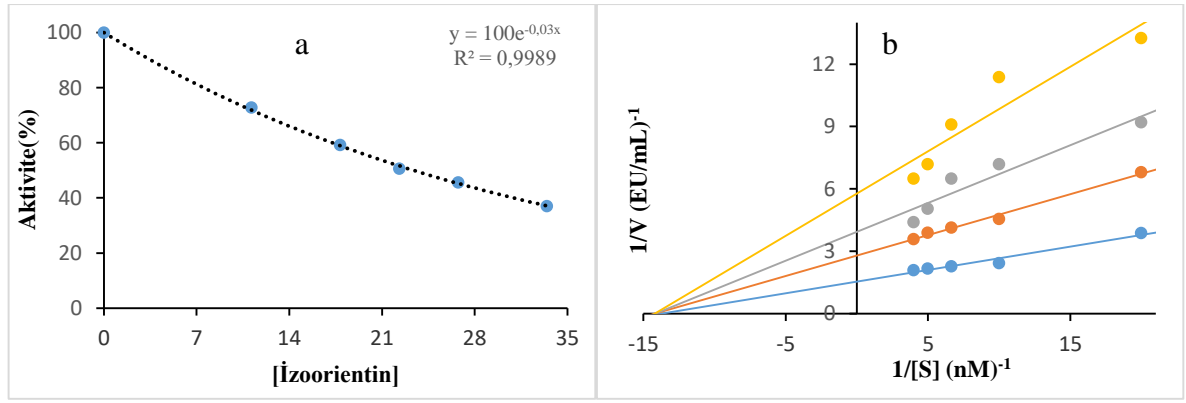
Şekil 39. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki)



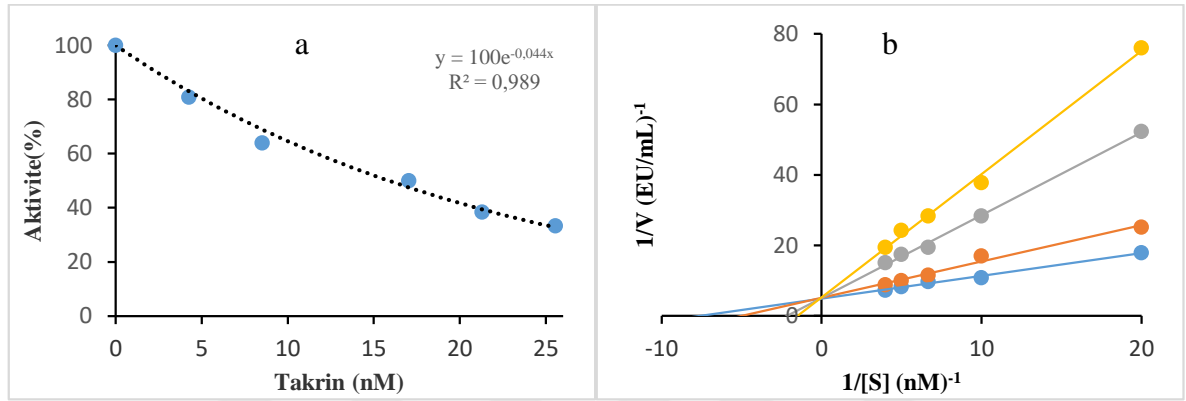
Şekil 40. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 41. Orientin'in BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla ile farklı konsantrasyonunda çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 42 İzorientin'in BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonunda çizilen a) Aktivite (%)-[İzorientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri



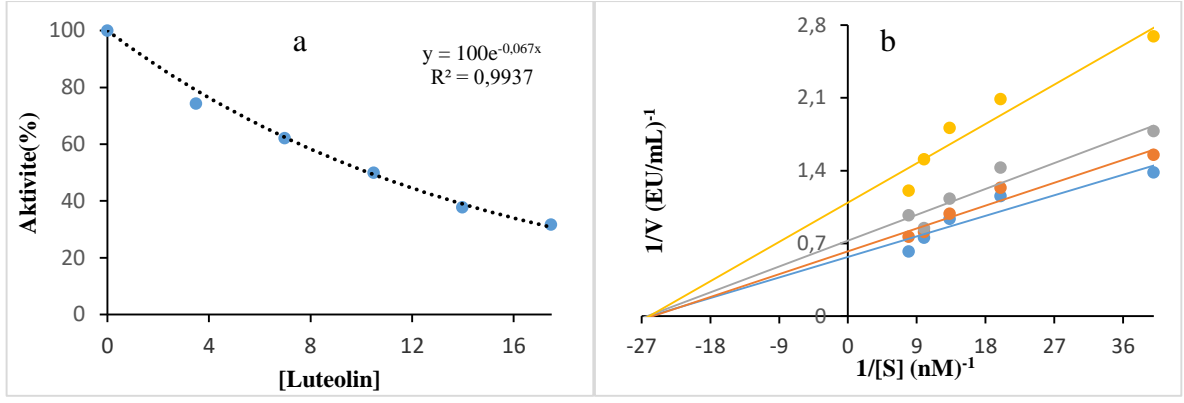
Şekil 43. Takrin'in farklı konsantrasyonlarda BChE enzim üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Takrin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri

Tablo 12. Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in BChE Enziminin Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri

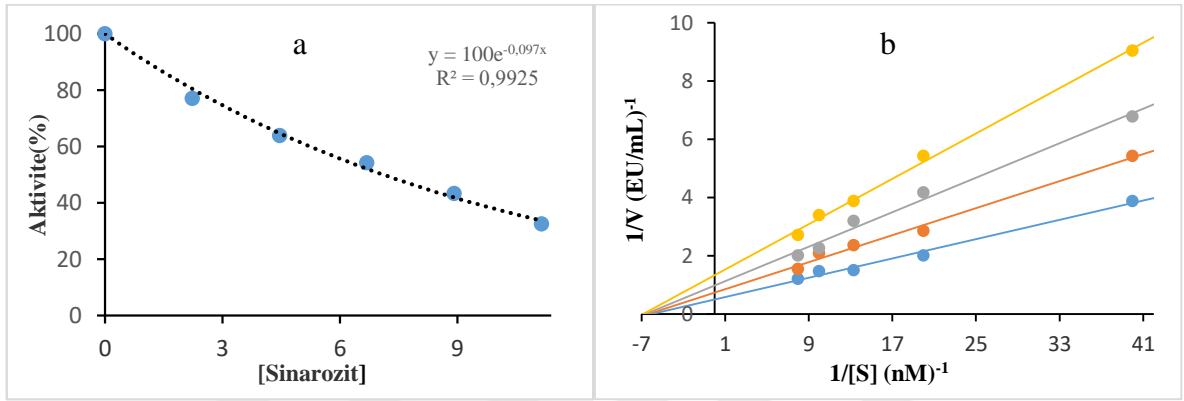
İnhibitör	IC_{50} (nM)	r^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Luteolin	7,45	0,9905	4,7606±0,1948	Yarışmasız
Sinarozit	6,42	0,9940	3,5858±0,5642	Yarışmasız
Orientin	14,44	0,9434	8,4867±1,8231	Yarışmasız
İzorientin	23,11	0,9989	15,6225±10,5352	Yarışmasız
Takrin	15,75	0,9890	7,0760±0,9000	Yarışmalı

Luteolin ve Türevlerinin α -Glikozidaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi ile İlgili Çalışma Sonuçları

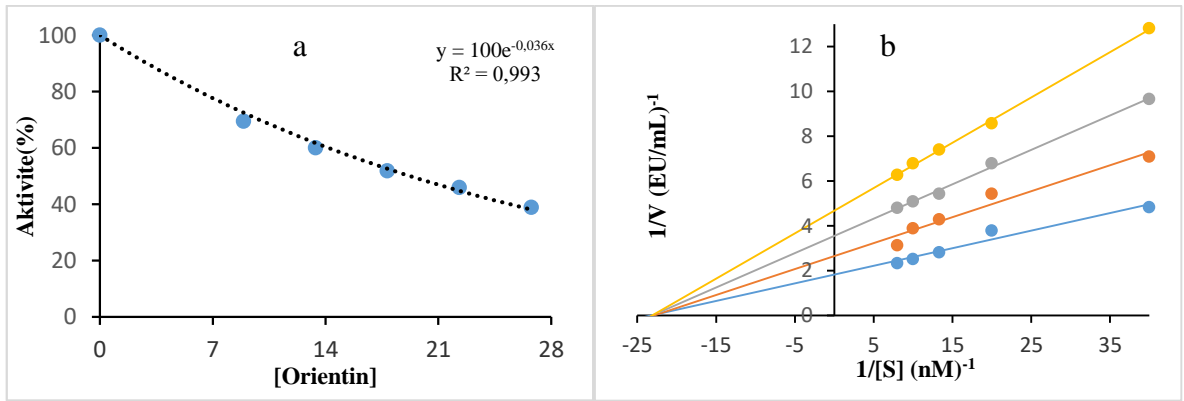
α -Glikozidaz enzimi üzerine, Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkisi farklı konsantrasyonlarda araştırıldı. Her biri için ayrı ayrı Aktivite (%)-Konsantrasyon ve K_i grafikleri çizilerek IC_{50} , r^2 ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.



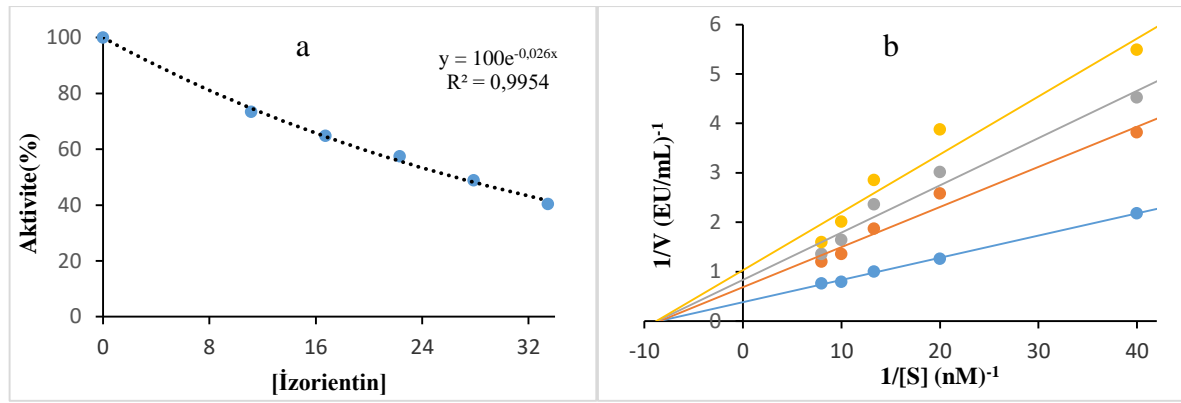
Şekil 44. Luteolin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Luteolin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 45. Sinarozit'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Sinarozit] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 46. Orientin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[Orientin] b) Lineweaver-Burk (Ki) grafikleri



Şekil 47. İzorientin'in farklı konsantrasyonlarda α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemek için çizilen a) Aktivite (%)-[İzorientin] b) Lineweaver-Burk (K_i) grafikleri

Tablo 13. Luteolin ve Türevlerinin α -Glikozidaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisini Gösteren IC_{50} , r^2 , K_i Değerleri ve İnhibisyon Türleri

İnhibitör	IC_{50} (nM)	r^2	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon türü
Luteolin	10,35	0,9937	32,0197±9,0665	Yarışmasız
Sinarozit	7,15	0,9925	6,0876±1,2239	Yarışmasız
Orientin	19,25	0,9930	27,6295±27,4886	Yarışmasız
İzorientin	26,66	0,9954	23,8768± 4,1329	Yarışmasız

Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Luteolin ve türevi glikozitler için her bir enzim ile olası etkileşimleri ve bağlanma afiniteleri moleküler yerleştirme programı Schrödinger Molecular Modeling Suite (Maestro 12.9'un yerleştirme programı) ile belirlendi (Schrödinger 2021).

Tablo 14. Luteolin ve Türevi Glikozitler ile Referans Moleküllerin hCA I ve hCA II İzozimleri, Astilkinesteraz, Bütirikolinesteraz ve α -Glikozidaz Enzimleri ile Moleküler Similasyon Yerleştirme Sonuçları

	Yerleşme Değeri	XP G Değeri	Kayma G değeri	Kayma Modeli
Karbonik Anhidraz I (PDB: 4WR7)				
Luteolin	-7.241	-7.281	-7.281	-51.043
Orientin	-9.903	-9.938	-9.938	-50.823
Sinarozit	-9.596	-9.596	-9.596	-68.011
İzorientin	-9.257	-9.301	-9.301	-63.728
Asetazolamit	-6.581	-7.504	-7.504	-48.265
Karbonik Anhidraz II (PDB: 5AML)				
Luteolin	-6.176	-6.216	-6.216	-57.303
Orientin	-8.873	-8.909	-8.909	-38.306
Sinarozit	-8.778	-8.778	-8.778	-68.736
İzorientin	-8.499	-8.543	-8.543	-77.747
Asetazolamit	-6.313	-7.235	-7.235	-57.775

Tablo 14. (Devamı)

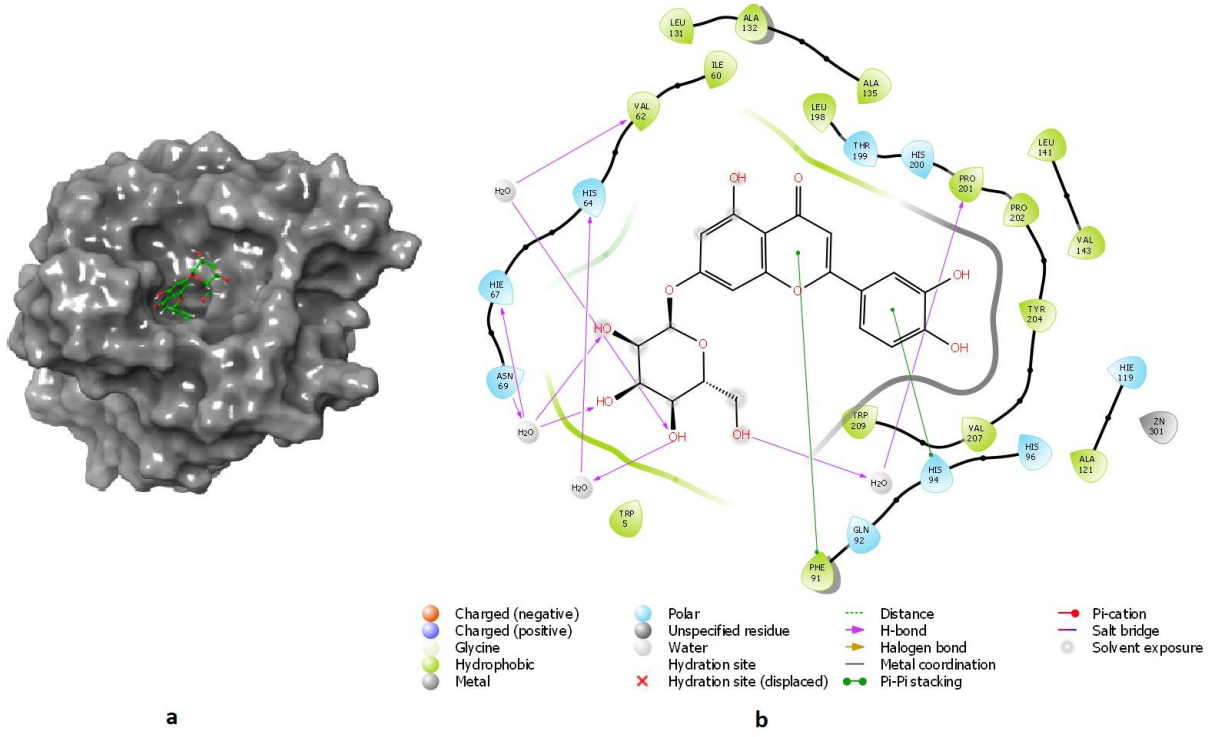
Astilkolinesteraz (PDB: 4TVK)				
Luteolin	-9.154	-9.194	-9.194	-43.679
Orientin	-14.354	-14.389	-14.389	-16.410
Sinarozit	-12.788	-12.788	-12.788	-85.209
İzoorientin	-13.954	-13.998	-13.998	-84.038
Asetazolamit	-12.126	-12.126	-12.126	-54.165
Bütirilkolinesteraz (PDB: 4TPK)				
Luteolin	-8.891	-8.931	-8.931	-55.884
Orientin	-13.418	-13.454	-13.454	-79.438
Sinarozit	-11.161	-11.161	-11.161	-82.345
İzoorientin	-10.751	-10.796	-10.796	-78.467
Takrin	-7.606	-7.607	-7.607	-39.466
α-Glikozidaz (PDB: 3L4Y)				
Luteolin	-7.438	-7.477	-7.477	-59.885
Orientin	-10.460	-10.496	-10.496	-53.980
Sinarozit	-12.807	-12.807	-12.807	-62.135
İzoorientin	-12.354	-12.398	-12.398	-86.368
Akarboz	-16.526	-16.854	-16.854	-98.119

