



**İNDOL-3-KARBİNOL ve 3,3'-DİİNDOLİLMETAN  
MOLEKÜLLERİNİN ANTİALZHEIMER, ANTİPARKİNSON,  
ANTİDEPRESİF ve ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Edanur ERÜMİT BİNİCİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Ana Bilim Dalı**

**Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU**

**AĞRI-2020**

**(Her hakkı saklıdır.)**

**T.C.**

**AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**Edanur ERÜMİT BİNİCİ**

**İNDOL-3-KARBİNOL ve 3,3'-DİİNDOLİLMETAN  
MOLEKÜLLERİNİN ANTİALZHEIMER,  
ANTİPARKİNSON, ANTİDEPRESİF ve ANTİOKSİDAN  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU**

**AĞRI-2020**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### İNDOL-3-KARBİROL ve 3,3'-DİİNDOLİLMETAN MOLEKÜLLERİNİN ANTİALZHEİMER, ANTİPARKİNSON, ANTİDEPRESİF ve ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

Jüri: Prof. Dr. İlhami Gülçin

Jüri: Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

Monoamin oksidaz A ve B (MAO-A, MAO-B) izoenzimleri, dopamin metabolizmasındaki bazı aksaklıkların sebep olduğu nörodejeneratif hastalıklarla (Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı vs.) doğrudan ilişkilidir. MAO-B'nin seçici ve geri dönüşümlü inhibitörleri parkinson hastalığı (PH) tedavisinde kullanılırken, MAO-A'nın seçici ve geri dönüşümlü inhibitörleri bazı psikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır. Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) metabolizmada Asetilkolin'i (ACh) hidrolizleme reaksiyonun da görev alan enzimdir. AChE, eritrosit, sinir hücreleri ve beyin hücrelerinde, BChE ise karaciğer, pankreas, kan serumu ve merkezi sinir sisteminde yoğun olarak bulunmaktadır. Beyindeki nörotransmitterlerin, özellikle ACh miktarının azalması, Alzheimer hastalığı (AH) ile ilişkilendirilmiştir.

Tez kapsamında indol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) moleküllerinin, AChE, BChE, MAO-A ve B enzimleri üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri çalışıldı. AChE enzimiyle yapılan inhibisyon çalışmalarında I3C için sırasıyla IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri 239,295 – 243,528 µM olarak belirlendi. Ayrıca, DİM için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 95,257– 67,195 µM olarak bulundu. BChE enzimiyle yapılan inhibisyon çalışmalarında I3C için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 21,515– 2,784 µM olarak belirlendi. Aynı zamanda, DİM için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 61,545- 35,529 µM olarak bulundu. MAO-A enzimi için I3C ve DİM maddeleri için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 19,522-20,563 µM iken MAO-B için sırasıyla 40,057- 26,653 µM olarak belirlendi.

Çalışmamızın devamında I3C ve DİM'in antioksidan ve serbest radikal giderme kapasitesini belirlemek için Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme metodu, kuprak metodu ile kuprik iyonları (Cu<sup>2+</sup>) indirgeme metodu, FRAP metodu, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil serbest radikal (DPPH·) giderme metodu ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal (ABTS<sup>•+</sup>) giderme metodları çalışıldı. Çalışma esnasında BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks molekülleri standart olarak kullanıldı. Antioksidan metodlarda aldığımız sonuçlar standartlarla karşılaştırıldı. I3C ve DİM'in güçlü antioksidan kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi.

2020, 87 Sayfa

**Anahtar sözcükler:** Antioksidan Aktivite, Monoamin oksidaz A, Monoamin oksidaz B, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz, İndol-3-Karbinol, 3,3'-Diindolilmetan

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### DETERMINATION of THE EFFECTS ANTIALZHEIMER DİSSEASE, ANTIPARKINSON DİSSEASE, ANTIDEPRESSIVE and ANTIOXIDANT ACTİVİTİES of INDOLE-3-CARBINOL and 3,3'-DIINDOLYLMETHANE MOLECULES

**Thesis Advisor: Assoc. Prof. Hülya AKINCIOĞLU**

**Jury: Prof. Dr. İlhami Gülçin**

**Jury: Assoc. Prof. Ramazan DEMİRDAĞ**

Monoamine oxidase A and B (MAO-A, MAO-B) isoenzymes are directly related to neurodegenerative diseases (Parkinson Disease, Alzheimer Disease, etc.) caused by some defects in dopamine metabolism. While selective and reversible inhibitors of MAO-B are used in the treatment of Parkinson's disease (PD), selective and reversible inhibitors of MAO-A are used in the treatment of some psychiatric disorders. Acetylcholinesterase enzyme (AChE) involved in the catalysis of the hydrolysis reaction of Acetylcholine (ACh) metabolism. AChE is found in erythrocyte, nerve cells and brain cells, BChE is intensely present in the liver, pancreas, blood serum and central nervous system. The decrease of neurotransmitters in the brain, especially the amount of ACh, has been associated with Alzheimer's disease (AD).

In the scope of the thesis, in vitro inhibition effects of indole-3-carbinol (I3C) and 3,3'-diindolylmethane (DIM) molecules on AChE, BChE, MAO-A and B enzymes were studied. In inhibition studies with AChE enzyme,  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for I3C were determined as 239,295 - 243,528  $\mu$ M, respectively. In addition,  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for DIM were found as 95,257 - 67,195  $\mu$ M, respectively. In inhibition studies with BChE enzyme,  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for I3C were determined as 21,515 - 2,784  $\mu$ M, respectively. At the same time,  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for DIM were found as 61,545 - 35,529  $\mu$ M, respectively.  $IC_{50}$  values of I3C and DIM substances for MAO-A enzyme were determined as 19,522 -20,563  $\mu$ M respectively and 40,057 - 26,653  $\mu$ M for MAO-B enzyme, respectively.

Continuation of our study, for evaluation of antioxidant and radical scavenging capacity I3C and DIM,  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  reducing capacity, cupric ion ( $Cu^{2+}$ ) reduction capacity by Cuprac method, reducing capacity by FRAP method, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl free radical (DPPH $^{\cdot}$ ) scavenging method, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS $^{+\cdot}$ ) scavenging were performed separately and during study, BHA, BHT,  $\alpha$ -tocopherol and trolox were used as the reference antioxidant compounds. The results obtained from antioxidant methods were compared with the standards. I3C and DIM molecules were possessed to have strong antioxidant capacity.

**2020, 87 Pages**

**Keywords:** Antioxidant Activity, Monoamine oxidase A, Monoamine oxidase B, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Indole-3-Carbinol, 3,3'-Diindolylmethane

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların tamamı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımın her aşamasında yanımda olup, maddi manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren kıymetli hocam Sayın Doç.Dr. Hülya AKINCIOĞLU'na minnet ve şükranlarımı sunarım.

Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarının tüm imkân ve olanaklarını kullanabilmem konusunda destek olan Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı Müdürü Sayın Doç. Dr. Harun GÜNEY'e, bu süreçte bilgi ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üye. Akın AKINCIOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarımda destek olan Sayın Öğr. Gör. Rüya KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu süreçte beni her yönden destekleyen en büyük dayanağım canım anne ve babama, gösterdikleri sabır ve desteklerinden dolayı kocaman aileme, her konuda yanımda olup ilgisini, bilgisini esirgemeyen canım eşim Fatih Ömür BİNİCİ'ye ve biricik oğlum Yusuf Melih BİNİCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

**Temmuz 2020**

**Edanur ERÜMİT BİNİCİ**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                   | İİ        |
| ABSTRACT.....                                                               | İİİ       |
| TEŞEKKÜR.....                                                               | İV        |
| İÇİNDEKİLER .....                                                           | V         |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                        | Vİİ       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                        | Vİİİ      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                     | Xİ        |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1. Enzimler .....                                                         | 1         |
| 1.1.1.Monoamin oksidaz enzimi (MAO) .....                                   | 6         |
| 1.1.1.1.Monoaminoksidaz inhibitörleri (MAO-I) .....                         | 9         |
| 1.1.2.Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE ) enzimi ..... | 10        |
| 1.2. Alzheimer Hastalığı (AH) .....                                         | 13        |
| 1.3. Parkinson Hastalığı (PH).....                                          | 14        |
| 1.4.Depresyon.....                                                          | 15        |
| 1.5. Serbest Radikaller.....                                                | 16        |
| 1.6. Oksidatif Stres .....                                                  | 17        |
| 1.7. Antioksidanlar .....                                                   | 17        |
| 1.8. Fenolik Bileşikler .....                                               | 20        |
| 1.9.İndol-3-Karbinol (I3C) .....                                            | 21        |
| 1.10. 3,3'-Diindolilmetan (DİM) .....                                       | 22        |
| 1.11. Çalışmanın Amacı .....                                                | 22        |
| <b>2. KAYNAK ÖZETİ .....</b>                                                | <b>24</b> |
| <b>3. MATERYAL YÖNTEM .....</b>                                             | <b>26</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                          | 26        |
| 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....                                   | 26        |
| 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....                                    | 26        |
| 3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması .....                           | 26        |
| 3.2. Yöntem .....                                                           | 30        |
| 3.2.1. Enzim inhibisyon çalışmaları .....                                   | 30        |
| 3.2.2. Antioksidan Çalışmalar .....                                         | 32        |
| <b>4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR.....</b>                                        | <b>35</b> |