CAI ve CA II izoenzimleri moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları

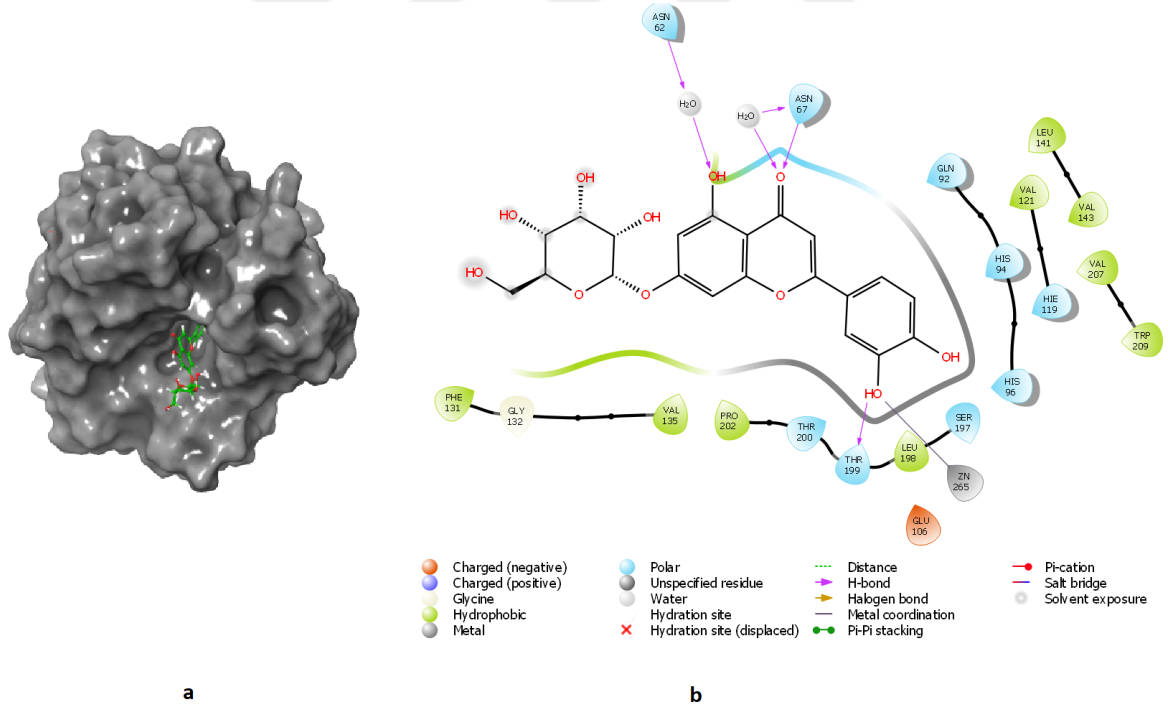
CAI ve CA II izoenzimleri ile moleküllerin moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları ile çalışılmış olan deneysel sonuçlar karşılaştırıldığında moleküllerin benzer inhibisyon etkisi olduğu söylenebilir. Yerleştirme sonuçlarına göre dört molekülde pozitif kontrol bileşiği olan asetazolamitten daha iyi bir yerleştirme puanına ve daha düşük serbest bağlanma enerjisine sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 14).

Moleküllerden Orientin'in CA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisinin, deneysel çalışma sonuçlarında olduğu gibi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçlarında da (diğer moleküllerden daha yüksek bir yerleştirme puanına ve daha düşük serbest bağlanma enerjisine sahip olduğu için) en yüksek molekül olduğunu göstermiştir. Orientin için moleküler yerleştirme ligant etkileşimleri ayrıntılı olarak incelendiğinde Orientin'in Asn69, His64, His67, His69, His94, His200, Thr199 sekiz amino asit ile polar etkileşimde olduğu; Ala121, Ala132, Ala135, Leu131, Leu141, Leu198, Leu203, Pro91, Pro3, Pro201, Pro202, Trp5, Tyr204, Val62 on dört amino asit ile de hidrofobik etkileşimde olduğu gözlemlendi (Şekil 52).

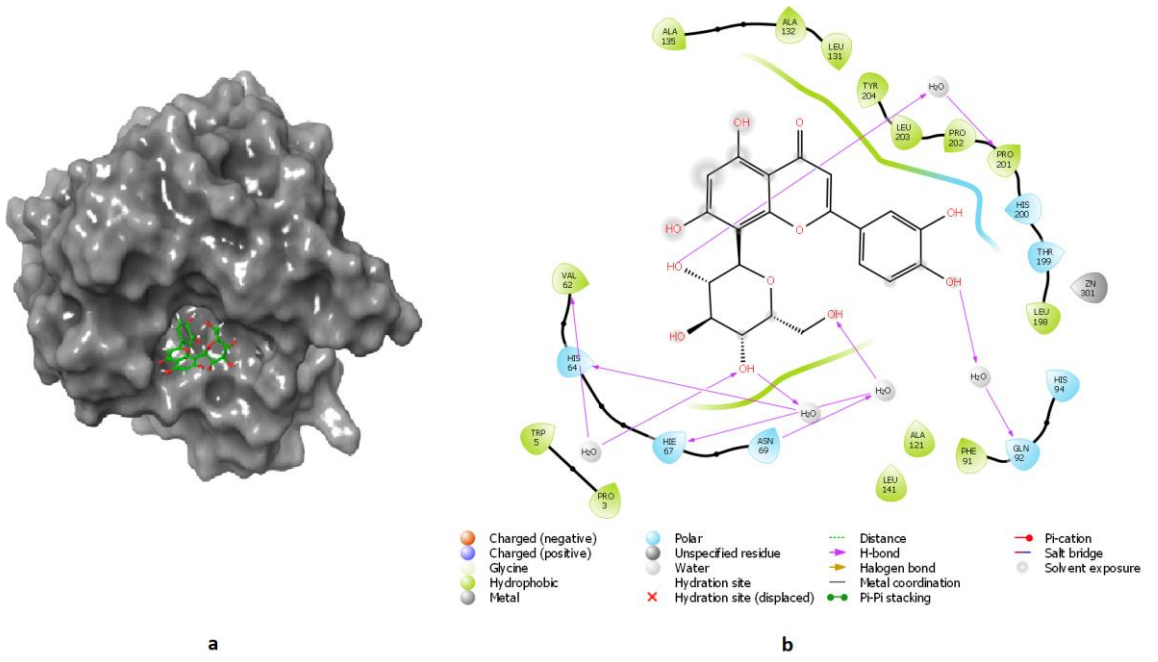
CA II enzimi üzerine moleküllerin inhibisyon ekişine bakıldığında deneysel çalışma sonuçlarına paralel olarak Orientin'in ve Sinarozitin'in diğer moleküllere oranla daha yüksek bir yerleştirme puanına (Orientin'in:-8,873, Sinarozit: -8,778) ve daha düşük serbest bağlanma enerjisine sahip olduğu yani enzim üzerine inhibisyon etkisi en yüksek olan moleküller olduğu tespit edildi. Orientin-CA II için moleküler yerleştirme ligant etkileşimleri ayrıntılı olarak



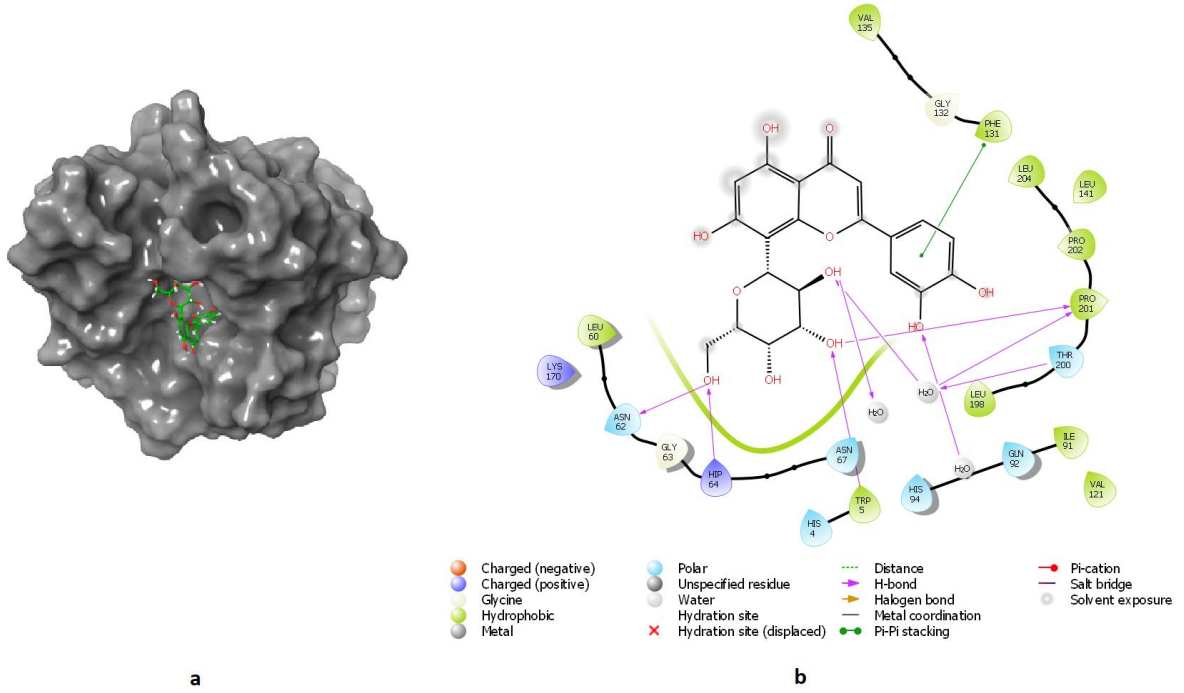
Şekil 50. CA I izoenzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



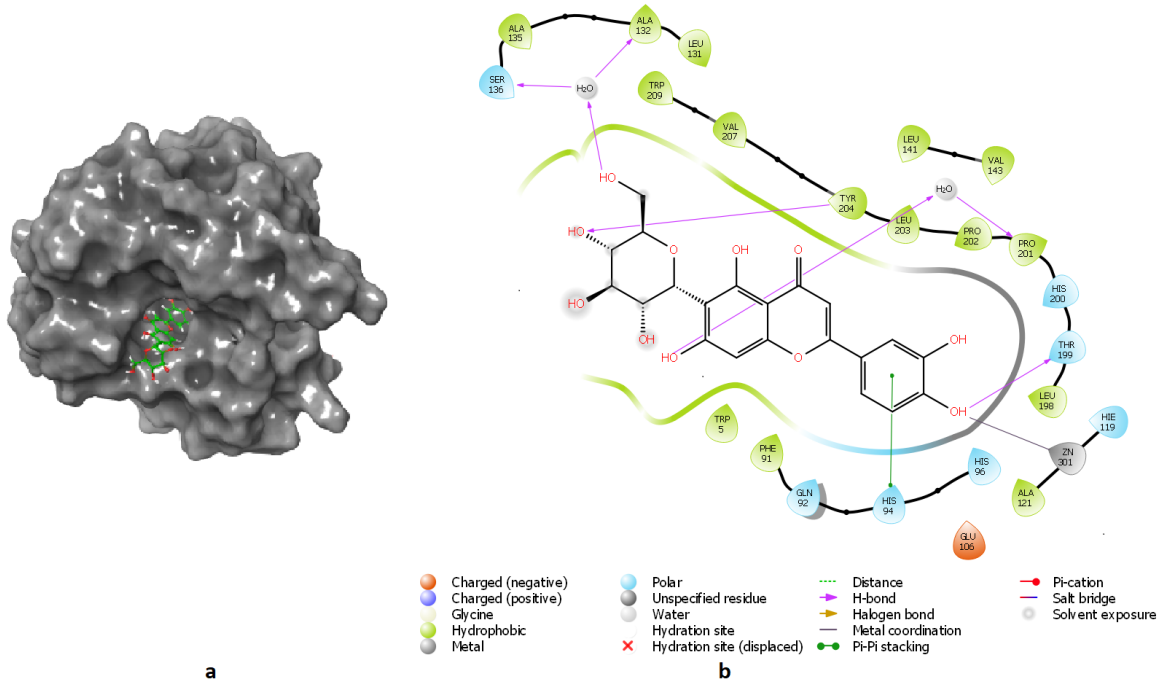
Şekil 51. CA II izoenzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



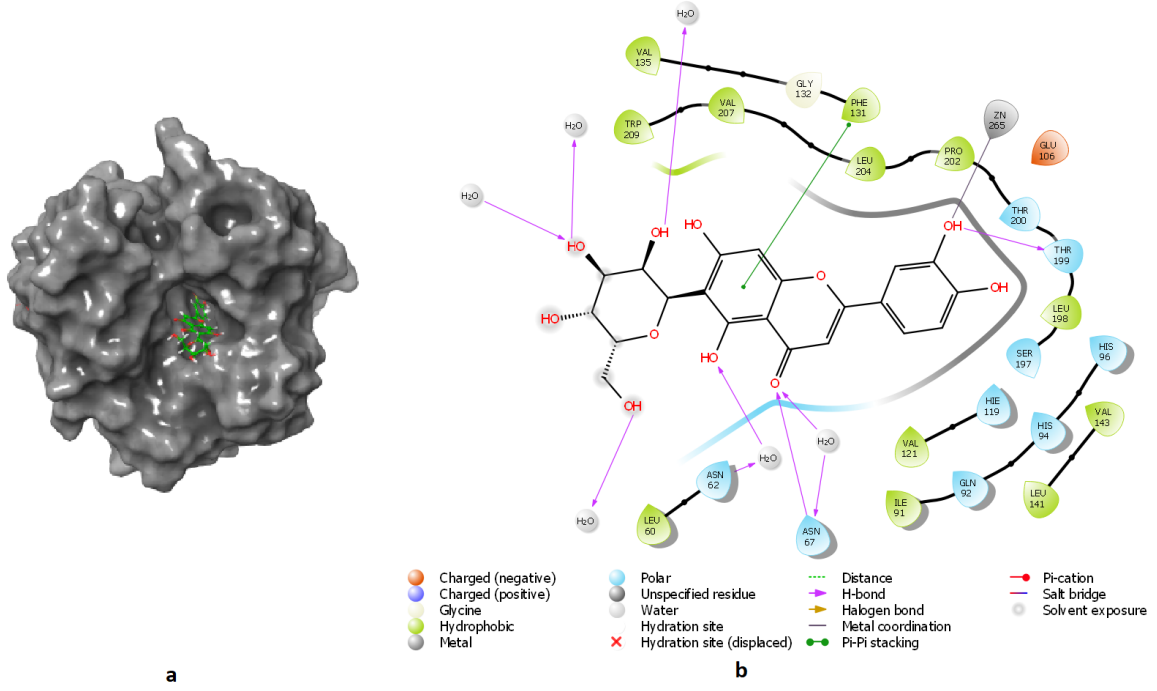
Şekil 52. CA I izoenzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 53. CA II izoenzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



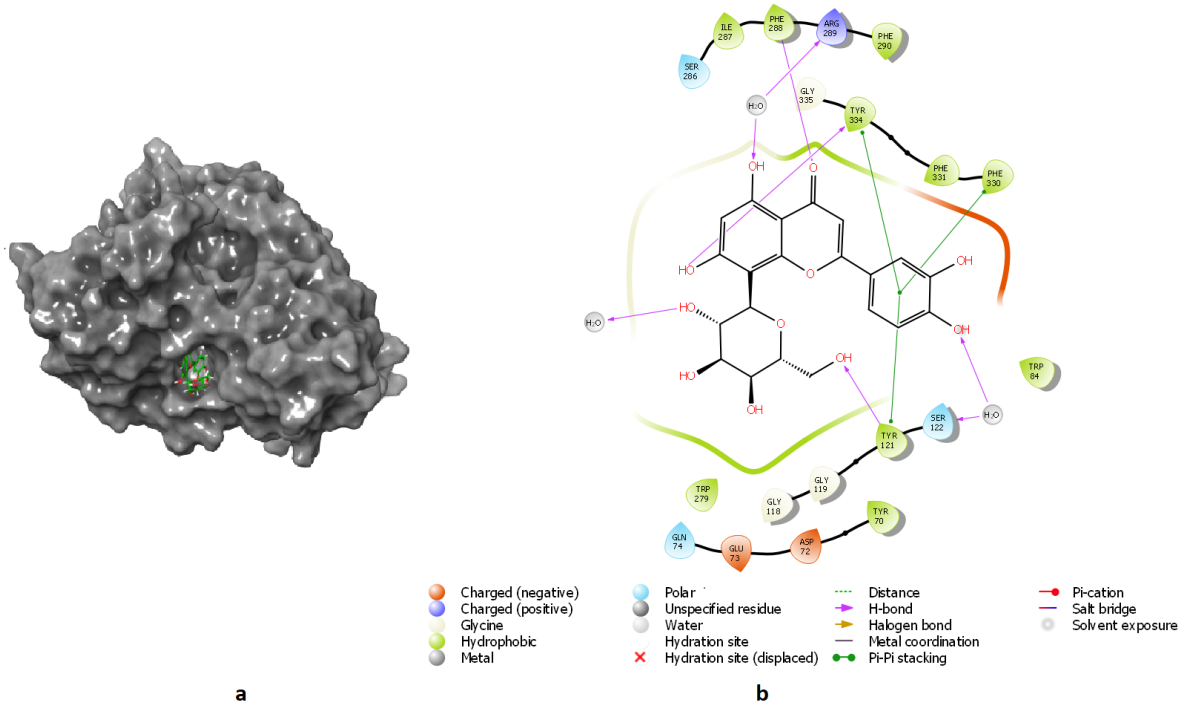
Şekil 54. CA I izoenzimli İzoorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