|                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Moleküllerinin İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları..... | 35        |
| 4.2. Bütirilkolinesteraz Enziminin Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Molekülleri İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları.....   | 38        |
| 4.3. Monoamin Oksidaz A ve B Enzimi Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Molekülleri İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları ..... | 41        |
| 4.4. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları .....                                                                                                                                     | 43        |
| <b>5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>56</b> |
| <b>KAYNAKÇA.....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>67</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                                                                                                                                | <b>75</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|
| ABTS              | 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)          |
| ABTS <sup>+</sup> | 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)radikali  |
| AChE              | Asetilkolinesteraz                                            |
| ACh               | Asetilkolin                                                   |
| BChE              | Bütirilkolinesteraz                                           |
| BHA               | Bütillenmiş hidroksianisol                                    |
| BHT               | Bütillenmiş hidroksitoluen                                    |
| ChAT              | Kolin asetiltransferaz                                        |
| DİM               | 3-3'-diindolilmetan                                           |
| DPPH              | 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil                                 |
| DPPH <sup>•</sup> | 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 kod numarası                                            |
| I                 | İnhibitör                                                     |
| I3C               | İndol-3-Karbinol                                              |
| IUB               | Uluslararası biyokimya birliği                                |
| IUMBM             | Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği          |
| IC <sub>50</sub>  | Enzimin maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu |
| K <sub>i</sub>    | Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti                   |
| K <sub>m</sub>    | Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsntrasyonu     |
| MAO-A             | Monoamin oksidaz A                                            |
| MAO-B             | Monoamin oksidaz B                                            |
| MAO-I             | Monoamin oksidaz inhibitörleri                                |
| TCA               | Triklorasetik asit                                            |
| Tris              | Trihidroksimetil amino metan                                  |
| Troloks           | 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit       |
| UPDRS             | Unified Parkinson's Disease Rating Scale                      |
| V                 | Enzimatik reaksiyon hızı                                      |
| V <sub>max</sub>  | Enzimin maksimum hız                                          |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Enzim ile substrat arasında anahtar-kilit modeli.....                                                                                                                   | 1  |
| Şekil 1.2. Enzim ile substrat arasında indüklenmiş uyum modeli.....                                                                                                                | 2  |
| Şekil 1.3. Holoenzim yapısı (Setiawan, 2020).....                                                                                                                                  | 3  |
| Şekil 1.4. Yarışmalı (kompetitif) İnhibisyon.....                                                                                                                                  | 5  |
| Şekil 1.5. Yarışmasız (nonkompetitif) İnhibisyon.....                                                                                                                              | 5  |
| Şekil 1.6. Yarı yarışmalı (unkompetitif) İnhibisyon.....                                                                                                                           | 6  |
| Şekil 1.7. Lineer-Karışık İnhibisyon.....                                                                                                                                          | 6  |
| Şekil 1.8. İnsan MAO-A ve insan MAO-B enzimlerinin üç boyutlu yapısı....                                                                                                           | 8  |
| Şekil 1.9. Asetilkolinesteraz enziminin hidroliz mekanizması.....                                                                                                                  | 11 |
| Şekil 1.10. Bütirilkolinesteraz enziminin hidroliz mekanizması.....                                                                                                                | 10 |
| Şekil 1.11. Katekolaminerjik nöronlarda Asetilkolinesteraz.....                                                                                                                    | 12 |
| Şekil 1.12. Bazı sentetik antioksidanlar.....                                                                                                                                      | 20 |
| Şekil 1.13. İndol-3-carbinol (I3C).....                                                                                                                                            | 21 |
| Şekil 1.14. 3,3'-diindolilmetan (DİM) yapısı.....                                                                                                                                  | 22 |
| Şekil 4.1. Asetilkolinesteraz enziminin çalış ılan beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) -[I3C] grafiği.....                                    | 36 |
| Şekil 4.2. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....    | 37 |
| Şekil 4.3. Asetilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) -[DİM] grafiği.....                                  | 37 |
| Şekil 4.4. Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği..... | 38 |
| Şekil 4.5. Bütirilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) -[I3C] grafiği.....                                    | 39 |
| Şekil 4.6. Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....   | 39 |
| Şekil 4.7. Bütirilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%) -[DİM] grafiği.....                                 | 40 |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.8.</b> Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....                                                       | 40 |
| <b>Şekil 4.9.</b> MAO-A enzimi kullanılarak beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği.....                                                                                                          | 42 |
| <b>Şekil 4.10.</b> MAO-A enzimi kullanılarak beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği.....                                                                                                      | 42 |
| <b>Şekil 4.11.</b> MAO-B enzimi kullanılarak beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği.....                                                                                                         | 42 |
| <b>Şekil 4.12.</b> MAO-B enzimi kullanılarak beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği.....                                                                                                      | 43 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) I3C ve DİM moleküllerinin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 44 |
| <b>Şekil 4.14.</b> I3C, DİM moleküllerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması..... | 45 |
| <b>Şekil 4.15.</b> Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM moleküllerinin (10-30 µg/mL) FRAP indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....                            | 46 |
| <b>Şekil 4.16.</b> DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....                                                                                                                                                   | 47 |
| <b>Şekil 4.17.</b> Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM'in (10-30 µg/mL) DPPH giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....                                          | 48 |
| <b>Şekil 4.18.</b> ABTS <sup>•+</sup> giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS <sup>•+</sup> için hazırlanan standart grafik.....                                                                                                            | 48 |
| <b>Şekil 4.19.</b> Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM moleküllerinin (10-30 µg/mL) ABTS <sup>•+</sup> giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması.....                | 49 |
| <b>Şekil 4.20.</b> Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin AChE enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi.....                                               | 51 |

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.21.</b> Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin BChE enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi.....  | 51 |
| <b>Şekil 4.22.</b> Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin MAO-A enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi..... | 52 |
| <b>Şekil 4.23.</b> Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin MAO-B enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi..... | 52 |
| <b>Şekil 4.24.</b> AChE enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları....                                   | 53 |
| <b>Şekil 4.25.</b> BChE enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları....                                   | 53 |
| <b>Şekil 4.26.</b> MAO-A enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları.....                                 | 54 |
| <b>Şekil 4.27.</b> MAO-B enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları.....                                 | 54 |
| <b>Şekil 5.1.</b> Rasagilin ve selegilin yapısı.....                                                                                                                                                | 56 |
| <b>Şekil 5.2.</b> İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) moleküllerinin yapısı.....                                                                                                    | 57 |

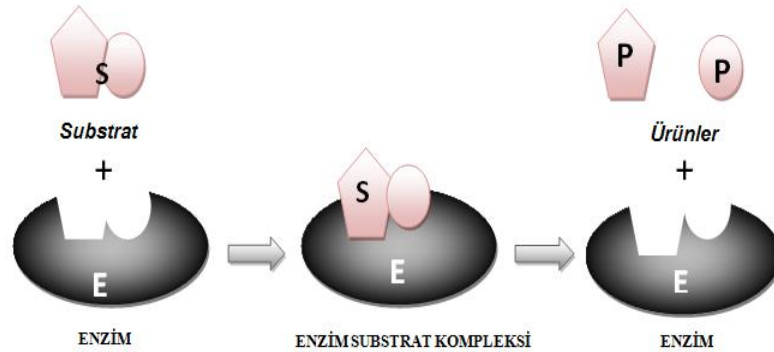
## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Enzim Sınıfları ve Katalizledikleri Reaksiyonlar.....                                                                                                                                                                                                                | 4  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> Serbest Radikal Kaynakları.....                                                                                                                                                                                                                                      | 17 |
| <b>Çizelge 1.3.</b> Doğal ve sentetik antioksidanların karşılaştırılması.....                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> AChE ve BChE enzimlerinin aktivite tayininde kullanılan kuvvet içerikleri .....                                                                                                                                                                                      | 31 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> AChE enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM'in inhibisyon sonuçları.....                                                                                                                                                                 | 38 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> BChE enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon sonuçları .....                                                                                                                                                    | 41 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> MAO-A ve B enzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM moleküllerinin IC <sub>50</sub> ve R <sup>2</sup> değerleri.....                                                                                                                  | 43 |
| <b>Çizelge 4.4.</b> 10 µg/mL konsantrasyonunda I3C ve DİM'in çözeltilerinin ferrik iyonlarını (Fe <sup>3+</sup> ) ve kuprik (Cu <sup>2+</sup> ) iyonlarını ve FRAP indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları..... | 46 |
| <b>Çizelge 4.5.</b> I3C, DİM molekülleri ve standart antioksidanlara ait DPPH <sup>•</sup> ve ABTS <sup>•+</sup> radikal giderme aktiviteleri sonucu hesaplanan IC <sub>50</sub> ve R <sup>2</sup> değerleri...                                                                          | 50 |
| <b>Çizelge 4.6.</b> Çalışılan inhibitörlerin moleküler docking skorları, bağlanma enerjileri (kcal/mol ) ve ligand etkileşim türlerinin sonuçları.....                                                                                                                                   | 50 |
| <b>Çizelge 5.1.</b> MAO-A, MAO-B enzimlerinin I3C ve DİM molekülün IC <sub>50</sub> sonuçları.....                                                                                                                                                                                       | 57 |
| <b>Çizelge 5.2.</b> AChE, BChE enzimlerinin I3C ve DİM ile inhibisyon çalışma sonuçlarıyla elde edilen IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> ortalama değerleri.....                                                                                                                        | 60 |
| <b>Çizelge 5.3.</b> Çalışmada kullanılan I3C ve DİM moleküllerinin 10 µg/mL konsantrasyonunda Demir indirgeme, Kuprak ve FRAP metodunun standart antioksidanlarla mukayesesi.....                                                                                                        | 63 |
| <b>Çizelge 5.4.</b> I3C ve DİM ve standart antioksidanlara ait DPPH <sup>•</sup> ve ABTS <sup>•+</sup> radikal giderme aktiviteleri ile ilgili IC <sub>50</sub> (µg/mL) değerleri.....                                                                                                   | 64 |

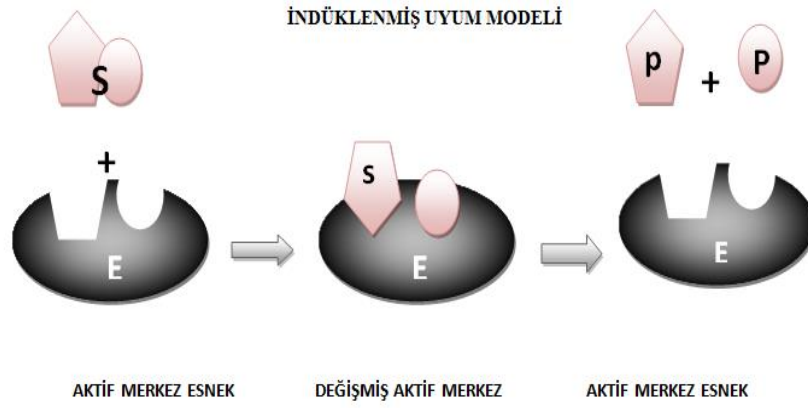
## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen neredeyse tamamı protein yapılı moleküllerdir. Katalizledikleri reaksiyonlardan hiçbir değişikliğe uğramadan çıkarlar. Enzimle katalizlenen reaksiyonlar enzimsiz reaksiyonlara oranla yaklaşık  $10^5$  kat daha hızlı gerçekleşir (Kalaycıoğlu vd 2013; Nelson and Cox 2013). Enzimler sadece hücre içinde (*in vivo*) aktivite göstermekle kalmayıp, optimal şartlar sağlandığında hücre dışında (*in vitro*) da aktivite gösterebilirler. Bu nedenle enzimlerden çeşitli iş sahalarında yararlanılmaktadır (Kara 2009). Biyolojik reaksiyonların katalizörü olan enzimlerin etki ettiği maddelere substrat, katalizlenen reaksiyon sonucu elde edilen maddeye ürün denilir. Ürün oluştuktan sonra enzim tekrar ürün oluşturmak üzere farklı bir substratla reaksiyona girmektedir. Bu döngü uygun şartlar ve ihtiyaç halinde tekrarlanır (Bhat 2000). Enzim substrat bağlanma modeli, iki model ile açıklanmıştır. Bunlardan birincisi anahtar-kilit modeliyken diğeri indüklenmiş-uyum modelidir. Anahtar-kilit modeli Emil Fischer tarafından 1984 yılında ileri sürülmüştür (Fischer 1984). Enzim substrat arasındaki bağlantı anahtar kilit uyumuna benzetilmiştir. İndüklenmiş-uyum modeli ise Daniel Koshland tarafından 1958 yılında ileri sürülmüştür (Koshland 1958). Bu modelde ya ortamda substrat yoktur ya da olan substrat katalize uygun hale gelmektedir (Nelson and Cox, 2004; Megep, 2006).

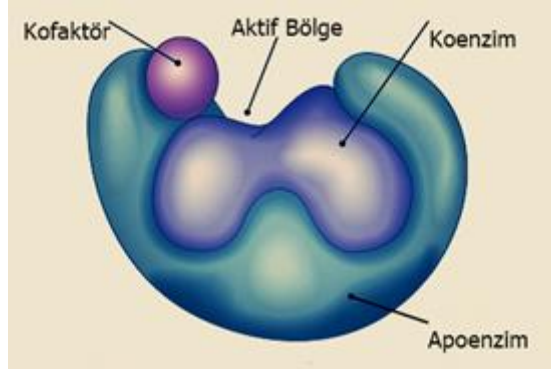


Şekil 1.1. Enzim - substrat arasındaki anahtar-kilit modeli



**Şekil 1.2.** Enzim - substrat arasındaki indüklenmiş uyum modeli

Enzimler hem katalizledikleri tepkimeye hemde substratlarına çok özgüdürler. Genellikle enzimler bir kimyasal tepkimeyi veya birbirine benzer bir grup tepkimeyi katalizlerler (Nelson and Cox, 2004). Kimyasal ve fiziksel nitelikleri farklı ancak aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen enzimlere izoenzim denir. İzoenzimler izoelektrik noktalarının, aminoasit dizilimlerinin, elektriksel alan hareketlerinin farklı olması yönüyle birbirlerinden ayrılırlar. Ayrıca inhibitör ve substratlarına karşı afiniteleride farklılık gösterir (Devlin, 2002; Müşerref, 2012). Enzimler bazen yapılarında bulunmayan metal iyonlarına veya kompleks organik moleküllere ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyaç duydukları yapılar  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  gibi metal iyonları içeriyorsa buna kofaktör,  $NAD^+$ ,  $FAD^+$  gibi kompleks organik molekül içeriyorsa koenzim denir. Bazı enzimler bu iki yapıyı birlikte kullanabilirler (Onat 1996). Eğer enzim kofaktörü ya da koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif halde bulunuyorsa enzimin bu haline holoenzim denir. Bu tür enzimlerin kofaktörden ve koenzimden ayrılmış aktif olmayan haline apoenzim denir.



**Şekil 1.3.** Holoenzim yapısı (Setiawan, 2020)

Enzimlerin genel özellikleri;

- Hücre içinde sentezlenirler. Ancak hem hücre içi hemde hücre dışında kullanılabilirler.
- Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar.
- Enzimler spesifiktirler.
- Bazı enzimler katalizledikleri reaksiyonun çeşidine ve etki ettikleri maddelerin sonuna -az eki alarak adlandırılırlar.
- Enzimler multienzim sistemi olarak çalışabilirler. Bir enzimin son ürünü diğerinin substratı olabilir.
- Enzim tepkimelerinin büyük kısmı dönüşümlüdür.
- Enzimlerin katalizledikleri tepkimlerin hangi yönde ilerleyeceğini termodinamik kanunlar belirler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).
- Uluslararası biyokimya birliği (IUB) tarafından, enzimler katalizledikleri reaksiyona göre altı sınıfta toplanmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

**Çizelge 1.1. Enzim Sınıfları ve Katalizledikleri Reaksiyonlar**

| Sınıf Adı                | Katalizlenen Tepkime                                                                |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Oksidoredüktazlar     | Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalizler.                                   |
| 2. Transferazlar         | Hidrojen harici işlevsel grupların transferini sağlar.                              |
| 3. Hidrolazlar           | Hidrolitik reaksiyonları katalizler.                                                |
| 4. Liyazlar              | Grupların uzaklaşması veya katılması ile çift bağ oluşumu sağlar.                   |
| 5. İzomerazlar           | Bir moleküldeki geometrik, optik ve yapısal izomerizasyon değişikliğini katalizler. |
| 6. Ligazlar(Sentetazlar) | C-O, C-S, C-N ve C-C arası bir bağ oluştururlar.                                    |

Enzimler substrat molekülünü bağlayarak, parçalanacak bağı aktif merkeze yaklaştırırlar. Bazı enzimler substrat ile dayanıksız kovalent ara ürün oluşturarak, asit-baz katalizi yaparak ya da substrattaki bağın gerilmesini sağlayarak katalitik etki gösterebilirler. Her enzimin katalitik aktive gösterebilmesi için belirli optimal şartları vardır. Enzim aktivitelerini etkileyen faktörler;

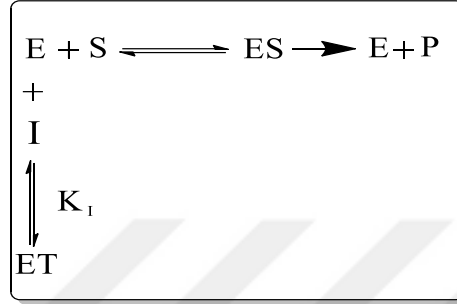
- Sıcaklık
- pH
- Zaman
- Enzim substrat konsantrasyonu
- Ortamda inhibitör veya aktivatör varlığı
- Radyoaktivite, UV
- Reaksiyon ürünleri
- İyon konsantrasyonları
- Bazı fiziksel dış etmenler olarak sıralanabilir (Nelson and Cox 2013).