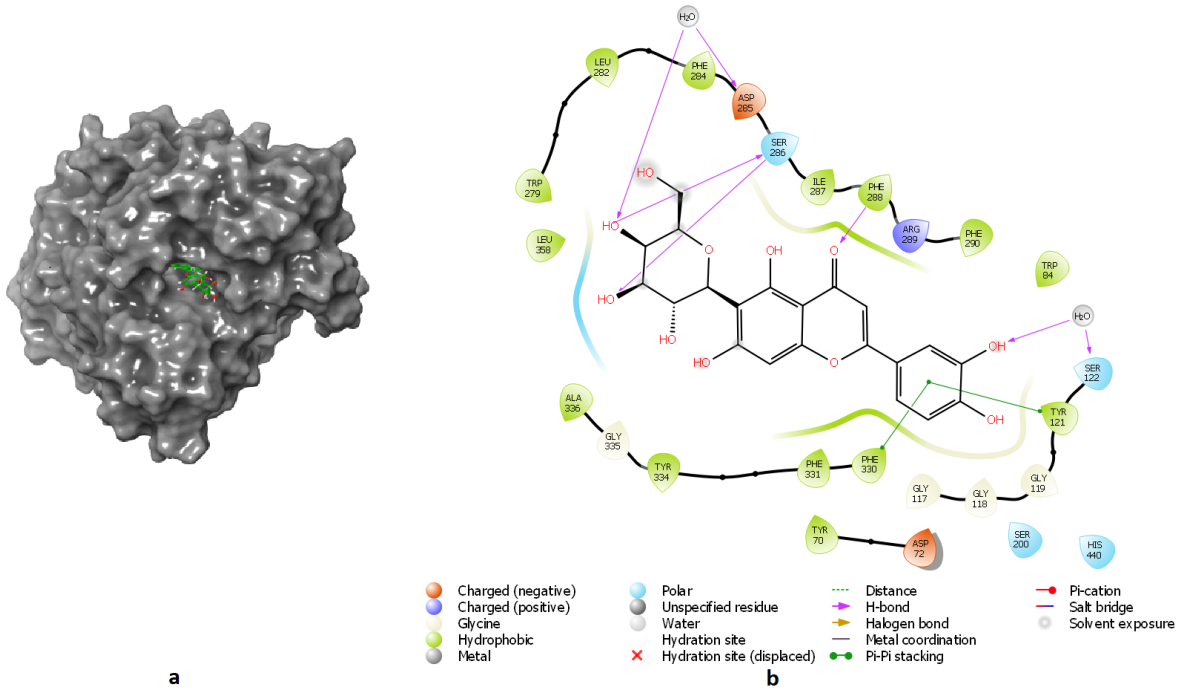
Şekil 55. CA II izoenzimli İzoorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

ACHe enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları

ACHe enzimi ile Luteolin ve türevi glikozitler ile pozitif referans molekül olan Takrin için gerçekleştirilen moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırıldığında büyük oranda paralel inhibisyon sıralaması görülmektedir. Yerleştirme sonuçları pozitif kontrol bileşiği olan Takrin ile kıyaslandığında Luteolin dışındaki



Şekil 58. AChE enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

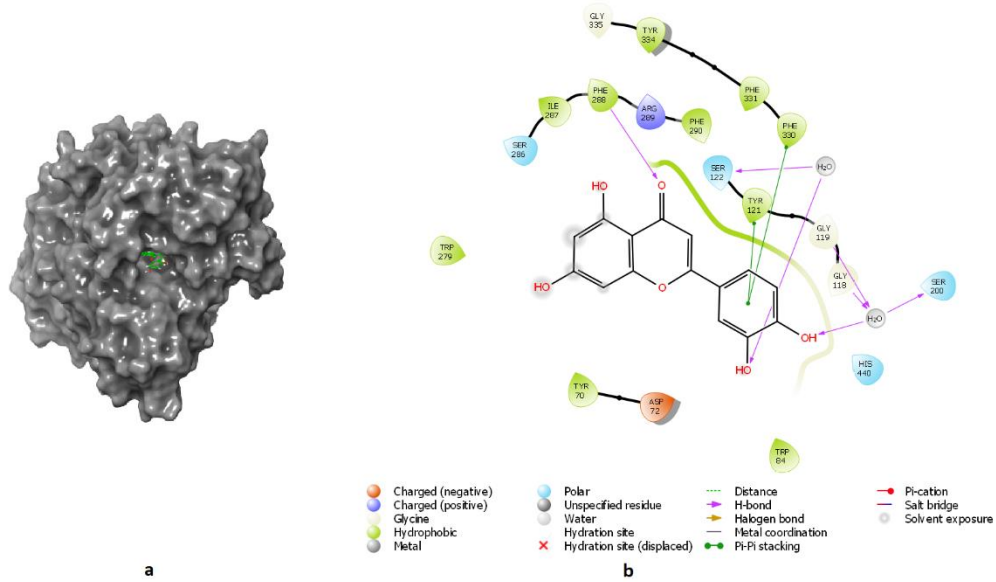


Şekil 59. AChE enzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

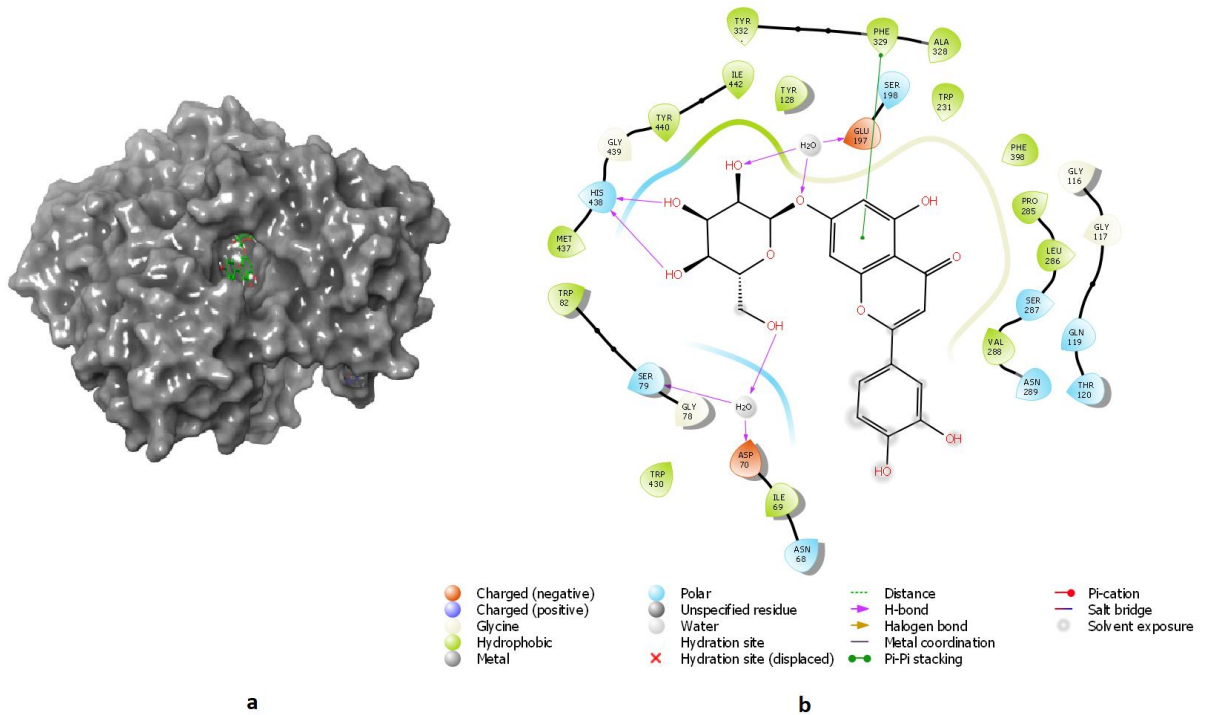
BChE enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları

BChE enzimi ile Luteolin ve türevi glikozitler ile pozitif referans molekül olan Takrin için gerçekleştirilen moleküler simülasyon yerleştirme sonuçlarına göre pozitif kontrol bileşiği olan Takrin ile kıyaslandığında moleküllerin daha yüksek bir yerleştirme puanına ve daha düşük serbest bağlanma enerjisine daha sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 14).

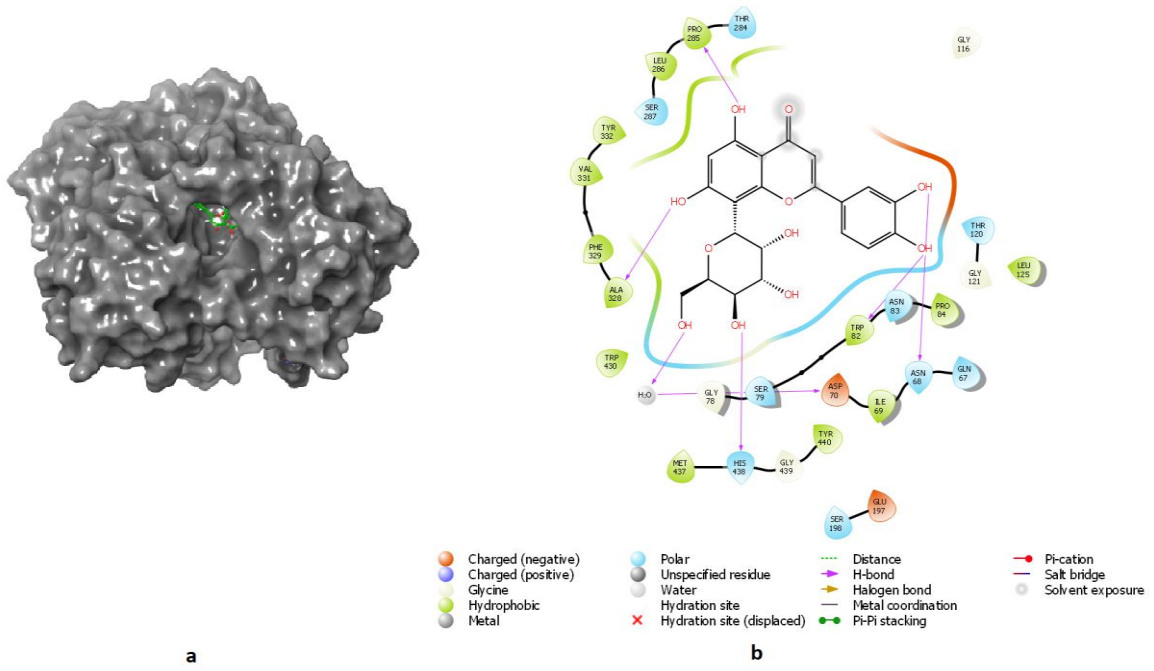
Moleküllerden Orientinin moleküler simülasyon yerleştirme sonuçlarına göre BChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi en yüksek molekül olduğunu görüldü. Orientin için moleküler yerleştirme ligant etkileşimleri ayrıntılı olarak incelendiğinde Orientin'in sekiz amino asit ile polar etkileşimde olduğu; on üç amino asit ile de hidrofobik etkileşimde olduğu gözlemlendi (Şekil 63).



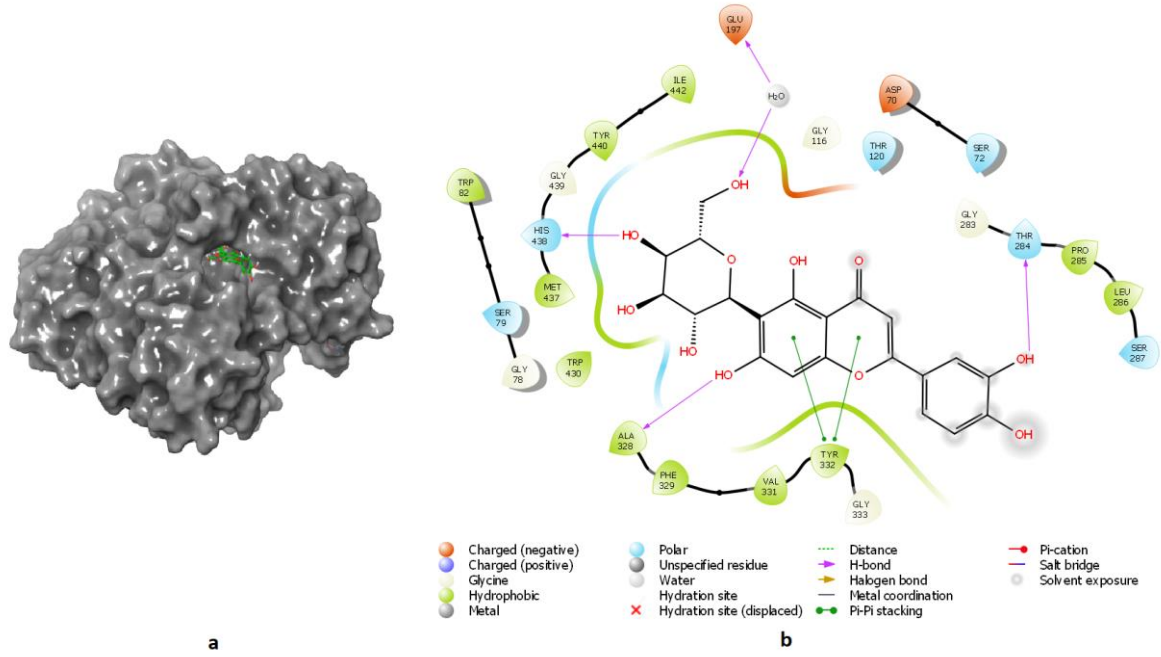
Şekil 60. BChE enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 61. BChE enzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 62. BChE enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

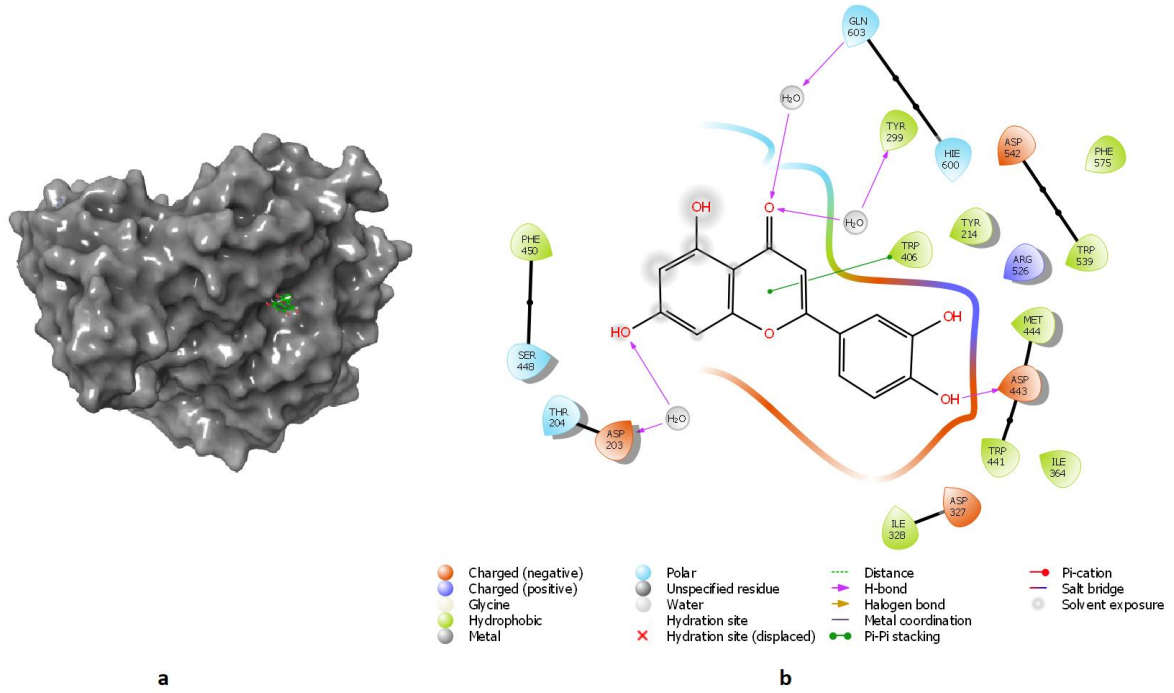


Şekil 63. BChE enzimli İzorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

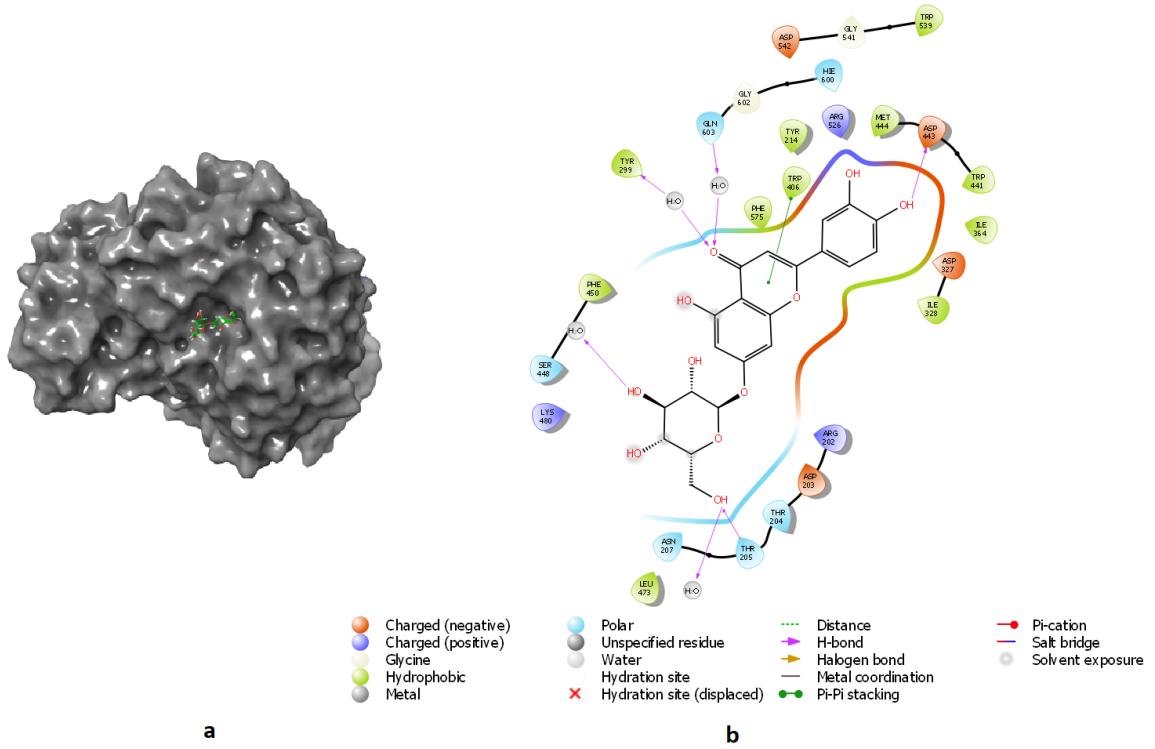
α -Glikozidaz enzimi moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları

α -Glikozidaz enzimi ile Luteolin ve türevi glikozitler ile pozitif referans molekül olan Takrin için gerçekleştirilen moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırıldığında büyük oranda benzerlik görülmektedir(Tablo

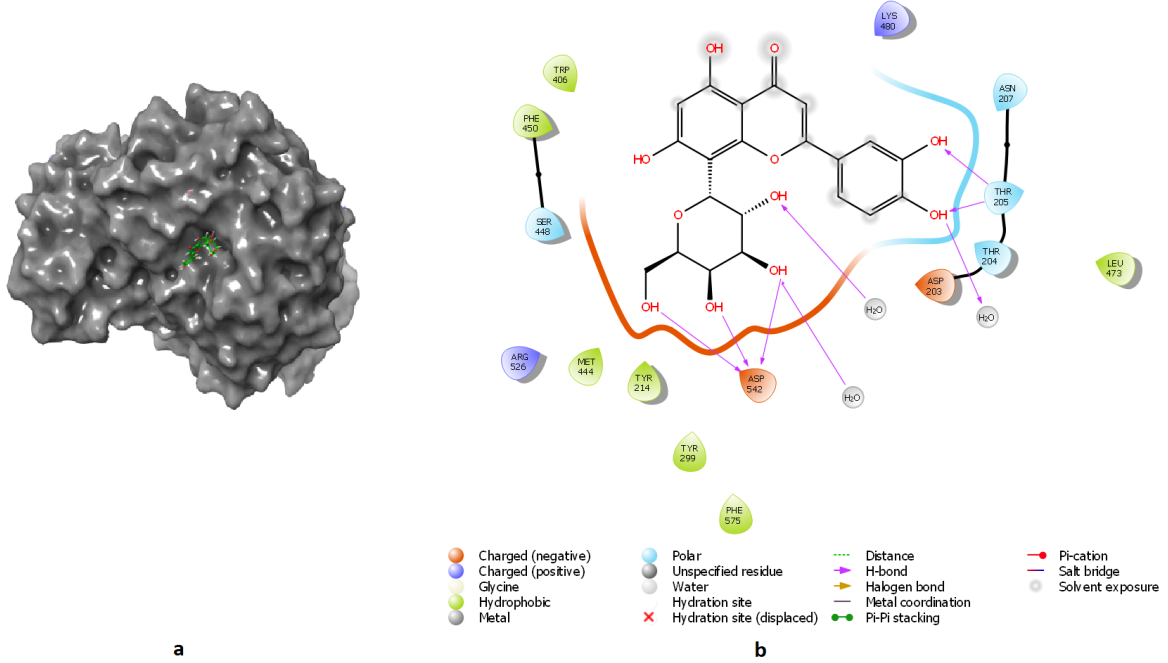
Moleküllerden Sinarozit'in moleküler simülasyon yerleştirme sonuçlarına göre α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi en yüksek molekül olduğunu görüldü. Sinarozit için moleküler yerleştirme ligant etkileşimleri ayrıntılı olarak incelendiğinde Sinarozit'in altı amino asit ile polar etkileşimde olduğu; on bir amino asit ile de hidrofobik etkileşimde olduğu gözlemlendi (Şekil 66).



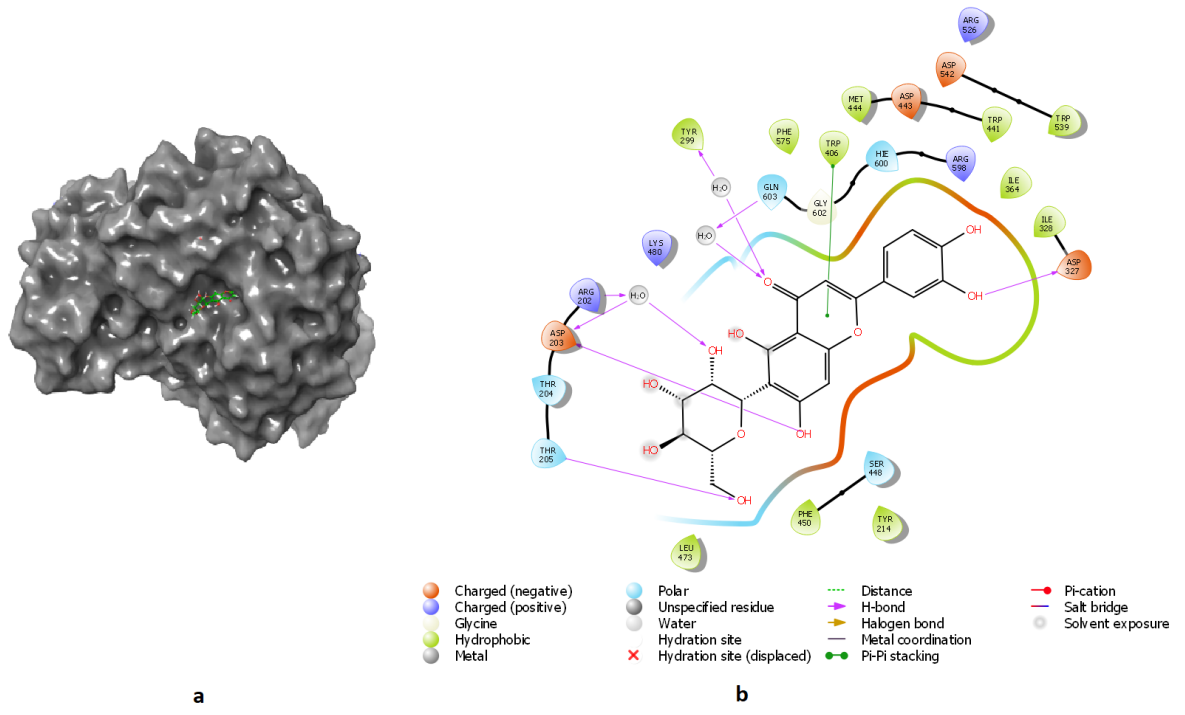
Şekil 64. α -Glikozidaz enzimli Luteolin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 65. α -Glikozidaz enzimli Sinarozit'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 66. α -Glikozidaz enzimli Orientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri



Şekil 67. α -Glikozidaz enzimli İzoorientin'e ait a) 3B kenetlenme pozları ve b) İki boyutlu (2B) ligant etkileşimleri

TARTIŞMA VE SONUÇ

Vücutta oluşan serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan yapılar antioksidanlar olarak bilinmektedir. Antioksidanlar vücut için koruyucu etkilerinin yanında gıda ve farmasötik ürünlerde de oksidatif şekilde bozulmaları ve meydana gelebilecek patolojik süreçleri engelleme yeteneklerine sahiptir. Bu nedenle her geçen gün antioksidanlara olan ilgi artmaktadır. Bitkilerde ve bitki kaynaklı ürünlerde antioksidan yeteneklerinin belirlenmesi için reaksiyon kinetiğine göre belirlenmiş biyoanalitik yöntemler kullanılır. İnsanlık faydasına çeşitli numunelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenebildiği değişik metotlarla farklı çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan bu yöntemlerin de saf madde ve farklı çözücülerdeki ekstrakteleri için avantajlı ve dezavantajlı yönleri ve sınırları da farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Sonuç olarak bu bakış açısı beslenme ve diyet takviyesi sektörleri için belirli bir standarda getirilmiş antioksidan metotlar geliştirmenin temelini oluşturmuştur (Gülçin 2020).

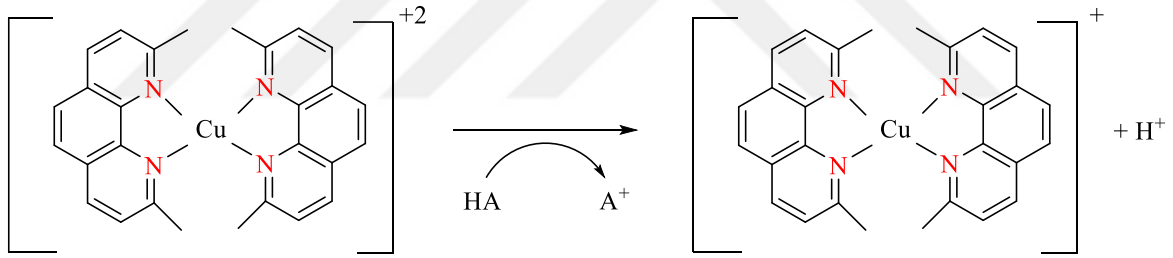
Bu tez kapsamında Luteolin ve türevi glikozitlerin (Sinarozit, Orientin, İzoorientin) farklı antioksidan metotlarla antioksidan yetenekleri belirlenerek farklı konumlarda bağlı olan glikozit birimlerinin maddelerin antioksidan kapasiteleri üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kullanılan metotlar, maddelerin indirgeme yetenekleri, radikal giderme kapasiteleri ve metal şelatlama yeteneklerini belirlemeye yönelik metotlardır. Ve aşağıda bu metotlar tablo şeklinde verilmiştir.

Tablo 15. Antioksidan Kapasitesi Belirleme Metotları

Metodun çalışma prensibi	Antioksidan kapasitesi belirleme metotları
İndirgeme	Ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme yöntemi
	FRAP yöntemine göre Fe^{3+} -TPTZ indirgeme kapasitesi
	CUPRAC yöntemi (Cu^{2+} indirgeme kapasitesi)
Radikal Giderme	DPPH serbest radikalini giderme kapasitesi
	ABTS radikalini giderme kapasitesi
	DMPD radikalini giderme kapasitesi
Şelatlama	Metal iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi

İndirgenme – yükseltgenme reaksiyonlarında indirgeyici kısım olarak görev alan antioksidanlar ortamdaki okside etkisi olan ve redükte etkisi olan yapıların kararlılığını sağlarlar. Antioksidan kapasitesi ile elektron verebilme kapasitesinin karşılıklı olarak birbirleri ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Arabshahi-Delouee and Urooj 2006). Moleküllerin antioksidan kapasitesi belirleme çalışmalarında indirgeme yeteneklerinin belirlenmesine yönelik üç metot ile çalışıldı.

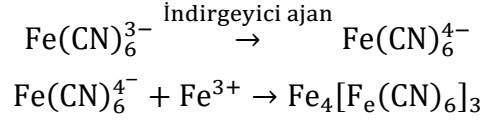
Cu^{+2} - Cu^{+} indirgeme yeteneklerinin belirlenmesi yani CUPRAC metodu, kuprik iyonlarının kupröz iyonlarına indirgenmesi esasına dayanan bir antioksidan kapasitesi belirleme yöntemidir. CUPRAC metodu çalışılması kolay, düşük maliyetli ve kararlı olmasından dolayı tercih edilen bir antioksidan kapasitesi belirleme yöntemidir ve fizyolojik pH'ya yakın pH aralığında çalışılmaktadır (Gülçin 2008; Gülçin *et al.* 2010). Bu yöntemde yükseltgen bileşen olarak Cu (II)-Neokuprin reaktifi kullanılmaktadır ve esas olarak oluşan kompleks bileşiğin 450 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermesidir. Oluşan kompleks yapı düzgün bir tetrahedral yapıda olduğundan Cu (II)-Neokuprin bileşiğine göre yapı olarak molekül gerginliği azalarak daha stabil hale gelmiştir. Oluşan turuncu tonlarındaki renk metal→ligant yönünde yük geçişinin sonucudur (Apak *et al.* 2006).



Şekil 68. Neokuprin'nin antioksidan moleküllerin bulunduğu ortamda vermiş olduğu indirgenme tepkimesi

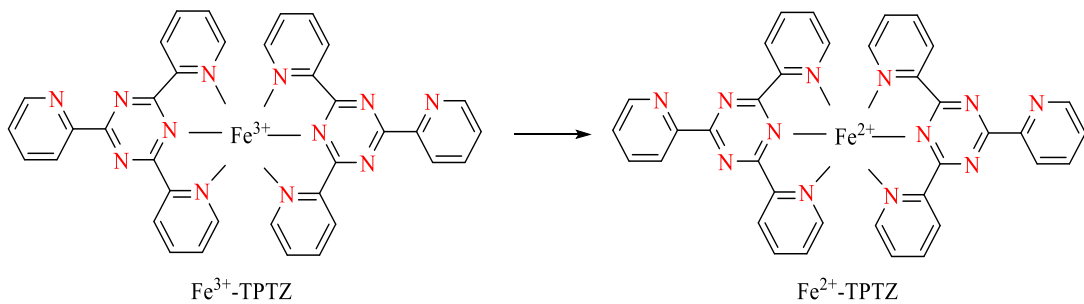
CUPRAC metodu ile Luteolin ve türevi glikozitler standart antioksidan bileşikler olan BHA, BHT, Troloks ve α -Tokoferol farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin antioksidan kapasiteleri belirlendi. Fotometrik ölçümlerden önce, deney tüplerinde kompleksleşme sonucu gözlenen turuncu tonlarındaki renk yoğunluğu, maddelerin indirgeme kapasitelerinin yüksek olabileceğini göstermektedir. Ölçümler sonucu kaydedilen absorbands değerlerine göre çizilen % absorbands/konsantrasyon grafiğine göre 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyona denk gelen % absorbands değerlerine göre Luteolin ve türevi glikozitler ile standart antioksidanlar birbirleri ile karşılaştırıldı. Sonuçta; Troloks(λ_{450} :1,640) > BHT(λ_{450} :1,512) > BHA(λ_{450} :1,464) > Luteolin (λ_{450} :1,426) > Askorbik asit (λ_{450} : 1,385) > Orientin (λ_{450} :1,325) α -tokoferol (λ_{450} : 1,267) > İzoorientin (λ_{450} :1,189) > Sinarozit(λ_{450} :0,960) olduğu belirlendi.