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşiklerce durdurulması veya azaltılması olayına enzim inhibisyonu denir. İnhibe edici bileşiklere inhibitör adı verilir. İnhibitörler genel itibariyle küçük molekül yapısına sahip bileşik veya iyonlardır. İnhibisyon olayı biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması olarak kullanıldığı için büyük öneme sahiptir (Keha ve Küfrelioğlu 2004). İnhibisyon çalışmaları enzim mekanizmaları hakkında bilgi verdiği gibi bazı metabolik yollar hakkında da bilgi



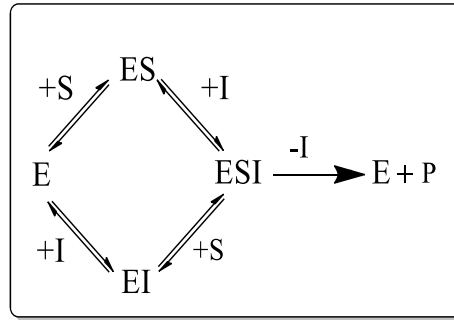
verir. Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz inhibisyon olarak ikiye ayrılır (Nelson and Cox 2013). Dönüşümlü inhibisyon dörde ayrılır. Bunlar;

**Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon:** Bu inhibitörler enzimin aktif bölgesine yani substratın bağlandığı yere bağlanırlar. Bu sebeple substrat ve inhibitör yarışma halindedir. Substrat konsantrasyonu artırılarak enzim substrat etkileşimi gerçekleştirilir (Gözükara 2011).



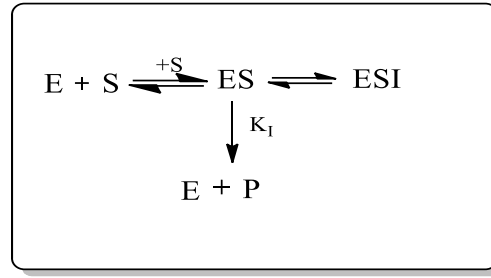
Şekil 1.4. Yarışmalı (kompetitif) İnhibisyon

**Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon:** Bu inhibitörler enzime aktif bölgenin dışında bir yerden bağlanırlar. Oluşan inhibisyona yarışmasız inhibisyon adı verilmektedir. Enzimin üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olurlar. Yarışmalı inhibisyon gibi konsantrasyonu artırmak her hangi bir değişiklik oluşturmamaktadır (Gözükara 2011).



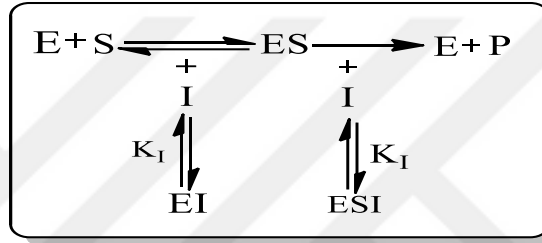
Şekil 1.5. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon

**Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon:** Bu inhibitörler doğrudan enzime değil enzim substrat kompleksine bağlanırlar. Oluşan inhibisyona yarı yarışmalı inhibisyon adı verilmektedir (Gözükara 2011).



**Şekil 1.6.** Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

**Lineer-Karışık inhibisyon:** Enzim, substrat ve inhibitöre ait bağlanma denge sabitlerinin farklılaştığı özel bir nonkompetitif inhibisyon türüdür (Nelson and Cox 2013).



**Şekil 1.7.** Lineer-karışık inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyon inhibitörün enzimin aktif bölgesine dönüşümsüz olarak bağlanması durumudur. Enzim aktivitesi için elzem olan bir gruba bozucu etki etmesi veya kovalent olarak enzime bağlanarak kararlı bir yapı oluşturup üç boyutlu yapıyı bozması olarak da tanımlanabilir (Nelson and Cox 2013). Örneğin Sinir gazı zehirlenmeleri, ağır metaller, bazı insektisitler dönüşümsüz inhibisyona yol açar (Nelson and Cox 2013).

#### 1.1.1. Monoamin oksidaz enzimi (MAO)

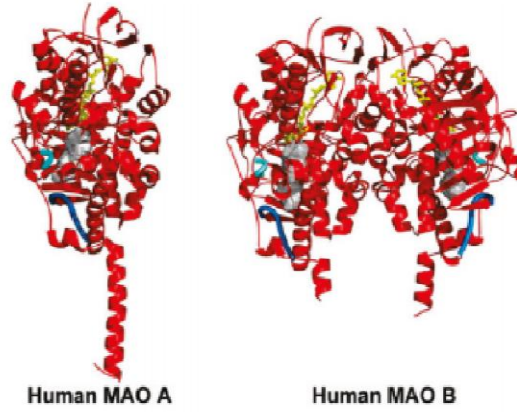
Monoamin oksidaz enzimi (MAO) mitokondri dış zarında lokalize olmuş, flavin molekülü (FAD) içeren ve nörotransmitter aminlerin oksidasyonunu katalizleyen enzimdir (De Colibus *et al.* 2005). MAO, 1930'da keşfedilmiş nörotransmitter metabolizmasının önemli enzimlerinden biridir (Youdim and Riederer 2004).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) E.C.1.4.3.4 enzim kod numarasını vermiştir (Weyler *et al.* 1990). Serotonin, dopamin gibi amin grubu içeren nörotransmitterlerin oksidasyonunu katalizlerler. Başka bir ifadeyle primer ve sekonder aminlerin iminlere oksidasyonunu katalizleme yapmaktadırlar. Bu

aminlerin metabolizmada canlılığa, hipofizin düzenlenmesine, beslenme davranışlarına ve uyku gibi temel olaylara etkisi bulunmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar dopamin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin nörodejeneratif hastalarda normal seviyeden oldukça az olduğu saptanmıştır. Parkinson hastalığında (PH) dopamin, depresyon hastalarında serotonin azlığı bilinmektedir. MAO enzimi inhibitörleri yani enzimi inaktivite eden bileşikler anti-depresif ve anti-parkinson etkiye sahiptir (Binda *et al.* 2004).

MAO enzimi dopaminerjik, noradrenerjik ve serotonerjik sinir uçlarında bulunur. Sinir uçlarındaki MAO enzimi, sitoplazmaya nöromediyatör veziküllerden sızan nöromediyatör moleküllerin bir kısmını oksidatif deaminasyona uğratarak etkisizleştirir. Oksidatif deaminasyona uğramayan moleküller sitoplazma membranından geçip sinaps aralığına ulaşabilirler. MAO enzimi geri-alım (re-uptake) ile sitoplazmada bulunan nöromediyatör moleküllerini etkisizleştirir. Bu işleyiş ile dokulardaki nörotransmitter maddelerin miktarları olması beklenen seviyede yani denge durumunda kalır (Kayaalp 2005).

MAO'nun iki farklı formu 1968 yılında yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Bunlar MAO-A ve MAO-B izoenzimleri olarak adlandırılmıştır. İnsan beyinde bulunan MAO enziminin %80'i MAO-B'dir (Binda *et al.* 2002). MAO enzimi karaciğer ve plasentada çokça bulunurken, dalakta az miktarda bulunur (Kalgutkar *et al.* 2001). Beyinde katekolaminerjik nöronlarda çoğunlukla MAO-B, serotonerjik ve histaminerjik nöronlarda MAO-A bulunur (Naoi *et al.* 2016). MAO'nun izoenzimleri olan MAO-A ve MAO-B substrat tercihleri, inhibitör seçicilikler, dokudaki dağılımları, aminoasit dizilimleri ve immünolojik özellikleri ile birbirlerinden ayrılırlar (Abdelhafez *et al.* 2013). Yapılan araştırmalar bu iki formun %70 benzerlik gösterdiğini MAO-A'nın 527, MAO-B'nin 520 aminoasit kalıntısı ihtiva ettiğini göstermiştir (Lee *et al.* 2006). MAO-A epinefrin, serotonin ve norepinefrini seçici olarak okside eder. Ayrıca klorgilin tarafından selektif olarak inhibe edilir. MAO-B benzilamin ve  $\beta$ -fenetilamini oksitler ve rasagilin ve selegilin tarafından inhibe edilir (Matos *et al.* 2012; Abdelhafez *et al.* 2013).