Çalışılan ikinci indirgenme metodu Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgemesidir. Metot $Fe[(CN)_6]^{3+}$ 'ün $Fe[(CN)_6]^{2+}$ 'e indirgenmesi sonucu meydana gelen ürünün 700 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Fe^{3+} - Fe^{2+} metodunda reaktif olarak potasyum ferrosiyaniür ($K_3[Fe(CN)_6]$) kullanıldı. Deney tüplerinin içeriği hazırlanarak $FeCl_3$ 'ün de ilavesiyle reaksiyon başlatıldı.



Kontrol olarak pipetlediğimiz tür renk olarak sarı renktedir, antioksidan özellik göstereceğini düşündüğümüz numune içeren tüplerde ise renk sarıdan yeşil-mavi renge döndüğü ve her bir numunenin ve standart olarak kullanılan antioksidan çözeltilerinin artan konsantrasyona bağlı olarak renk şiddetinin de paralel şekilde arttığı gözlemlendi. Fotometrik ölçüm öncesinde gözlemlenen bu durum maddelerin Fe^{3+} 'ün kuvvetli bir şekilde indirgendiğine dair bir ön tahmin verdi. Fotometrik ölçümler sonrası kaydedilen absorbands değerlerine göre çizilen % absorbands-konsantrasyon grafiğinden elde edilen sonuçlara göre numuneler ve standart antioksidanların Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasiteleri 10 μ g/mL konsantrasyona karşılık gelen sonuçlar karşılaştırıldı. BHA (λ_{700} : 1,556) > BHT (λ_{700} : 1,610) > α -Tokoferol (λ_{700} : 1,728) > Orientin (λ_{700} : 1,768) > Sinarozit (λ_{700} : 1,431) > İzorientin (λ_{700} : 1,446) > Troloks (λ_{700} : 1,42) > Luteolin (λ_{700} : 0,994) olduğu belirlendi.

Çalışmalarda kullandığımız indirgenme kapasitesi belirleme metodlarının sonucusu FRAP indirgenme metodudur. FRAP yönteminde önceki indirgeme yöntemlerinden farklı olarak reaksiyon ortamı daha asidiktir. FRAP reaktifinin ortama eklenmesi ile düşük pH'da Fe^{3+} - Fe^{2+} 'na indirgenmesi sonucu renkli Fe^{2+} -TPTZ kompleksi oluşur. Fe^{2+} -TPTZ kompleksi 593 nm'de maksimum absorbands gösterir. Düşük maliyette, kolay uygulanabilir oluşu ve ayrıca özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması yöntemin avantajlarından (Gülçin 2012).



Şekil 69. FRAP indirgeme yöntemine göre Fe^{3+} -TPTZ- Fe^{2+} -TPTZ indirgeme tepkimesi

FRAP metoduna göre gerçekleştirilen Fe^{3+} indirgeme kapasitesi belirleme çalışma sonuçlarına göre 10 μ g/mL konsantrasyonuna karşılık gelen % absorbands değerleri

karşılaştırıldı. α -Tokoferol (λ_{593} : 2,60) > Luteolin (λ_{593} : 1,99) > İzorientin (λ_{593} : 1,85) > BHA (λ_{593} : 1,77) > Orientin (λ_{593} : 1,77) > BHT(λ_{593} : 1,58) > Sinarozit(λ_{593} : 1,43) > Askorbik asit (λ_{593} : 1,41) > Troloks (λ_{593} : 1,32) şeklinde belirlendi.

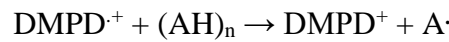
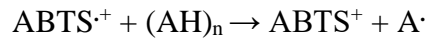
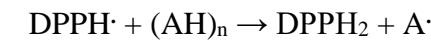
Luteolin ve türevi moleküllerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla üç ayrı indirgeme kapasitesi metodu (CUPRAC metodu, Fe^{3+} indirgeme metodu ve FRAP metodu) kullanılmıştır. Sonuçta çalışılan moleküllerin standartlar ile karşılaştırma yapıldığında yüksek bir indirgeme potansiyeline sahip oldukları gözlenmiştir. İndirgenme metotlarına ait sonuçlar aşağıdaki tabloda toplu olarak verilmiştir.

Tablo 16. Luteolin ve Türevlerinin Fe^{3+} İndirgeme, FRAP İndirgeme ve CUPRAC İndirgeme Yöntemleri ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Çalışmaları Sonucu Elde Edilen 10 μ /mL Konsantrasyonuna Karşılık Gelen % Absorbans Değerlerinin Birbirleriyle ve Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması

Antioksidan metot		BHA	BHT	α -Tokoferol	Troloks	Askorbik asit	Luteolin	Sinarozit	Orientin	İzorientin
Fe^{3+} indirgeme	$\lambda_{700/10}$	1,556	1,610	1,728	0,718	0,320	0,941	0,537	0,857	0,885
	r^2	0,954	0,954	0,937	0,999	0,999	0,990	0,999	0,943	0,998
FRAP indirgeme	$\lambda_{593/10}$	1,771	1,581	2,597	1,319	1,407	1,987	1,431	1,768	1,851
	r^2	0,988	0,989	0,993	0,995	0,911	0,956	0,998	0,980	0,970
Cu^{2+} indirgeme	$\lambda_{450/10}$	1,464	1,512	1,267	1,640	1,385	1,426	0,960	1,325	1,189
	r^2	0,983	0,959	0,994	0,928	0,981	0,980	0,997	0,990	0,951

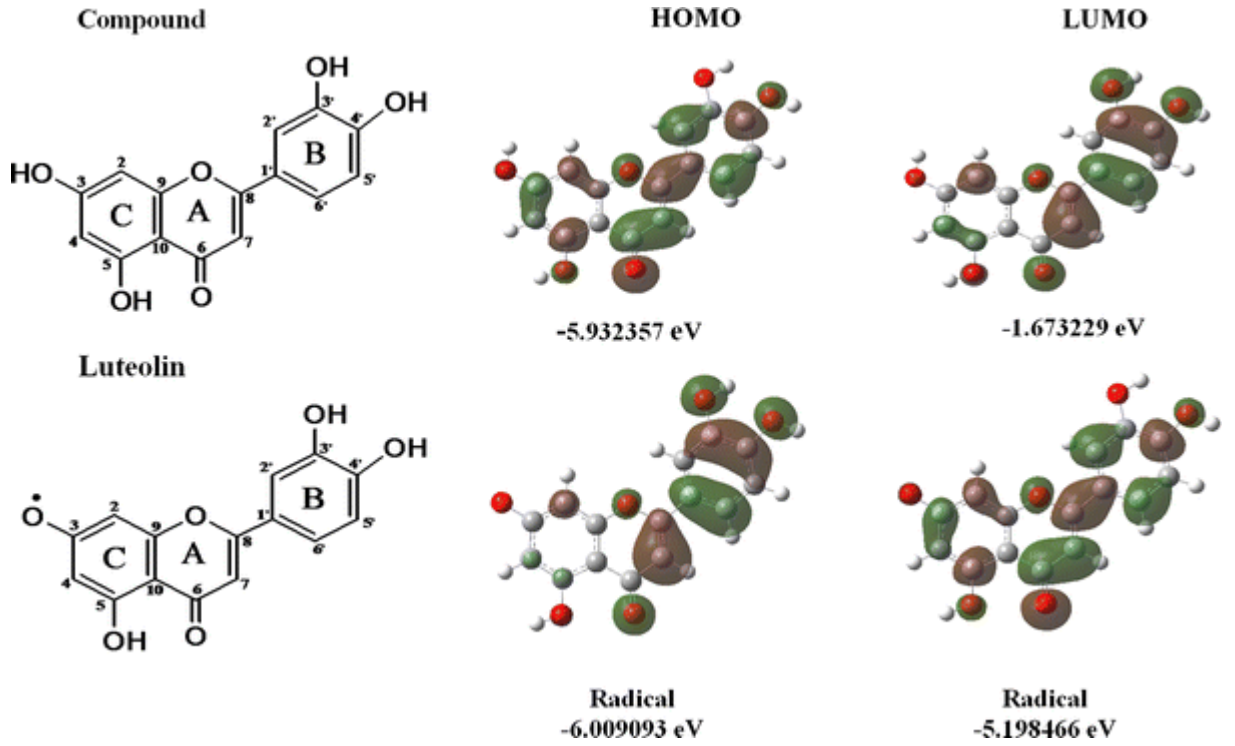
Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız yapıda olduklarından ve molekül ağırlıklarının küçük olmasından dolayı diğer atom ya da molekülleri elektronlarını aktararak veya elektron alarak etkilerler. Serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemek veya en aza indirmek için antioksidan savunma mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Yapıları antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer metot radikal giderme yöntemleridir (Gülçin 2010).

Luteolin ve türevlerinin antioksidan yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ ve DMPD \cdot^+ radikal giderme yöntemleri de çalışıldı. Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanılmasının sebebi yöntemlerin hızlı, seçici, tekrarlanabilir olmaları gibi avantajlı yönlerinin olmasındandır. Bu yöntemlerde çözeltilere eklenen antioksidan maddeler çözeltilerdeki reaktif türleri (DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ , DMPD \cdot^+) indirgeyerek çözeltilerin renksizleşmesine sebebiyet vermesi esasına dayanır.

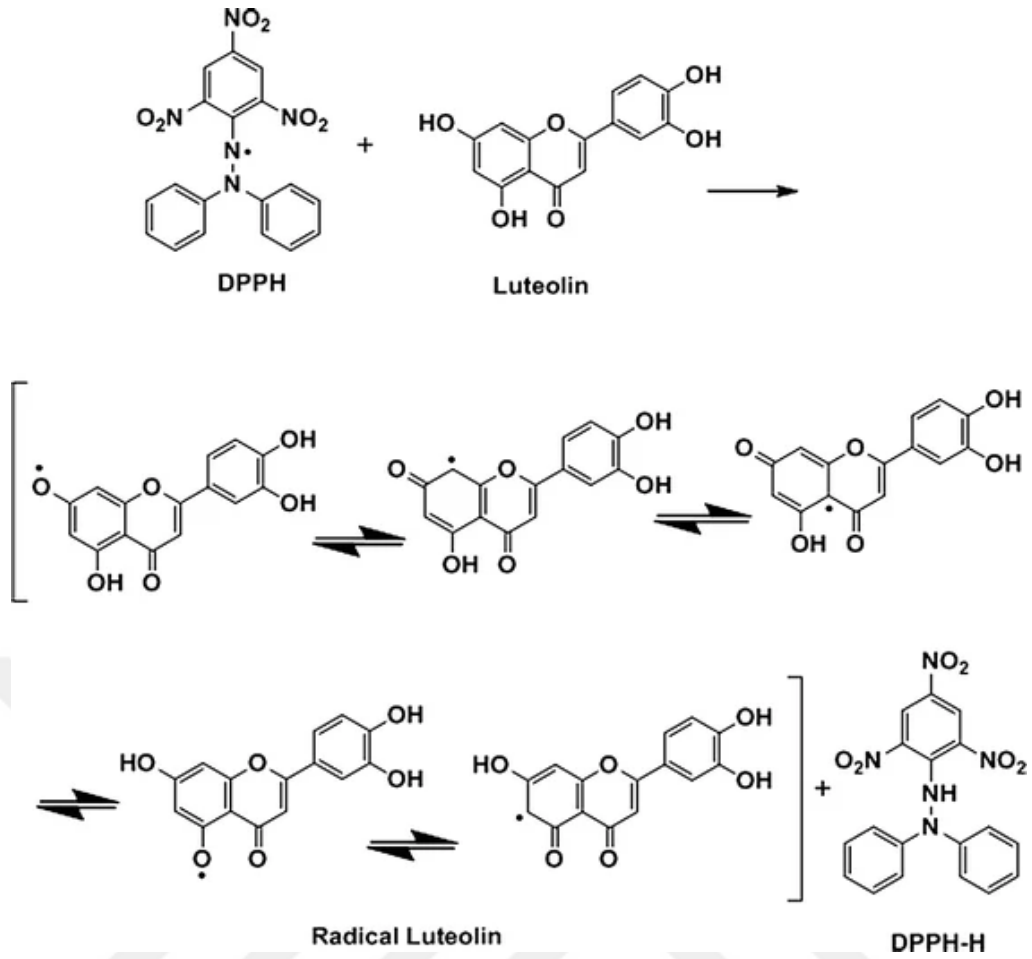


İlk olarak gerçekleştirilen DPPH radikal giderme çalışmalarında ölçümler 517 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. DPPH[•] radikalinin antioksidan maddelerde bulunan hidrojen sağlayıcı gruplardan hidrojen alması sonucu DPPH-H molekülüne indirgenmesi sonucu renksizleşme gözlenir ve absorbans değerinin azalmasına sebebiyet verir.

Yapılan bir çalışmada HOMO ve LUMO modelleri ile DFT tabanlı kuantum kimyasal tanımlayıcılar kullanılarak sınır moleküler yörünge enerji aralığı (LUMO-HOMO enerji farkı, Eg) ve sistemlerin elektron volt değerleri hesaplanarak, DPPH ile Luteolin arasındaki radikalik etkileşim için aşağıdaki mekanizma önerilmiştir (Süleyman 2015).



Şekil 70. Luteolin radikal moleküllerinin en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) dağılımı ve en düşük boş moleküler orbital (LUMO) dağılımı

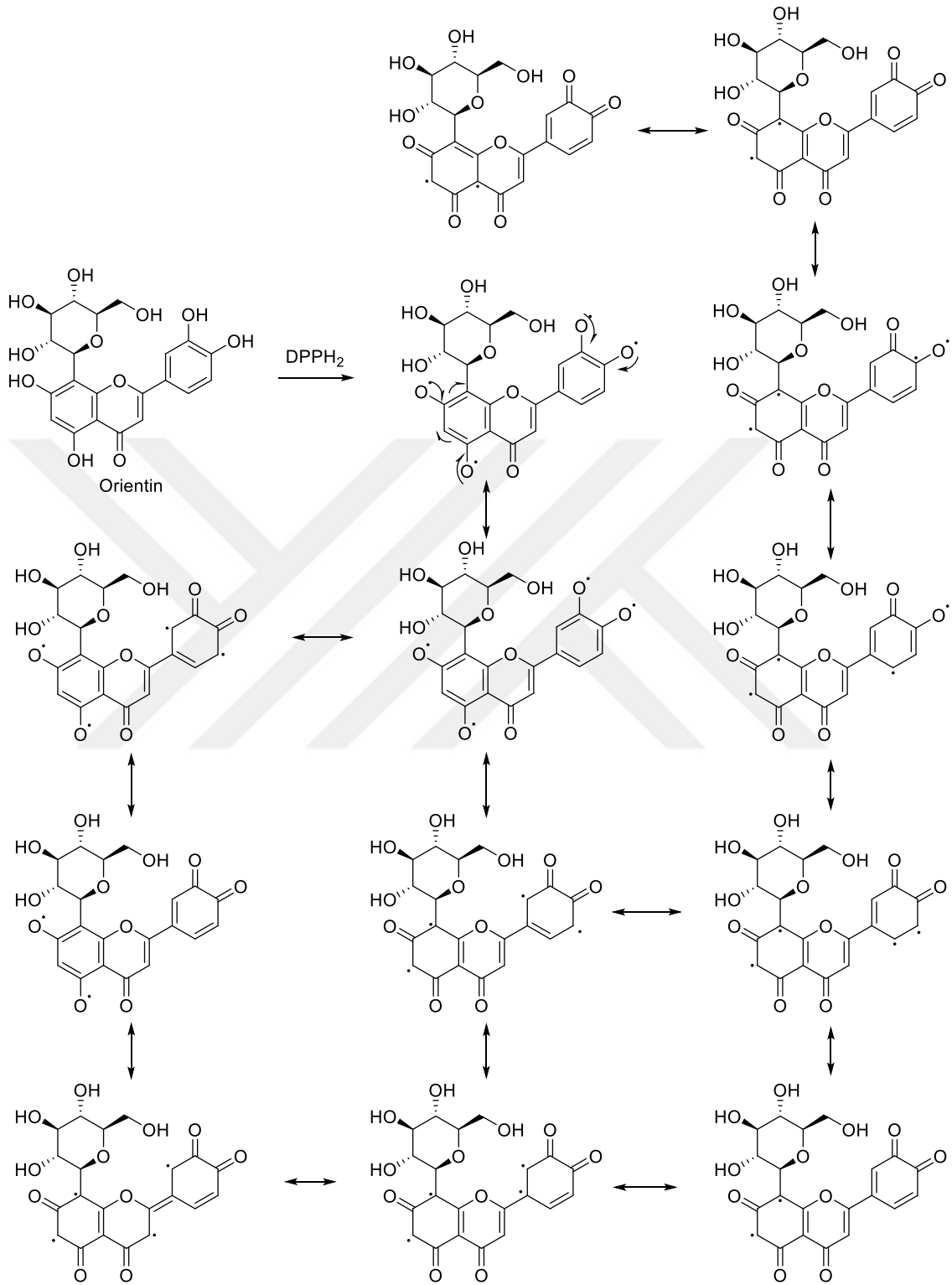


Şekil 71. DPPH serbest radikalleri ve Luteolin arasındaki muhtemel reaksiyon şeması

Bu enerji haritaları, Luteolinin antioksidan etkinliğinin, iskelet üzerindeki OH gruplarının sayısının artması ve bu gruplardan türetilen fenoksil radikallerinin oluşumunun zayıflaması ile sağlandığını düşündürmektedir. Antioksidatif etki sırasında ortaya çıkan en kararlı radikaller, C halkası üzerindeki C3 pozisyonundaki OH gruplarına, B halkası üzerindeki C3', C4' veya C4' ve C5''deki karşılıklı orto pozisyonlardaki hidroksil gruplarına atfedilebilir ve A halkasındaki çeşitli konumlar. Luteolinin antioksidan etkinliği ayrıca oluşan fenoksil radikalının stabilitesine de bağlıdır. LUMO enerji haritaları, B ve C halkaları arasında ve C-3 ve C-4 arasında daha yüksek elektron yoğunluğunun var olduğunu açıkça göstermektedir ki bu da halkalar arasındaki radikallerin stabilitesini açıkça doğrulamaktadır (Süleyman 2015).