**Şekil 1. 8.** İnsan MAO-A ve insan MAO-B enzimlerinin üç boyutlu yapısı (C. Binda *et al.* 2011)

Yaşlanmayla birlikte MAO-A ve MAO-B'nin metabolizmadaki aktivitesi artar. MAO-B glia hücrelerinde bulunmaktadır. Glia hücreleri nöronların yanında onlardan miktarca daha fazla bulunan nöron hücrelerine destekçi hücrelerdir. Glia hücrelerinde MAO-B'nin çok bulunması ve aktivitesinin artması yaşlanmaya ve gliozise bağlıdır. Merkezi sinir sisteminde hasar olması durumunda astrositler proliferer olurlar. Gliosis bu durumda hasar gören dokunun yerini bağ dokunun almasıdır. MAO-B yalnızca dopamin metabolizmasıyla değil aynı zamanda serbest radikal ve diğer nörotoksik türlerle de ilişkilidir. MAO-B'nin katalitik çevriminde, her 1 mol dopamin molekülünün metabolize edilmesi sonucu ürün olarak 1 mol  $H_2O_2$  ve dopaaldehit molekülü oluşur (Fowler *et al.* 1980; Westlund *et al.* 1988; Saura *et al.* 1996; Parkinson and Ogilvie 2008). Bu metabolik ürünler toksik oldukları için PH'nın patogeneğinde artırıcı rol oynar (Cohen and Neural 1990). MAO-B aktivitesinin arttığı durumlarda, AH'nın beyinlerinde bulunan astrosit (yıldız şekilli glia hücreleri) hücrelerinde plaklar gözlenmiştir. MAO-B aktivitesinin artışı aynı zamanda  $\beta$  amoloyid plak oluşumunda etkili olan OH radikalının artışına da sebep olmaktadır. Dolayısıyla, seçici tersinir MAO-B inhibitörlerinin terapötik potansiyeli sadece dopaminin (semptomatik etkileri) biyolojik yarılanma ömrünü artırma yeteneklerine sahiptir. Aynı zamanda Parkinson hastalığının hızlı ilerleyişini düzenleyerek yavaşlatır ve  $\beta$  amoloid plak oluşumunu inhibe eder (Fowler *et al.* 1980).

#### 1.1.1.1.Monoaminoksidaz inhibitörleri (MAO-I)

Monoaminoksidaz inhibitörleri (MAO-I), mitokondriyal bir enzim olan MAO enzimi izoformlarını ve farklı enzimleri de kuvvetli bir şekilde inhibe edebilmektedir. İnhibisyon genellikle geri dönüşümsüzdür. Seçici olmayan geri dönüşümsüz bu tür inhibitörlerin farmakolojik açıdan etkili olmasına rağmen plazmada oluşturdıkları toksik birikim sebebiyle tercih edilmezler. MAO-I'lerin yapılan çalışmalarda antidepresan etkisi tespit edilmiştir. Bu etkinin merkezi sinir sisteminde MAO enziminin inhibisyonuyla ortaya çıktığı bulunmuştur (Eşkazan ve Kayaalp 2009; Tural ve Önder 2001). İlk kullanılan MAO-I'leri sebep olduğu birçok yan etkilerden dolayı artık sıklıkla kullanılmamaktadır. Bu ilaçların yan etki yapmalarının sebebi MAO enziminin seçici olarak inhibe etmemesi ve geri dönüşümsüz inhibisyona uğramasından kaynaklanmaktadır. Yeni kuşak inhibitörler MAO-A ve MAO-B enzimini seçici olarak inhibe ettiklerinden son yıllarda bu ilaçlara özellikle inhibitör potansiyeli olan doğal moleküllere olan ilgi artmaktadır (Sahoo and Suar 2010). Bunun yanında geri dönüşümlü ve seçici inhibitörlerin bulunması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde monoamin oksidaz inhibitörleri önemli yer tutar (Sahoo *et al.* 2010). MAO-I dopamin, serotonin ve noradrenalin etkisini azalatarak sinir uçlarında bulunan MAO enzimini inhibe eder. Bunun sonucunda da nörotransmitterlerin miktarca azalmasını engelleyip nöronlardaki düzeyinin artmasına yardımcı olur. Depresif durum kaynaklı nörotransmitter eksikliğini önlediği düşünülür (Nair *et al.* 1993). MAO enziminin iki izoformu olduğu belirtilmiştir. Bu izoformlardan biri olan MAO-A inhibitörlerinin depresyon gibi ruhsal bozuklukların tedavisinde, MAO-B'nin ise Alzheimer ve Parkinson gibi demans tetikleyici ve beyin fonksiyonlarını bloke eden hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Sahoo *et al.* 2010).

MAO inhibitörleri başlıca birinci, ikinci, üçüncü kuşak inhibitörleri olarak üçe ayrılır.

**Birinci Kuşak MAO İnhibitörleri:** Bu inhibitörler, enzimi geri dönüşümsüz inhibe eder ve seçici inhibisyon göstermezler. Bu grup inhibitörlerin ciddi sağlık sorunlarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer üzerine olumsuz etkileri vardır (Eşkazan ve Kayaalp 2009).

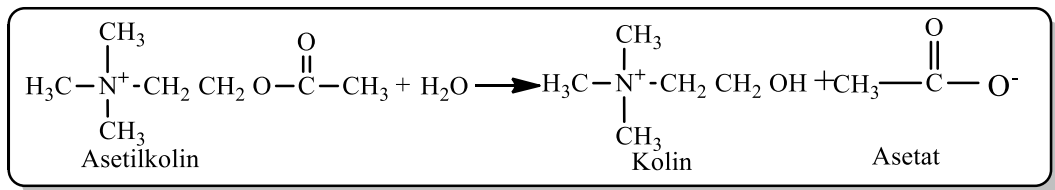
**İkinci Kuşak MAO İnhibitörleri:** Bu inhibitörler, enzimi genel olarak geri dönüşümsüz inhibe eder fakat seçici etkileşim gösterirler. MAO-A seçici inhibitörü klorjilin, MAO-B seçici inhibitörü içinse rasagilin, selegilin (deprenil) ve pargilin kullanılır (Palaska 2004). Bunun yanında hem geri dönüşümlü hem de seçici özellik gösteren ikinci kuşak inhibitörleride vardır. Seçici ve geri dönüşümlü MAO-A inhibitörlerinden pirlindol ve toloksaton örnek verilebilir.

**Üçüncü Kuşak MAO İnhibitörleri:** Farklı biyolojik aminleri (dopamin, serotonin vs.) seçici ve geri dönüşümlü olarak etki etmektedir. Moklobemit bu gruba örnek verilebilir (Palaska 2004; Chimenti *et al.* 2007; Eşkazan ve Kayaalp 2009).

### 1.1.2.Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE ) enzimi

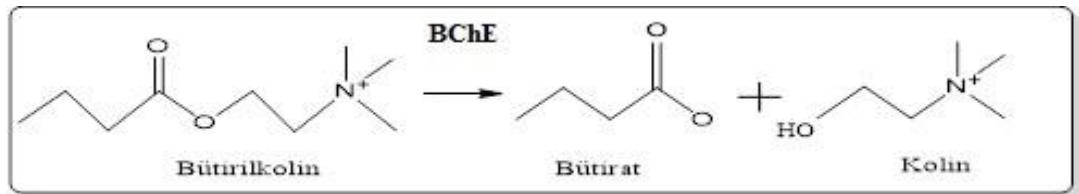
Esteraz enzimleri, esterleri su ile tepkimeye sokarak asit ve alkol üretirler. Protein yapıları ve substratları ile farklılık gösterdiklerinden farklı reaksiyonları katalizleyebilirler (Oakeshott *et al.* 1993). Esterazlar dört gruba ayrılır. Bunlar; kolin esterazlar, aromatik esterazlar, aril esterazlar, nonspesifik esterazlardır (Tuna 2007; Köse 2016).

Kolinesterazlar strese yanıt vermede, hücre farklılaşması ve yenilenmesinde görevlidirler (Wilson and Nachmansohn 1954; Carlson 1992; Temel 2008). Kolinerjik nöronun düzenlenmesi için asetilkolinin kolin ve asetik asite hidrolizini katalizlerler (Pohanka 2011). İki tip kolinesteraz vardır. Asetilkolinesteraz (E.C.3.1.1.7) ve bütirilkolinesteraz (E.C.3.1.1.8). Spesifik kolinesterazda denilen AChE kırmızı kan hücreleri, sinir hücreleri ve beyin hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Pseudokolinesteraz da denilen BChE enzimi ise karaciğer, pankreas, kan serumu ve merkezi sinir sisteminde yoğun olarak bulunmaktadır (Kaplay 1976; Rao *et al.* 2007). Kolinesteraz enzimlerinin substrat seçicilikleride oldukça farklıdır. AChE asetilkolini diğer uzun esterlere oranla daha hızlı hidrolizlemektedir. BChE enzimi ise sentetik yapılı substratları hızlıca hidrolizlemektedir (Chatonnet and Lockridge 1989).



**Şekil 1. 9.** Asetilkolinesteraz enzimi hidroliz mekanizması

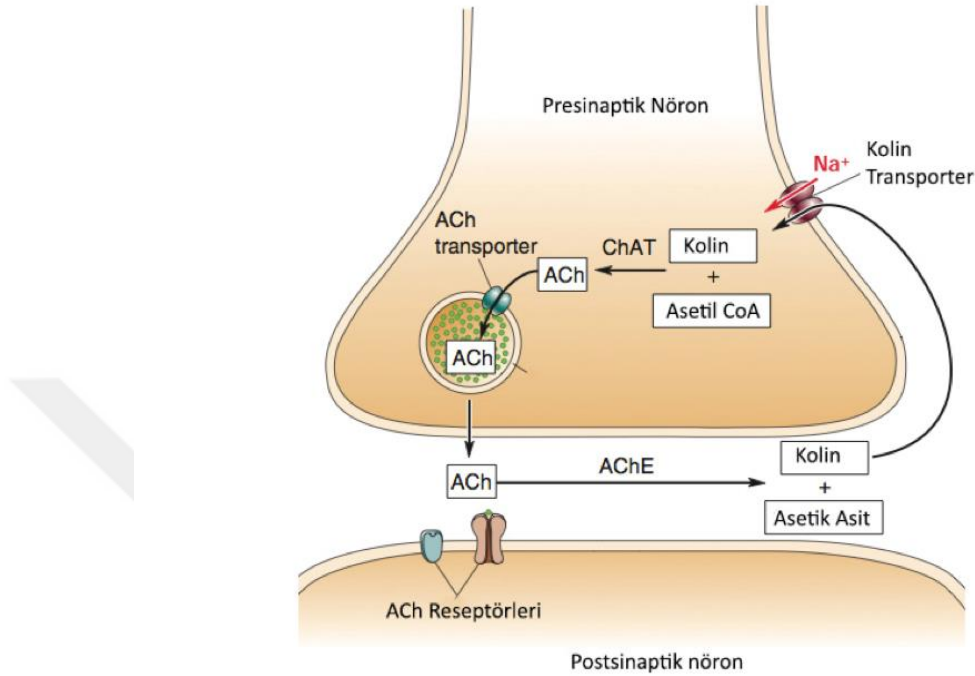
AChE metabolizmada ACh'yi (Asetilkolin) hidrolizleme işleminin katalizinde görev alan enzimdir. ACh, nörotransmitter madde olmakla beraber, biyolojik açıdan oldukça önemlidir. Onun güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur (Nacmansohn 1952). ACh'nin görevi yalnızca sinirden etki ettiği organa ya da impulsu bir sinir ucundan diğer bir sinir hücresine aktarma değildir. Yakın zamandaki çalışmalar bunun böyle olmadığını göstermiştir. Ayrıca ACh'nin sinir hücreleri ve kas liflerinde biyoelektriksel akım oluşumunda görev yaptığı bulunmuştur (Wilson and Nachmansohn 1954; Carlson 1992). AChE enziminin çalışmaması veya aksaması durumunda merkezi sinir sisteminde aksaklıklar meydana gelmektedir (Lotti 1995). 1938'de ilk kez elektrik balığının (*Torpedo marmoreta*) elektrik organından saflaştırılan AChE, asetilkolini hidrolizlemesinden dolayı diğer esterazlardan ayırt edilebilerek saflaştırılmaktadır (Phillips 1996). Düşük konsantrasyonlu substrat AChE'in aktif bölgesindeki çok az protein ile dahi reaksiyona girer. Substratın makro molekül olduğu durumlarda bile substratın küçük bir kısmının enzimle reaksiyona girdiği görülür. AChE enziminin katalizi iki aşamada meydana gelir. Birinci basamakta enzim kuvvetli bir nükleofil olarak görev yapar. İkinci basamaktaysa; enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığı ile kusursuz bir parçalayıcı işlevi görür (Demir ve Turkoglu 2005). AChE'in temel işlevi kolinerjik nörotransmisyonun sona erdirilmesidir. Diğer taraftan ACh ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir (David *et al.* 2004; Temel 2008).



**Şekil 1. 10.** Bütirilkolinesteraz enzimi hidroliz mekanizması

AChE nörotransmitter olan ACh'yi kolin ve asetik asite hidrolizler (Vale 1998; Pope *et al.* 2005). Merkezi sinir sistemi, parasempatik ve sempatik motor sinirleri AChE'in çalışmasında engelle karşılaştıklarında hata verirler (Lotti 1995). AChE'in en önemli inhibitörleri OF'lu pestisidlerdir. Bu petisitler enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsüne kovalent bağlanarak nörotransmitterin doğal katabolizmasını engellerler ve bu durum inhibisyona sebep olur (Dailianis *et al.* 2003). Enzimin inhibe

olduğu durumlarda sinaps ve nöromuskular boşluklarda ACh artışıyla aktivasyon arttığı için, kolinerjik sistem uyarısı yoğunlaşır (Soreq and Zakut 1993; Hazarika *et al.* 2003; Tuovinen 2004).



**Şekil 1. 11.** Katekolaminerjik nöronlarda Asetilkolinesteraz (Başkurt 2010)

Beyindeki nörotransmitterin azalışıyla Alzheimer hastalığı görülmektedir. Nörotransmitterlerden en fazla ACh azalır (David *et al.* 2004). ACh; ChAT (Kolin asetiltransferaz) enzimi tarafından kolinerjik nöronlarda asetilkoenzim A (CoA)'dan gelen kolin ve asetil'in birleşimiyle oluşur. Asetil CoA glikolizde meydana gelen piruvatın beş farklı metabolik akıbetlerinden birinde oluşan metabolik bir üründür. Kolin'in ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidlerden elde edilmesinin yanı sıra, AChE'nin ACh'yi hidrolizlemesi sonucu oluşan kolinden de elde edilir. Bu kolin eldesinin en önemli kaynağı hidrolizle açığa çıkan ve tekrar asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. ACh'in sinapstaki varlığı miktarı, çokluğu ya da eksikliği ChAT ve AChE enzimlerine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır. Sinir uyarısı gelen nörondan sinaptik boşluğa aktarılır. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin birçoğu postsinaptik reseptörlere bağlanırlar. Reseptörlere bağlanmayanlar ise AChE'ce yıkıma uğrar. ACh moleküllerinden postsinaptik nörona bağlananlar, sinir uyarısı diğer bir nörona iletildiğinde reseptörden uzaklaşırlar. AChE'ce yıkılır ve ortaya çıkan kolin presinaptik nöronda yeniden kullanılır.



Başka bir ifadeyle, hücreye giren  $Ca^{2+}$  sekonder haberci olarak görev yaparak veziküllerde birikmiş olan ACh presinaptik boşluğa ekzositoz yoluyla boşalmasını sağlar. Asetilkolin post sinaptik membranda bulunan reseptörüne bağlanır ve kanalın açılmasını sağlayarak uyarının post sinaptik hücre geçişini sağlar. Uyarı iletildiğinde AChE ACh'ni asetat ve koline ayırır. Kolin tekrar kullanılmak üzere presinaptik hücreye geri döner (Nelson and Cox 2005).

Alzheimer hastalığı son zamanlarda çok yaygın olarak rastlanan bir demans hastalığıdır ve nörodejenaratif bir rahatsızlıktır. Bu hastalık belleğin fonksiyon bozukluğu olarak karakterize edilmiştir. Asetilkolin düzeyinin beyindeki azalması Alzheimer hastalığının biyokimyasal anlamdaki en büyük değişikliğidir (Akincioğlu vd 2013). Demans hastalığı; sosyal ve öğrenme işlevlerinde azalma sonucu olarak bellekte, konuşma yetisinde, algılama ve yargılama kapasitesinde, soyut düşünme ve problem çözme gibi önemli işlevlerde bozukluk olmasıdır (Şahin ve Yazıcı 2007). Alzheimer hastalığının kesin tedavisi yoktur. Günümüzde kullanılan tedaviler hastalığın belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir. Ortadan kaldıran tedavi henüz bulunmamıştır. AChE inhibitörlerinden Donepezil ve Rivastigmin örnek verilebilir (Göçer vd 2013). Ancak, rapor edilmiştir ki bu ilaçlar gastrointestinal bozukluklar ve hepatotoksisiteye neden olur. Bu sebeple, etkin ve güvenli değildir (Akincioğlu vd 2013).