Sonuçta Luteolin ve türevi glikozitlerinde hidroksil gruplarından dolayı farklı antioksidan özellik gösterecekleri tahminini ile standart maddeler ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen DPPH çalışmaları sonucunda IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. BHT (IC_{50} : 7,88 nM) > α -Tokoferol (IC_{50} : 7,97 nM) > Orientin (IC_{50} : 8,35 nM) > Troloks (IC_{50} : 8,770 nM) > BHA (IC_{50} : 8,89 nM) > İzorientin (IC_{50} : 11,00 nM) > Luteolin (IC_{50} : 12,84 nM) > Sinarozit (IC_{50} : 14,15 nM) IC_{50} değerlerine bakıldığında Orientinin, standart antioksidanlar troloks ve BHA ile diğer türevlere nazaran daha iyi radikal giderme aktivitesine sahip olduğunu

söylenbilir. Orientin ile DPPH radikali arasındaki muhtemel reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmiştir.

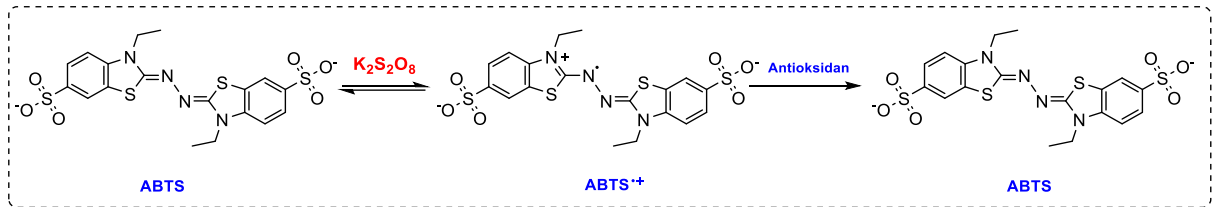
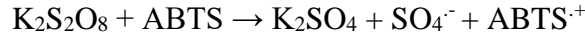


Şekil 72. DPPH serbest radikalleri ile Orientin arasındaki muhtemel reaksiyon şeması

Çalışılan bir diğer radikal giderme antioksidan kapasitesi belirleme yöntemi ise bitki ekstraktları, saf maddeler, içecekler için yaygın olarak kullanılan ABTS^{•+} giderme aktivitesi yöntemidir (Gülçin 2006b). ABTS radikal giderme yöntemi yaygın olarak kullanılma sebebi,

geniş pH aralıklarında uygulanabilir olması, su ve organik çözücülerde çözünebilirliği ve antioksidan moleküller ile hızlı tepkime vermesi gibi avantajlarının olmasındandır (Gülçin 2012).

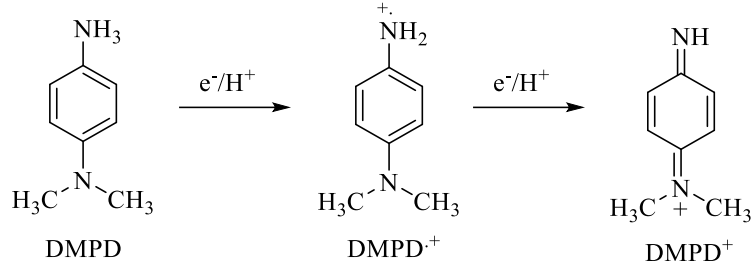
Yöntem çalışılmadan önce ABTS'den $K_2S_2O_8$ oksidanlı ortamda $ABTS^{\cdot+}$ oluşturulduktan sonra oluşan radikalin 734 nm'de absorbans değeri ölçüldü.



Şekil 73. $K_2S_2O_8$ oksidan varlığında $ABTS^{\cdot+}$ 'nin oluşum reaksiyonu

Oluşturulmuş olan $ABTS^{\cdot+}$ 'nin rengi zümrüt yeşili rengindedir. Antioksidan kapasitelerine bakılan maddelerin farklı konsantrasyonlarındaki çözeltiler ile etkileştirilmesi sonucu yoğun zümrüt renginin, konsantrasyon artışına paralel olarak açıldığı gözlemlendi. Antioksidan yeteneklerinin var olduğu bilinen Luteolin ve türevleri ile standart antioksidan yetenekleri karşılaştırmalı olarak $ABTS^{\cdot+}$ giderme yöntemine göre yoğun zümrüt yeşili rengini azaltabilme yeteneği ile belirlendi. Absorbans ölçümünden sonra yapılan hesaplamalar sonucu Luteolinin diğer türevlerinden daha iyi radikal giderme aktivitesine sahip olduğunu benzer oranlarda aktivite sergilediği söylenebilir. Karşılaştırma α -Tokoferol (IC_{50} : 4,96 nM) > BHA (IC_{50} : 4,99 nM) > Luteolin (IC_{50} : 5,37 nM) > BHT (IC_{50} : 5,54 nM) > Orientin (IC_{50} : 6,24 nM) > İzoorientin (IC_{50} : 6,30 nM) > Sinarozit (IC_{50} : 6,42 nM) > Troloks (IC_{50} : 7,30 nM) şeklindedir.

Radikal giderme metotlarından son olarak DMPD $^{\cdot+}$ metodu ile yapıların antioksidan kapasiteleri belirlendi. İlk olarak DMPD'den DMPD $^{\cdot+}$ radikali düşük pH'da ve uygun oksidan molekül varlığında oluşturulmuştur. Yöntem şeker pembesi renginde olan bu radikalin antioksidan moleküller ile etkileşim sonucu antioksidan yapıların artan konsantrasyonuna bağlı olarak rengin açılması ve ortamda kalan DMPD radikal katyonunun 505 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. Renk açılmasının nedeni antioksidan maddelerden DMPD $^{\cdot+}$ 'ne H atomu transferi sonucu radikalin giderilmesidir.



Şekil 74. DMPD^{•+} oluşum ve sönümlenme reaksiyonu

Antioksidan etki göstermesi beklenen Luteolin ve türevi yapıların DMPD^{•+} ile etkileşimleri sonucu meydana gelen renksizleşme maddelerin antioksidan kapasiteleri açısından ön bir bilgi verdi. Sonuç olarak gerçekleştirilen çalışmalar, yapılan hesaplamalar ve çizilen grafiklerden Luteolin ve türevlerinin standart antioksidan moleküllerle benzer etki gösterdiği belirlenmiştir. IC_{50} değerindeki düşüş yapıların antioksidan yeteneğini göstermektedir. Standart maddelerin ve Luteolin ve türevlerinin DMPD yöntemine göre antioksidan yeteneklerinin Troloks (IC_{50} : 6.60 nM) > Sinarozit (IC_{50} : 11,95 nM) \approx BHA (IC_{50} : 11,95 nM) > Orientin (IC_{50} : 12,3776 nM) > Luteolin (IC_{50} : 12,8361 nM) > BHT (IC_{50} : 13,0782 nM) > İzorientin (IC_{50} : 13,86 nM) > α -Tokoferol (IC_{50} : 19,80 nM) olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 17. Luteolin ve Türevlerinin DPPH, ABTS, DMPD Radikal Giderme Yöntemleri ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Amacı ile IC_{50} Değerlerinin Birbirleriyle Standart Antioksidanlarla Karşılaştırılması

Metod		BHA	BHT	α Tokoferol	Troloks	Luteolin	Sinarozit	Orientin	İzorientin
DPPH giderme	IC_{50}	8,89	7,88	7,97	8,77	12,84	14,15	8,35	11,00
	r^2	0,9780	0,9610	0,9548	0,9909	0,9623	0,9809	0,9796	0,9938
DMPD ^{•+} giderme	IC_{50}	11,95	13,08	19,80	6,60	12,84	11,95	12,38	13,86
	r^2	0,9530	0,9760	0,9681	0,9436	0,9397	0,9603	0,9490	0,8564
ABTS [•] giderme	$\lambda_{734/10}$	4,99	5,54	4,916	7,30	5,37	6,42	6,25	6,30
	r^2	0,9760	0,9950	0,9347	0,9754	0,9320	0,9994	0,8506	0,8817

Sentetik antioksidanların toksik etkilere sahip olmalarından dolayı doğal antioksidanlara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Fenolik yapıya sahip olan Luteolin ve türevi glikozitler bitkilerde bulunan flavanoitler sınıfında yer alan farklı meyve ve sebzelerde bulunan bileşiklerdir. Yapıların antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla üçü indirgeme metodu, üçü de radikal giderme metodu olmak üzere toplamda altı yöntem çalışıldı. Çalışmalar sonucu yapıların antioksidan etki amacıyla kullanılabilceği sonucuna varıldı. Maddelerin antioksidan yeteneklerinin standart antioksidan maddelere yakın bir değerde olduğu, kendi aralarında da eşdeğer bir antioksidan yetenek gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca maddelerin asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, α -glikozidaz ve α -amilaz enzimleri ile CA I ve II izoenzimleri üzerine

inhibisyon etkileri incelendi. CA I ve II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinden saflaştırıldı diğer enzimler saf olarak temin edildi.

Karbonik anhidraz enzimi aktif merkezinde Zn^{2+} iyonu bulunduran, karbondioksitin bikarbonat ve protona hidrolizini katalizleyen, pH düzenleyici, yüksek turnover kapasitesine sahip metaloenzimlerdir (Çağlayan *et al.* 2019). Başlangıçta memeli eritrositlerinden saflaştırılan CA enzimi sonraki dönemlerde farklı memeli dokularından, bakterilerin bazılarında ve bitkilerden de izole edilmiştir (Beydemir and Gülçin 2004).

Çalışmalarda kullanılan CA I ve CA II izoenzimleri insan kanı eritrosit hücrelerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Afinite jelinin hazırlanmasında matriks olarak Sepharose-4B, ligant olarak sülfanilamid, uzantı kolu materyali olarak da L-Tirozin kullanıldı. Sülfanilamid CA'nın spesifik inhibitörü olduğu için, L-tirozin ise enzim ve ligant daha iyi etkileşim sağladığı ve istenilen uzunlukta bir uzantı kolu olduğu için kullanıldı. Sonuç olarak CA I ve II izoenzimlerini izole etmek için hazırlanmış olan afinite jeli uygun bir şekilde kolona paketlenerek, belirli aşamalardan geçirilmesi sonucu hCA I ve II ayrı ayrı elüe edildi.

CA enzimi saflaştırma işlemlerinden sonra saflaştırma tablosu oluşturularak spesifik aktivite ve yüzde verim hesaplandı. CA izoenzimlerinin Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisiyle saflaştırılmasında hCA I izoenzimi 4,6056 EÜ/mg spesifik aktivite, yüzde 23,92 verimle yaklaşık 175.336 kat saflaştırılırken, hCA II izoenzimi ise 7.0447 EÜ/mg spesifik aktivite, yüzde 32,3313 verimle yaklaşık 267,96 kat saflaştırıldı. Ayrıca saflaştırılmış olan izoenzimlerin molekül ağırlığı ve saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE sonucu tek bant gözlemlendi ve molekül ağırlığı da yaklaşık olarak 29 kDa olarak tespit edildi.

CA enzim aktivitesini belirlemek için Amstrong ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu esteraz aktivite tayin yöntemi kullanıldı. Esteraz aktivite tayin yönteminin esası substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatın CA katalizörlüğünde *p*-nitrofenole hidrolizi sonucu oluşan ürünün 348 nm'de maksimum absorbans göstermesidir (Amstrong *et al.* 1966).

Gerçekleştirilen aktivite çalışmaları sonucu inhibitör olarak düşünülen Luteolin ve türevi moleküllerin inhibisyon etkileri IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak belirlendi. IC_{50} , enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonudur. Her bir madde için IC_{50} değerinin belirlenmesinde beş ayrı inhibitör konsantrasyonun da ölçümler alınarak Aktivite (%)-[I] grafikleri çizildi ve IC_{50} değerleri belirlendi. IC_{50} değerine karşılık gelen konsantrasyon ile bu çalışılan bu konsantrasyondan daha derişik ve seyreltik olmak üzere belirlenen üç inhibitör konsantrasyon değerine karşılık farklı PNF konsantrasyonlarında ölçümler alınarak hesaplamalar sonrası grafiğe aktarılıp her bir inhibitör için K_i değerleri belirlendi. Çalışmalarda

kontrol inhibitörü olarak ta asetazolamid kullanıldı. Asetazolamid ile IC₅₀ ve K_i değerleri karşılaştırılan Luteolin ve türevlerinin CA inhibitörü olarak kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Göz tansiyonu olarak bilinen glukom hastalığı, göz içi basıncın artması sonucu görme sinir hücrelerinde meydana gelen zarar sebebiyle görme alanının zamanla kısıtlanmasıdır. Hatta glukom, özellikle 50 yaş ve üzeri kişilerde körlüğe yol açabilen nörodejeneratif hastalıklardandır. Hastalığın tedavi etmek için, artan göz içi basıncını kontrol ederek, retina ganglion bölgesindeki hücre hasarının ilerlemesini geciktirmek ve bunun sonucu olarak hastaların görme yetilerinin korunması amaçlanmaktadır (Wang and Wei 2021). hCA I, II, IV izoenzimleri insan göz dokusunda bulunmaktadır ve CA inhibitörleri, aköz humorün fazla salgılanması sonucu artan göz için basıncını düşürdüklerinden glukom hastalığının tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bu amaçla özellikle hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon çalışmaları yoğunluk olduğu gözlenmektedir. Bizimde standart inhibitör olarak kullandığımız asetazolamid kullanımında meydana gelen metabolik asidoz sonucu aköz humor yapımı azalır ve göz içi basıncını düşmesini sağlamış olur. Bu şekilde optik sinir kan akış hızı artmış görme fonksiyonunun korunması sağlanmış olur (Shields 1998; Spuran and Scozzafava 2000).

Günümüzde Asetazolamit, Metzolamit, Etokzolamit, Brinzolamit, Dorzolamit ve Diklorfenamit gibi birçok CA enzimi inhibitörü klinik açıdan kullanılmaktadır. CA I ve II izoenzimleri inhibisyon çalışması sonucu Luteolin ve türevlerinin inhibisyon etkilerinin nM seviyede etkili oldukları, hatta sinarosit ve orintinin IC₅₀ değerlerinin asetazolamitten daha düşük olduğu belirlendi. Sonuçta moleküllerin CA inhibitörleri olarak kullanılabilceği ve glukom hastalığı için yeni ilaçların sentezinde aktif rol oynayabileceği sonucunu ulaşıldı. Çalışma sonucu elde edilen inhibisyon türü, IC₅₀ ve K_i değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 18. hCA I ve II İzoenzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC₅₀, K_i Değerleri ve İnhibisyon Türü

Enzim	İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	r ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
hCA I	Luteolin	49,5105	0,9932	53,1359 ± 9,1887	Yarışmasız
	Sinarozit	34,6573	0,9912	40,4791 ± 9,3241	Yarışmasız
	Orientin	27,7259	0,9898	33,5889 ± 8,8474	Yarışmasız
	İzoorientin	53,3190	0,9871	94,5155 ± 29,1388	Yarışmasız
	Asetazolamid	46,2000	0,9922	36,3990 ± 9,0102	Yarışmasız
hCA II	Luteolin	34,6574	0,9922	26,9180 ± 1,0778	Yarışmasız
	Sinarozit	18,2407	0,9918	16,1906 ± 1,0072	Yarışmasız
	Orientin	23,9016	0,9903	21,2315 ± 2,6920	Yarışmasız
	İzoorientin	46,2098	0,9846	55,2235 ± 12,3025	Yarışmasız
	Asetazolamid	24,7500	0,9850	16,6020 ± 1,2900	Yarışmasız

Luteolin ve türevleri üzerine gerçekleştirilmiş olan bir diğer enzim inhibisyon çalışması ticari olarak temin edilen AChE ve BChE enzimleri üzerinedir. Kolin esteraz enzimleri vücut dokularının birçoğunda, vücut sıvılarında ve plazmada bulunurlar ve önemli fonksiyonlara sahiptirler. AChE enzimi asetilkolinin; kolin ve asetata hidrolizini, BChE enzimi ise bütirilkolinin; kolin ve bütirata hidrolizini katalizlemeden sorumlu enzimlerdir (Polat Köse *et al.* 2015). Yapılan çalışmalarda CA enzimi inhibisyon çalışmalarında olduğu gibi inhibitör olarak düşünülen moleküllerin her biri için beş ayrı konsantrasyonunda çalışıldı ve Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Aynı şekilde inhibitörlerin üç farklı konsantrasyonuna karşılık olarak AChE ve BChE enzimlerinin sırası ile substratı olan asetilkolinyodat ve bütirilkolinyodata farklı konsantrasyonlarına karşı ölçümler alınarak her bir madde için K_i değerleri belirlendi.