Sinir hücrelerinin görev yapabilmesi için AChE'nin ACh adlı nörotransmitteri kolin ve asetat olarak parçalanması gerekmektedir. Bu işleyiş nörotransmitter maddeler arasında nispeten az görülmektedir. Çünkü norepinefrin, dopamin ve serotonin gibi birçok nörotransmitter parçalanmazlar. Sinaptik boşlukça absorbe edilirler. Tarımda ve tıpta AChE inhibitörleri çokça kullanılmaktadır. Bu inhibitörler canlı metabolizmasında yan etkilere sebep olduğundan yeni doğal inhibitörlere yönelim gün geçtikçe artmaktadır (Akincioğlu vd 2013).

## **1.2. Alzheimer Hastalığı (AH)**

Alzheimer Hastalığı (AH) ne zaman başladığı tam olarak kestirilemeyen, hafıza, dil becerilerinde bozulma, karar verme güçlüğü, günlük işlerde yetersizlik gibi semptomlarla kendini gösteren geri dönüşümsüz nörodejenaratif bir hastalıktır. Demans hastalıklarının %75'ini kapsamaktadır (Houmani *et al.* 2018). AH 65 yaş üzerindeki bireylerde genç bireylere oranla daha fazla görülür (Cassani *et al.* 2018).

1907 yılında Alman nöropatolog ve psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından ilk kez davranış problemleri ve bellek bozukluğu olan hastasının ölümü sonrası klinik ve patolojik bulgularıyla tanımlanmış bir hastalıktır (Shampo *et al.* 2013). Klinik semptomlarından en belirgin olanı güncel hafıza yitimi ve görsel karışıklıklardır (Wells *et al.* 1992).

AH yakın akrabalarda olup olmamasına göre sporadik ve ailesel olarak sınıflandırılabilir. Ancak AH'larının %90'ı sporadik oluşumludur buda yaşlanmayla doğru orantılı olduğunu düşündürmektedir (Kimura 2016). Hastalığın başladığı yaş göz önüne alınarakta erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırılır (Tysoe *et al.* 1997).

1970'lerden buyana AH'lığının kolinerjik kayıp ile ilgisi olduğu bilinmektedir. Bu sebeple kolinerjik sistemin güçlendirilmesiyle hastalığın tedavi edilebileceği düşünülmüştür. AH tedavisinde ACh yıkımı azaltılarak kolinerjik etki artırılmaya çalışılmıştır. ACh beyinde dikkat ve bellek ile ilgili bölgelerde rol oynayan kimyasal haberci olması sebebiyle tercih edilmiştir. Asetilkolini artıran ilaçlar nöronal fonksiyon kaybının bir kısmını tölere etselerde bu durum geçici bir iyileşmedir. Bu ilaçlar nöronların progresif kaybını önleyememiştir (Howell 1996). Hastalığın ilk ve orta evrelerinde durdurucu ve yıkımı azaltıcı etkiside saptanmıştır. Fakat ilerleyen çalışmalar göstermiştir ki bu hastalığa sebep sadece kolinerjik kayıp değil, fazlaca hücre kaybı, beyindeki kimyasal dengesizlikleride etkilidir (Qizilbash 1998). Yapılan klinik çalışmalarda AH'nın seyrini değiştirebilecek çeşitli bileşikler bulunmuştur. Bunlar MAO-I, anti-enflamatuar ajanlar, antioksidanlar, östrojen, apolipoprotein E4 antagonistleri,  $\beta$ -amiloid üretim ve agregasyon inhibitörleridir (Marx 1996).

### 1.3. Parkinson Hastalığı (PH)

AH'lıktan sonra nörodejeneratif hastalıklar arasında ikinci en sık rastlanan hastalıktır. Daha önce yapılan dünya üzerindeki değişik ülke ve ırklardaki istatistiklere göre bu hastalığın görülme sıklığı 360/100000'dır (de Lau and Breteler 2006). Ülkemiz için ise bu durum 111/100000 olarak saptanmıştır (Torun vd. 1995).

Parkinson Hastalığı'nın (PH) başlangıç yaşı ortalama 55 yaş civarındır. Erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha fazla görülür (Jankovic and Tolosa 2006). 20 yaş altında başlayan türüne juvenil Parkinson denilmektedir (Tan and Jankovich 2006).

Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS); hastalığın klinik değerlendirmesi yapılırken kullanılan ölçektir. Bu ölçek hastalığı ayırt etmede kullanılan belirtileri kapsamaktadır (Fahn and Elton 1987). PH belirgin belirtileri bradikinezi (yavaşlayan hareketler), tremor (dinlenme halindeyken titreme), rijidite (kaslarda sertlik hali) ve refleks bozukluklarıdır. Orta beyinde bulunan substantia nigra pars kompakta ve striatum bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve nöronlarda bulunan Lewy cisimciklerinin artması patolojik bulgularıdır. Otonom bulgular ise; impuls kontrol bozuklukları, demans ve depresyondur (Akıncı 2015). Dopamin eksikliği motor semptomlara etki eder. Motor semptom dopamininin %80'i tükenip, nigral nöronlarında %50-70'sini kaybedilmesiyle ortaya çıkar (Kurman 2018). PH'lığının tedavisinde altın standart beyinde dopamine dönüşen L-dopa olarak bilinen levodopa tarafından sağlanmaktadır (Karataş 2005). Dopamin yerine prokürsörü olan levodopa kullanılır. Bunun sebebi dopaminin kan beyin bariyerini geçememesidir. Levodopa beyinde tekrar dopamine dönüşerek etkisini gösterir. Levodopa dekarboksilaz inhibitörleri (karbidopa veya benserazid) ile kullanılır. Amaç levodopanın periferde dopamine dönüşmesine engel olmaktır. Bunun yanı sıra dopamin reseptör antagonistleride dopamin metabolizmasına girmeden etki edebilen ilaçlardır. Levodopadan sonra en fazla etki eden ilaç türüdür. Yan etkileri ve daha az motor komplikasyon oluşturmaları sebebiyle tercih edilmemektedir. Bu iki ana grup dışında MAOB-I, antikolinerjik ilaçlar, COMT (katekol-O-metiltransferaz enzimi) ve amantadin kullanılır (Fahn and Jankovic 2007). PH'nda medikal tedavinin yeterli gelmediği durumlarda cerrahi tedaviden de yararlanılmaktadır (Savaş 2008).

#### **1.4. Depresyon**

Depresyon (majör depresif bozukluk) nasıl hissettiğinizi, nasıl düşündüğünüzü ve nasıl davrandığınızı olumsuz etkileyen yaygın ve ciddi ancak tedavi edilebilen tıbbi bir hastalıktır.

Depresyon hastalığı çok sayıda etmenin birleşimiyle oluştuğu düşünülen patofizyolojisi tam olarak bilinmeyen nörodejeneratif hastalıklardandır. Kullanılan tedaviler sınırsız kaldığından güncel çalışmalara sıkça konu olmaktadır (Gaynes 2009). Çevresel faktörler, genetik yatkınlık, psikolojik ve biyolojik sebepler tek tek veya birlikte hastalığa sebep olurlar (Lieb *et al.* 2002).

Depresyon tedavisinde ilk sırada kullanılacak ilaçlar, daha gelişmiş güvenlik ve tolerabilite özellikleri sebebiyle, seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI), serotonin noradrenalin geri alım inhibitörleri (SNRI) ve dopamin ve diğer serotonin reseptörleri üzerinden etki eden ilaçlardır. Monoamin oksidaz inhibitörleride ikinci sırada tercih gören ilaçlardandır (Stahl 2008).

### 1.5. Serbest Radikaller

Orbital moleküllerdeki atomların uzayda kapladığı yerdir. Bir orbitalde iki elektron zıt yönde hareket etmektedir. Eğer orbitalde tek elektron varsa buna eşleşmemiş elektron denir (Halliwell 1996, Gülçin 2010, Gülçin 2012). Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron ihtiva eden kararsız ve reaktif yapılardır (Marzatico and Cafe 1993). Elektron alışverişini kolayca yapabilen bu moleküllere oksidan moleküller ya da reaktif oksijen türleri (ROS) denilmektedir (Halliwell 1991). Reaktif ve kısa ömürlü serbest radikaller negatif, pozitif ve nötral yüklere sahip olabilirler (Castaner *et al.* 1990). Stres, radyasyon, UV ışınları, kimyasal maddeler, olumsuz çevre şartları, genetiği bozuk gıdalar serbest radikal oluşumunu artırır. Ayrıca vücutta doğal metabolik işleyiş sırasında da serbest radikaller oluşabilirler. Radikaller metabolizmadaki biyomoleküllere karşı reaktif olma eğilimlerinden dolayı hücre, doku ve organlarda hasara neden olabilirler. Bunların zararlı etkilerini antioksidanlar nötralize ederler (Gülçin 2012). Metabolizmada enerji üretimi, elektron transferi (ETS) ve diğer metabolik işler esnasında serbest radikaller üretilebilir (Halliwell and Gutteridge 1999).