Nörodejeneratif hastalıkların başında gelen alzheimer hastalığı, kişide hafıza kaybı, bilişsel bozukluk, davranış bozuklukları ve fonksiyonel yeteneklerin kaybı gibi anomalilerle karakterize bir hastalıktır. Dünya genelinde kırk milyondan fazla insan demansın en yaygın sebebi olan bu hastalıktan etkilenmektedir. Alzheimer hastalığını patofizyolojisi incelenmiş ve hastalığın kolinerjik nöron kaybından kaynaklandığı bildirilmiştir. Alzheimer hastası olan bireylerin beyinlerinde oluşmuş olan β -amiloid protein plaklarının kolinerjik sinapsları işlevlerini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. Asetilkolinesteraz enzimi katalizörlüğünde asetilkolin sinaptik yarıktaki asetikasit ve koline hidrolizlenir, bunun sonucu olarak sinyal iletimi ve postsinaptik reseptör aktivasyonu sonlanmış olur (Young *et al.* 2021). Hastalığın önlenmesi veya hastalık sonucu meydana gelmiş olan olumsuz durumların önlenmesi ya da en aza indirgenmesi için, asetilkolinin hidrolizinin azaltılması gerekir. Sonuç olarak hastalığın tedavisinde asetil kolinin hidrolizini katalizleyen AChE ve BChE enzimlerini inhibe eden yapılar temel hedef haline gelmiştir. (Heinrich and Teoh 2004).

AChE inhibitörleri, nörotransmitterlerin sinapslardan uzaklaşmasını engellemek için asetilkolini hidroliz eden enzimleri inhibe ederler. AChE ve BChE enzimlerinin inhibisyon yoluyla baskılanması asetilkolin miktarını artırmak amacı ile uygulanan yöntemlerdendir. AChE enziminin kolinerjik iletimindeki rolü aydınlatılmış olmasına rağmen BChE enzimi etkisi yeterince aydınlatılamamıştır (Gülçin *et al.* 2017). Klinik araştırma ve çalışmalar neticesinde alzheimer hastası olan bireylerde AChE ve BChE enzim inhibitörü olan Takrin, tedavide oldukça etkili sonuçlar sağladığı gözlemlenmiş, Food Drug Administration (FDA) tarafından da tavsiye edilmiştir. Fakat Takrinin yan etki olarak karaciğer hasarına sebebiyet verdiği için sınırlı olarak kullanılabilir (Watkins *et al.* 1994). Alzheimer hastalığının tedavisinde Takrinin etkili olması AChE ve BChE inhibitörü olabilecek yeni bileşiklerin keşfi

üzerine çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Takrinden başka ensakulin, rivastigmin ve donepezil AChE inhibitörü olarak kullanılan diğer maddelerdir. Bu inhibitörlerin ortak yapısal özellikleri pozitif bir yük merkezi, periferal anyonik bir bölge ve kolin bağlanma bölgesi olarak ta aromatik bir halka içermektedirler. Etki mekanizmalarının ise asetilkolinesteraz enziminin reseptöre bağlanma bölgesi üzerine bloke ederek etki gösterdikleri düşünülmektedir (Dooley and Lamb 2000).

Genel yapıya uyan Luteolin ve türevlerinin, AChE ve BChE enzimleri üzerine yapılan inhibisyon etkisi çalışmaları sonucunda maddelerin enzimleri nM seviyede inhibe ettiği gözlemlendi. Çalışmalarda standart olarak kullanılan Takrin inhibitörü ile benzer IC₅₀ ve K_i değerlerine sahip oldukları belirlendi. Luteolin ve türevlerinin alzheimer hastalığı tedavisinde yeni ilaçların tasarımında kullanılabileceği ve doğal olarak tüketildiğinde de yine olumlu sonuçlar sergileyebileceği sonucuna varıldı. AChE ve BChE enzimleri üzerine yapılan inhibisyon çalışma sonuçları aşağıdaki tabloda toplu olarak verilmiştir.

Tablo 19. AChE ve BChE Enzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC₅₀, K_i Değerleri ve İnhibisyon Türü

Enzim	İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	r ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
AChE	Luteolin	49,5105	0,9932	9,242±2,820	<u>Yarışmalı</u>
	Sinarozit	34,6475	0,9912	8,499±0,870	<u>Yarışmalı</u>
	Orientin	21,6608	0,9905	4,0153±1,1883	<u>Yarışmalı</u>
	İzoorientin	1,9254	0,9822	1,4214±0,1301	<u>Yarışmalı</u>
	Takrin	15,0630	0,9965	2,586±0,90	<u>Yarışmalı</u>
BChE	Luteolin	7,4532	0,9905	4,7606±0,1948	<u>Yarışmasız</u>
	Sinarozit	6,4180	0,9940	3,5858±0,5642	<u>Yarışmasız</u>
	Orientin	14,4406	0,9434	8,4867±1,8231	<u>Yarışmasız</u>
	İzoorientin	23,1049	0,9989	15,6225±10,5352	<u>Yarışmasız</u>
	Takrin	15,7500	0,9890	7,076±0,9000	<u>Yarışmalı</u>

Luteolin ve türevlerinin ticari olarak temin edilen α -glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi yapılan son inhibisyon çalışmasıdır. İnsan vücudunda ince barsak membranı üzerinde bulunan ve bir disakkaridaz enzimi olan α -glikozidaz enzimi disakkaritleri monosakkaritlere hidroliz eder (Taslami *et al.* 2018).

Günümüzde hızla yayılan diyabet hastalığı bugün ve gelecek için tehlike arz eden ciddi bir sağlık problemidir. Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen diabet melitus (DM); pankreas tarafından salgılanan insülin hormonunun sekresyonunun veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu meydana gelen kronik bir hastalıktır (Maqbool *et al.* 2019). DM tedavisinde bir disakkaridaz olan α -glikozidazı geri dönüşümlü inhibe eden ilaçlar yaygın

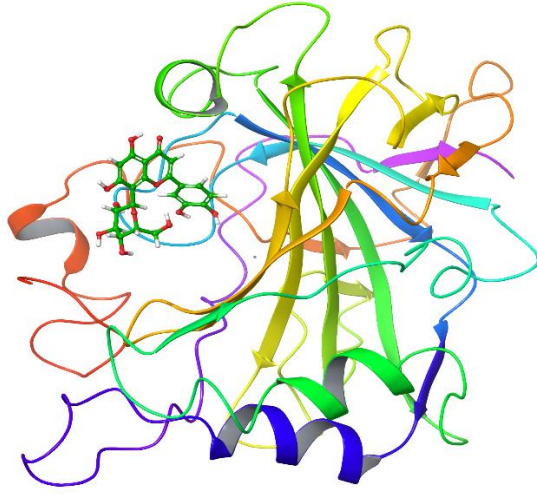
olarak kullanılmaktadır. Kullanılan bu enzim inhibitörleri ile polisakkaritlerin glukoza hidrolizleri yavaşlatılarak glukozun ince barsaktan absorpsiyonunu geciktirilmekte ve hiperglisemi kontrol edilebilmektedir. Akarboz ve miglitol gibi α -glikozidaz enzim inhibitörleri günümüzde kullanılmaktadır. Ancak bu inhibitörlerin kullanımındaki en büyük sorun, hastaların üçte birinde şişkinlik, ishal, dispepsi, hepatoksisite gibi gastrointestinal yan etkilerin görülmesi ve maliyetinin de yüksek olması araştırmacıları yeni α -glikozidaz inhibitörlerinin keşfine yönlendirmiştir (Satzmaz 1996; Kazmi *et al.* 2017; Luthra *et al.* 2018).

Luteolin ve türevi glikozitlerin α -glikozidaz enzimim üzerine inhibisyon etkisi çalışmaları Tao ve arkadaşlarının geliştirdikleri metoda göre belirlendi (Tao *et al.* 2013). Substrat olarak *p*-NPG'nin kullanıldığı bu yöntemde göre aktivite ölçümleri 405 nm'de, 3 dk süresince kaydedilerek diğer inhibisyon çalışmalarında olduğu gibi her molekül için IC₅₀ ve K_i değerleri belirlendi. Sonuç olarak Luteolin ve türevi glikozitlerin α -glikozidaz enzimini nM seviyede inhibe ettiği ve inhibisyon türünün yarışmasız olduğu gözlemlendi. Çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ ve K_i değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 20. AChE ve BChE Enzimleri Üzerine İnhibitör Özellik Gösteren Luteolin ve Türevleri ile Asetazolamid'in IC₅₀, K_i Değerleri ve İnhibisyon Türü

Enzim	İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	r ²	Ortalama K _i (nM)	İnhibisyon türü
α -Glikozidaz	Luteolin	10,3454	0,9937	32,0197±9,0665	Yarışmasız
	Sinarozit	7,1458	0,9925	6,0876±1,2239	Yarışmasız
	Orientin	19,2540	0,9930	27,6295±27,4886	Yarışmasız
	İzoorientin	26,6595	0,9954	23,8768± 4,1329	Yarışmasız

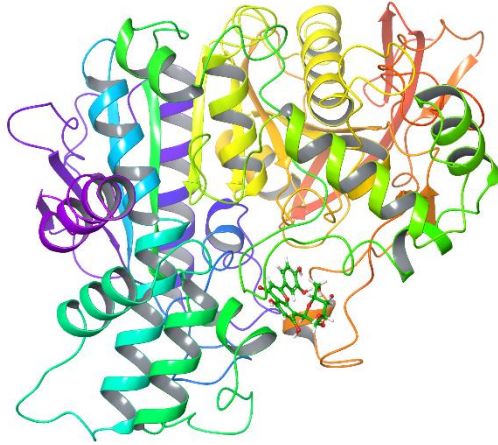
Ayrıca Luteolin ve türevi glikozitlerin karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri, asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz ve α -glikozidaz enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemek için yapılan deneysel çalışma sonuçlarının, çalışılan moleküler simülasyon yerleştirme sonuçları ile de örtüştüğü gözlemlendi (Tablo 19). Şekil 75'de de moleküler docking çalışma sonuçlarına göre en iyi inhibisyon etkisi gösteren yapılara ait enzim-inhibitör etkileşimleri verilmiştir.



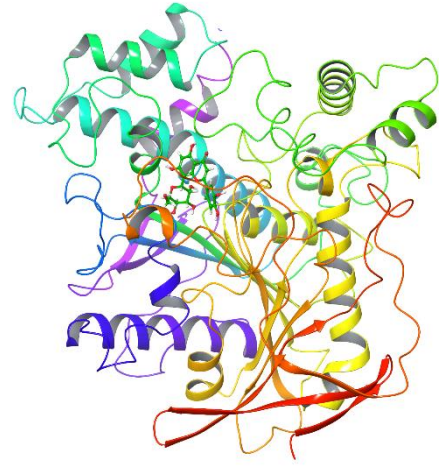
CA I – Orientin



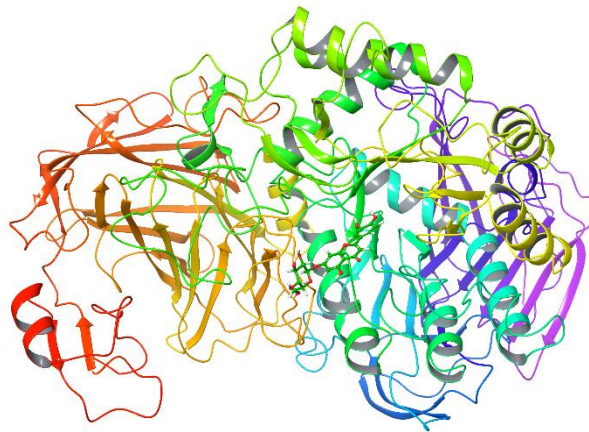
CAII – Orientin



AChE – Orientin



BChE – Orientin



α -Glikozidaz - Sinarozit

Şekil 75. Moleküler docking çalışma sonuçlarına göre en iyi inhibitör etkisi gösteren yapılara ait enzim-inhibitör etkileşimleri

Tablo 21. Luteolin ve Türevi Glikozitler ile Referans Moleküllerin hCA I ve hCA II İzozimleri, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz ve α -Glikozidaz Enzimleri ile Moleküler Simülasyon Yerleştirme Sonuçları ile Deneysel IC₅₀ Değerleri

Madde	IC ₅₀	Yerleşme Değeri	XP G Değeri	Kayma G değeri	Kayma Modeli
Karbonik Anhidraz I (PDB: 4WR7)					
Luteolin	49,5105	-7.241	-7.281	-7.281	-51.043
Orientin	27,7259	-9.903	-9.938	-9.938	-50.823
Sinarozit	34,6573	-9.596	-9.596	-9.596	-68.011
İzoorientin	53,3190	-9.257	-9.301	-9.301	-63.728
Asetazolamit	46,2000	-6.581	-7.504	-7.504	-48.265
Karbonik Anhidraz II (PDB: 5AML)					
Luteolin	34,6574	-6.176	-6.216	-6.216	-57.303
Orientin	23,9016	-8.873	-8.909	-8.909	-38.306
Sinarozit	18,2407	-8.778	-8.778	-8.778	-68.736
İzoorientin	46,2098	-8.499	-8.543	-8.543	-77.747
Asetazolamit	24,7500	-6.313	-7.235	-7.235	-57.775
Asetilkolinesteraz (PDB: 4TVK)					
Luteolin	49.5105	-9.154	-9.194	-9.194	-43.679
Orientin	21,6608	-14.354	-14.389	-14.389	-16.410
Sinarozit	34.6475	-12.788	-12.788	-12.788	-85.209
İzoorientin	1,9254	-13.954	-13.998	-13.998	-84.038
Asetazolamit	15,0630	-12.126	-12.126	-12.126	-54.165
Bütirilkolinesteraz (PDB: 4TPK)					
Luteolin	7,4532	-8.891	-8.931	-8.931	-55.884
Orientin	14,4406	-13.418	-13.454	-13.454	-79.438
Sinarozit	6,4180	-11.161	-11.161	-11.161	-82.345
İzoorientin	23,1049	-10.751	-10.796	-10.796	-78.467
Takrin	15,750	-7.606	-7.607	-7.607	-39.466
α-Glikozidaz (PDB: 3L4Y)					
Luteolin	10,3454	-7.438	-7.477	-7.477	-59.885
Orientin	19,2540	-10.460	-10.496	-10.496	-53.980
Sinarozit	7,1458	-12.807	-12.807	-12.807	-62.135
İzoorientin	26,6595	-12.354	-12.398	-12.398	-86.368

Sonuç olarak, Luteolin, Sinarozit, Orientin ve İzoorientin moleküllerinin altı ayrı metot ile antioksidan yetenekleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar çalışmalarda yaygın olarak kullanılan standart antioksidanlar BHA, BHT, α -Tokoferol ve troloks ile mukayese edildi. Çalışılan bütün metotlarda Luteolin ve türevi glikozitler standartlara yakın oranlarda aktivite gösterdikleri gözlemlendi. Diğer taraftan Luteolin ve türevi glikozit moleküllerinin günümüzün birçok küresel ölçekteki hastalığı ile bağlantılı enzimler olan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri, asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve α -Glikozidaz üzerine muhtemel etkileri

de araştırıldı. Çalışma sonucu yapılan değerlendirmelerde Luteolin ve türevi glikozitlerin yüksek antioksidan kapasitelerinden dolayı gıda, kozmetik ve farmakolojik uygulamalarda koruyucu ajan olarak kullanılacakları ve enzim inhibisyon özelliklerinden dolayı da başta Alzheimer hastalığı, glukoma, epilepsi, T2DM gibi birçok yaygın hastalığın tedavisinde ilaç olma potansiyeline sahip doğal ürünler oldukları tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Adams, R.L., Craig P.L., Parsons O.A., 1984. Neuropsychology of dementia. The Neurology Clinic, 4, 387-405.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemical Biological Interaction, 174, 27-37.
- Akagün, G., Alabaş (*Brassica oleracea gongylodes*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Edirne 2009.
- Akbaba, Y., Bastem, E., Topal, F., Gülçin, İ., Maraş, A., Göksu, S. 2014. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of novel sulfamides derived from L-aminoindanes and anilines. Archiv der Pharmazie, 347, 950–957.
- Akinciöğlü, 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.
- Aksu, K., Nar, M., Tanç, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., Tümer, F., Supuran, C.T. 2013. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of sulfamides structurally related to dopamin. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 21(11), 2925-2931.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad Sci USA 90: 7915-7922.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Erça, E. 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. International Journal of Food Science and Nutrition, 57(5-6), 292-304.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. A new Method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. Turkish Journal of Medical Sciences, 26, 163-166, 1996.
- Ashani, Y., Pistinner, S. Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. Toxicol Sci. 2004;77(2):358-367
- Atmaca, G.Y., Günsel, A., Taslimi, P., Bilgicli, A.T., Pişkin, H., Ceylan, Y., Erdoğan, A., Yarasır, M.N., Gülçin, İ. (2021). Novel potential metabolic enzymes inhibitor, photosensitizer and antibacterial agents based on water-soluble phthalocyanine bearing imidazole derivative. Journal of Molecular Structure, 1237, 130402.
- Bachman, D.L., Wolf, P.A., Linn, R.T., 1992. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the framingham study, Neurology, 42,115-9.
- Becker, L.B, Vanden H.T.L., Shao, Z.H., Li, C.Q., 1999. Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. American Journal of Physiology, 277, 2240- 2246.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2012. Biochemistry. W.H. Freeman and Company, 1515p, New York, USA
- Bingöl, Z., 2016. 1,1,2,2-Tetrakis(p-hidroksifenil) etan: İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II, asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz, glutatyon S-transferaz enzimleri üzerine

- inhibisyon etkisi ve antioksidan kapasitesinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Brown, J.E., 1999. *Nutrition Now*. 2nd edition, West/Wadsworth, Belmont.
- Buldurun, K., Turan, N., Bursal, E., Aras, A., Mantarcı, A., Çolak, N., Türkan, F., Gülçin, İ., 2021. Synthesis, characterization, powder X-ray diffraction analysis, thermal stability, antioxidant properties and enzyme inhibitions of M(II)-Schiff base ligand complexes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (17), 6480–6487.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A.C. 2013. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. *Food Research International*, 51, 66-74.
- Chen, V.P., Gao, Y., Geng, L., Stout, M.B., Jensen, M.D., Brimijoi, S., 2016. Butyrylcholinesterase deficiency promotes adipose tissue growth and hepatic lipid accumulation in male mice on high-fat diet. *Endocrinology*, 157, 3086-3095.
- Clifford, M.N., Scalbert, A., 2000. Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1119-1125
- Çağlayan, C. and Gulcin, İ., 2018. The toxicological effects of some avermectins on goat liver carbonic anhydrase enzyme. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32, e22010.
- Çağlayan, C., Demir, Y., Küçükler, S., Taslimi, P., Kandemir, F.M., Gülçin, İ., 2019. The effects of hesperidin on sodium arsenite-induced different organ toxicity in rats on metabolic enzymes as antidiabetic and anticholinergics potentials: A biochemical approach. *Journal of Food Biochemistry*. 43, e12720.
- Çakmak, K. C. and Gülçin, İ., 2019. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. *Toxicology Reports*, 6, 1273–1280.
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Menzek, A., Gülçin, İ., 2012. Synthesis and antioxidant properties of (3,4-dihydroxyphenyl) (2,3,4-trihydroxyphenyl) methanone and its derivatives. *Archive Der Parmazie* 345, 323–334.
- David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., Parrish, J.P., 2004. Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 453-478.
- Davies, K., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 50, 279-289.
- Diplock, A., 1998. *Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients*. ILSI Europe Concise Monograph Series, 59 p. Belgium.
- Dirir, A.M., Daou, M., Yousef, A.F., Yousef, L.F., 2021. A review of alpha-glucosidase inhibitors from plants as potential candidates for the treatment of type-2 diabetes. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 1–31.
- Durmaz, L., Erturk, A., Akyüz, M., Kose, L.P., Uc, E. M., Bingol, Z., Gulcin, İ. (2022). Screening of carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzyme inhibition effects and antioxidant activity of coumestrol. *Molecules*, 27(10), 3091.

- Elmastas, M., Turkecul, I., Ozturk, L., Gulcin, I., Isildak, O., Aboul-Enein, H. Y., 2006. Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 9(6), 443-448.
- Engstrand, C., Jonsson, B.H., Lindskog, S. 1995. Catalytic and inhibitor-binding properties of some active-site mutants of human carbonic anhydrase I. *European Journal of Biochemistry*, 229, 696-702.
- Feldstein, J.B. and Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *The Journal of biological chemistry*, 259, 5447-5453.
- Forette, F., Boller, F., 2000. Alzheimer hastalığında ilaç geliştirilmesi: Tarihçesine bakış ve geleceğine ilişkin öngörülerin: Alzheimer hastalığının farmakoterapisi, (Gauthier, S., Ed.), 1-15, Yelkovan Yayıncılık, İstanbul.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K., 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2),137-147.
- Genç B., H., Taslimi, P., Akyuz, B., Tuzun, B., Gulcin, I. (2020). Synthesis, characterization, biological evaluation, and molecular docking studies of some piperonyl-based 4-thiazolidinone derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 353(1), 1900304.
- Gomez R. P., Moran MA. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in senile plaques in the brains of aged and Alzheimer disease patients. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 1997;30(3):161-173.
- Göçer, H., 2013. Antioxidant properties of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) seeds *International Journal of Academic Research*, 5(5), 120-124.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S., Gülçin İ., 2013. Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopaminereleated compounds. *Archiv der Pharmazie*.346, 783-792.
- Göçer, H., Gülçin İ., 2013. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149154.
- Gülçin, İ, Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2012b. Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 489-499.
- Gülçin, İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents-An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Gülçin, İ. Tel, A.Z., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, S., 2019. Sage (*Salvia pilifera*): Determination its polyphenol contents, anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2062-2074
- Gülçin, İ., 2002. Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı in vivo etkilerinin incelenmesi. *Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s114
- Gülçin, İ., 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Gülçin, İ., 2006b. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
- Gülçin, İ., 2007. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical 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(6), 871-876.
- Gülçin, İ., 2009. Antioxidant activity of L-Adrenaline: an activity-structure insight *Chemico-Biological Interactions*, 179 (2-3), 71-80. 95
- Gülçin, İ., 2010b. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 210-218.
- Gülçin, İ., 2011a. Antioxidant activity of eugenol-a structure and activity relationship study. *Journal of Medicinal Food*, 14(9), 975-985.
- Gülçin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Springer Nature*, 94(3), 651-715. 96
- Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M., 2005a. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(3), 281285
- Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Alici, H.A., Elmastaş, M., Büyükokuroğlu, M.E., 2004b. In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research*, 49, 59-66.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, H.M., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010c. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2227-2238.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Küfrevioğlu Ö.İ. 2003a. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *Journal of Pineal Research*, 34, 278-281.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., Topal, F., 2010. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(1), 44-53.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009b. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood Sciences and Technology*, 43 (3),195-212.
- Gülçin, İ., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y., 2007 a. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21(4), 354-361.
- Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, H.S., Kılıç, Ö., Bursal, E., 2020 a. 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., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2010 a. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- Gülçin, İ., Kaya, R., Gören, A.C., Akıncıoğlu, H., Topal, M., Bingöl, Z., Çakmak, K. Ç.,
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 2006 a. Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -Dglucopyranosyl)- hederagenin. *Phytotherapy Research*, 20(2), 130-140.
- 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, 371-382.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., Aslan, A. 2002. Determinations of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 325-329.

- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Elmastaş, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004 a. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* T.) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Italian Journal of Food Science*, 16, 17-30.
- Gülçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadegihan, N., Bastem, E., Kufrevoğlu, Ö.İ., Türkan, F., Şen, F., 2018. Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione Stransferase enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 741746.
- Gülçin, İ., Topal, F., Çakmakçı, R., Gören, A.C., Bilsel M., Erdoğan, U., 2011. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis and antioxidant properties of domesticated and three wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Sciences*, 76(4), C585–C593
- Gülçin, İ., Topal, F., Oztürk Sarikaya, S.B., Bursal, E., Gören, A.C., Bilsel M., 2011b. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 5(3), 158-175
- Gülçin, İ., Trofimov B., Kaya, R., Taslimi, P., Sobenina, L., Schmidt E., Petrova, O., Malysheva S., Gusarova N., Farzaliyev, V., Sujayev, A., Alwasel, S., 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*.104171.
- Harborne, J. B., 1994. The flavonoids advances in prevention of gastric necrosis produced by alcohol. Research since 1986. Chapman & Hall, London
- Harborne, J.B., Baxter, H., Moss, G.P., 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*, 2nd edn. Taylor and Francis, London
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem* 46:2123–2129
- Hashmi, S., Khan, S., Shafiq, Z., Taslimi, P., Ishaq, M., Sadeghian, N., Karaman, H.S., Akhtar, N., Islam, M., Asari, A., Mohamad, H., Gülçin, İ., 2021. Probing 4-(diethylamino)-salicylaldehyde-based thiosemicarbazones as multi-target directed ligands against cholinesterases, carbonic anhydrases and α -glycosidase enzymes. *Bioorganic Chemistry*, 107, 104554.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392,83–92.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2017. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, 2017, 7616791.
- Kalin, P., Sehitoglu, M.H., Han, H., Gülçin, İ., Ozkan, A., Aboul-Enein, H.Y., 2015. Pistachio (*Pistacia vera* L.) Gum: A potent inhibitor of reactive oxygen species. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30, 264-269.
- Kaya, S., Tüzün, B., Kaya, C., Obot, I. B. 2016. Determination of corrosion inhibition effects of amino acids: Quantum chemical and molecular dynamic simulation study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 528–535.

- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2020. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Ko, F.N., Chu, C.C., Lin, C.N., Chang, C.C., Teng, C. M. 1998. Isoorientin-6''-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1389(2), 81-90.
- Köksal, E., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32(1), 65-78.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A.C., Alwasel, S.H., 2017. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 514-525.
- Köse, L.P., Bingöl, Z., Kaya, R., Gören, A.C., Akıncıoğlu, H., Durmaz, L., Köksal, E., Alwasel, S., Gülçin, İ., 2020. Anticholinergic and antioxidant activities of avocado (*Folium persea*) leaves – phytochemical content by LC-MS/MS analysis. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 878-893
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Lam, K.Y., Ling, A. P.K., Koh, R.Y., Wong, Y.P., Say, Y.H. 2016. A review on medicinal properties of Orientin. *Advances in Pharmacological Sciences*,.
- Li, Q., Yang, H.Y., Chen, Y., Sun, H.P. 2017. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 132:294-309.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H. M. 2008. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646.
- Lockridge, O. 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 34-46.
- Lopez-Lazaro, M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid Luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31-59.
- 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.
- Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiological Reviews*, 47, 595-781.
- Marucci, G., Buccioni, M., Ben, D.D., Lambertucci, C., Volpini, R., Amenta, F., 2021. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., Aquino, R. 2007. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*, 70(12), 1889-1894.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167-1179.

- Mishra, C.B., Tiwari, M., Supuran, C.T., 2020. Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2485–2565.
- Nazck, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 4(5), 1523–1542.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2008. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, 1130p, New York, USA. Nigrum) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(7), 491-499
- Nüblein, B., Kreis, W. 2000. Purification and characterization of a cynaroside 7-*O*- β -*D*-glucosidase from *Cynarae scolymi* folium. In IV International Congress on Artichoke 681, 413-420.
- Oktaç, M., Yildirim, A., Bilaloglu, V., Gülçin, I., 2007. Antioxidant activity of different parts of isgin (*Rheum ribes* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19(4), 3047.
- Öztaşkın, N., Kaya, R., Maraş, A., Şahin, E., Gülçin, İ., Göksü, S., 2019. Synthesis and characterization of novel bromophenols: Determination of their anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities. *Bioorganic Chemistry*, 87, 91-102.
- Pokorny, J., 1988. Autoxidation of unsaturated lipids. In: Chan. H., (ed) Academic Press, 141 p, London
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), 955-979.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, 81-86.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rimm, E.B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M., Willett, W., 1996a. Vegetable, fruits, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Jama-J Am Med Assoc* 275:447–451
- Burmaoğlu, S., Yılmaz, A.O., Polat, M.F., Kaya, R., Gülçin, İ., Algül, Ö. 2021. Synthesis of novel tris-chalcones and determination of their inhibition profiles against some metabolic enzymes. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 127(2), 153-161.
- Sarıkaya, S.B.Ö., Durmaz, L., 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.
- Selvi, R.B., Swaminathan, A., Chatterjee, S., Shanmugam, M.K., Li, F., Ramakrishnan, G.B., Kundu, T.K. 2015. Inhibition of p300 lysine acetyltransferase activity by Luteolin reduces tumor growth in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) xenograft mouse model. *Oncotarget*, 6 (41), 43806-43818.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44(3), 158-163
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—a review. *Journal of Functional Foods*, 18:820–897.

- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase 4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 320, 315322.
- S. Schrödinger Sürüm 2021-4: Maestro, LLC, New York, NY 2021.
- Stryer, L., 2014. Enzimler, Temel Kavramlar ve Enzim Kinetiği. Biyokimya Yedici Baskıdan Çeviri. Palme Yayıncılık. Ankara, 219-248.
- Sun, H., Shen, M.L., Pang, Y.P., Lockridge, O., Brimijoin, S., 2002. Cocaine metabolism accelerated by a re-engineered human butyrylcholinesterase. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 302(2):710716.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors-Part 94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? European Journal of Medicinal Chemistry, 35 (9), 867-874.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Medicinal Research Reviews, 23, 146-189.
- Tan S., Evans, R., Singh, B., 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crop. Amino Acids, 30, 195–204.
- Taslimi, P., Aslan, H.E., Demir, Y., Öztaşkın, N., Maraş, A., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Göksü, S., 2018. Diarylmethanon, bromophenol and diarylmethane compounds: Discovery of potent aldose reductase, α -amylase and α -glycosidase inhibitors as new therapeutic approach in diabetes and functional hyperglycemia. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 857-863.
- Taslimi, P., Gülçin, İ., 2018. Antioxidant and anticholinergic properties of olivetol. Journal of Food Biochemistry, 42(3), e12516.
- Taslimi, P., Erden, Y., Mamedov, S., L., Ladokhina, N., Tas, R., Tuzun, B., Sujayev, A., Sadeghian, N., Alwasel, S.H., Gülçin, İ., 2021. The biological activities, molecular docking studies, and anticancer effects of 1-arylsulfonylpyrazole derivatives. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 39(9), 3336-3346.
- Tohma, H.S. and Gülçin, I., 2010. Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). International Journal of Food Properties, 13(4), 657-671.
- Tohma, H., Gülçin, İ., Bursal, E., Gören, A.C., Alwasel, S.H., Köksal, E., 2017. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. Journal of Food Measurement and Characterization, 11(2), 556-566.
- Topal, M., Göçer, H., Topal, F., Kalin, P., Polat Köse, L., Gülçin, İ., Çetin Çakmak, K., Küçük, M., Durmaz, L., Gören, A.C., Alwasel, S.H., 2016. Antioxidant, antiradical and anticholinergic properties of cynarin purified from the illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31, 266–275
- Williams R.J., Spencer J.P., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radical Biology and Medicine, 36, 838–849.
- Wilson, I.B., Nachmansohn, D., 1954. In Ion Transport Across Membranes. Academic Press, New York. 35s.

- Xing, S., Li, Q., Xiong, B., Chen, Y., Feng, F., Liu, W., Sun, H., 2021. Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: Application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism. *Medicinal Research Reviews*, 41, 858-901.
- Yamali, C., Gul, H. I., Cakir, T., Demir, Y., Gulcin, I., 2020. Aminoalkylated phenolic chalcones: investigation of biological effects on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase I and II as potential lead enzyme inhibitors. *Letters in Drug Design & Discovery*, 17(10), 1283-1292.
- Yang, C.Y., Yen, Y.Y., Hung, K.C., Hsu, S.W., Lan, S.J., Lin, H.C., 2019. Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: A systemic review. *Nutrition and Diabetes*, 9(1), 1-6.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Adem ERTÜRK
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Mehmet Akif Ersoy Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2003)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Organik Kimya Anabilim Dalı (2017)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Kimya Anabilim Dalı (2023)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	