Oksijen tüm hücre tiplerine kolayca girebilen ve metabolik olaylarda en çok kullanılan moleküldür. Aerobik canlılarda serbest radikalın en önemli kaynağıdır. Oksijen molekülünün yanı sıra kükürt ve karbon orjinli radikallerde oluşur (Harman 1956).

Kanser, kardiovasküler hastalıklar, astım, hipertansiyon, romatoid artrit, diyabet, Parkinson, demans, Alzheimer gibi birçok hastalıkta ve yaşlanmada da serbest radikallerin payı olduğu düşünülmektedir (Aruoma 1994).

**Çizelge 1.2. Serbest Radikal Kaynakları**

| <b>EKSOJEN KAYNAKLAR</b> | <b>ENDOJEN KAYNAKLAR</b>      |
|--------------------------|-------------------------------|
| İlaçlar                  | Enzimler                      |
| Diyet faktörleri         | Oksidasyon tepkimeleri        |
| Pestisitler              | Redoks tepkimeleri            |
| Organik çözücüler        | Mitokondriyal ETS             |
| Uyuşturucu, alkol vb.    | Araşidonik asit metabolizması |

### **1.6. Oksidatif Stres**

Serbest radikallerin organizmada artış göstermesi sonucu antioksidan savunma sistemi olarak devreye girer ve bir denge kurar. Bu olaya oksidatif denge denilmektedir. Oksidatif denge sabit kaldığı müddetçe metabolizma zarar görmez. Ancak bu denge serbest radikaller lehine eksojen ve endojen kaynakların etkisiyle artış gösterdiğinde bozulmaktadır. Serbest radikallerin mevcut antioksidanlardan fazla gelmesi savunma sisteminin yetersiz kalması olayı oksidatif stres olarak adlandırılır (Halliwell and Gutteridge 1986; Keha ve Küfrelioğlu 2004). Oksijenden meydana gelen oksitleyici yapıdaki serbest radikalar metabolizmadaki nükleik asit, protein ve özellikle lipit gibi makro moleküllere zarar verirler (Mercan 2004; Darley-Usmar and Halliwell 1995).

### **1.7. Antioksidanlar**

Antioksidanlar serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyonu engelleyip, serbest radikalleri stabilize ederek yakalama görevi yapan maddelerdir (Elliot 1999). Protein, lipit, nükleik asit gibi organizmadaki makro molekülleri korurlar (Yalçın 1992; Halliwell and Gutteridge 1999).

İlk olarak 19.yy da metalin oksitlenmesini yani kimyasal aşınmayı önlemek amacıyla bulunmuş, 20. yy ortalarında ise besinlere eklendiğinde raf ömrünün uzayıp kötü tat ve koku oluşumunu engellendiği görülüp gıda maddelerine eklenmeye başlamıştır (Gülçin vd. 2003).

Antioksidan maddeler vücutta üretilebildiği gibi dışarıdan yiyecekler vasıtasıyla da alınabilirler. Dışarıdan beslenme yoluyla doğal olarak aldığımız antioksidanlara vitaminler, karotenoidler, flavonoidler ve polifenoller örnek

verebiliriz. Bu doğal antioksidanlardan en önemlisi polifenol ve türevleridir (Shadidi 1996, Güçlü vd. 2009). Beslenme yoluyla doğal antioksidanların metabolizmaya katılabilmesi bu konudaki araştırmaları artırmıştır. Besinlerin bozulmadan uzun süreli kalabilmesi için doğal ve sentetik antioksidanlar belirli oranlarda kullanılmaktadır. Bu oranlar ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ile yasal olarak belirlenmektedir (Türk Gıda Kodeksi 2011). Besinleri uzun süreli saklamaya yönelik sentetik (bütil hidroksitoluen vb) ve doğal (katekol vb) bu maddeler metabolizmaya girdikten sonra antioksidan olarak görev yapmaktadırlar (Yavaşer 2011). Gıdalarda yaygın olarak kullanılan antioksidanlar sentetik olarak üretilmektedir. Bunlara örnek olarak bütil hidroksitoluen (BHT), bütil hidroksianisol (BHA), tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ) ve etoksiguin verilebilir. Ucuz ve yüksek kararlılık olmalarıyla tercih edilirken zehirli yan etki oluşturmalarıyla ilgili şüpheler hala mevcuttur (Chen *et al.* 1992, Wanasundara and Shadidi 2005).

**Çizelge 1.3.** Doğal ve sentetik antioksidanların karşılaştırılması (Gülçin 2012)

| SENTETİK ANTİOKSİDANLAR                | DOĞAL ANTİOKSİDANLAR                 |
|----------------------------------------|--------------------------------------|
| Ucuzdur.                               | Pahalıdır.                           |
| Geniş uygulama alanına sahiptir.       | Bazı ürünlerin kullanımı sınırlıdır. |
| Güvenirliliği giderek azalmaktadır.    | Zararsız ve güvenilirdir.            |
| Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır.  | Kullanım, uygulama alanı artmıştır.  |
| Çözünürlükleri düşüktür.               | Çözünürlükleri yüksektir.            |
| Bu antioksidanlara ilgi azalmaktadır.  | Bu antioksidanlara ilgi artmaktadır. |
| Bazıları adipoz dokuda depolanmaktadır | Tamamı metabolize olmaktadır.        |

Günümüzün popüler konularından olan antioksidanlar sağlığa olumlu etkileri, hastalıklara olan koruyucu yönüyle daha çok araştırılmaya başlanmıştır. Kanser, kardiovasküler hastalıklar gibi ciddi hastalıklara karşı koruma, yaşlanmayı geciktirme etkisi vardır. Özellikle ilerleyen yaşlarda savunma sistemini güçlendirip, yaşlanma etkilerini azaltıp, cilt ve saçları beslediği bilinmektedir (Eröztürk 2000, Eken 2007).

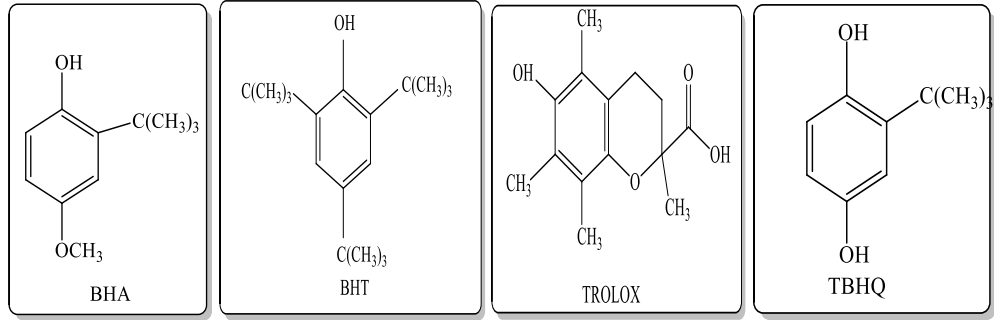
Mekanizmalarına göre birincil ve ikincil olarak iki gruba ayrılırlar. Birincil antioksidanlar; bulunan radikallerle reaksiyona girerler ve bunların daha zararlı hale dönüşmelerini önlerler. Ayrıca yeniden serbest radikal oluşumunda izin vermezler

(Diplock 1998). İkincil antioksidanlarsa; E vitamini, C vitamini, bilirubin, ürik asit, ve polifenoller gibi oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran bileşiklerdir (Ou *et al.* 2002). Ayrıca antioksidanları genel olarak vücut içi ve besin kaynaklı antioksidanlar olmak üzere ikiye ayırmak da mümkündür (Ak ve Gülçin 2008). Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri ve katalaz (CAT) insandaki hücre içi antioksidanlardandır. SOD yapısında çinko, bakır ve manganez; GPx selenyum iyonu bulundurur. Bu sebeple enzimler metaloenzim olarak da isimlendirilir (Halliwell 1991). Vücuttaki reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşı farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı farklı yerlerde rol aldıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedirler (Diplock 1998).

Antioksidanların birçok etki şekilleri mevcuttur. Bunlardan bir veya birkaçını gösterebilirler. Metabolizmada serbest radikal ve antioksidanlar arasındaki dengeyi korumak için dört yöntem mevcuttur. Bunlardan birincisi süpürücü etkidir. Antioksidanların oluşmuş radikallerin etkisini azaltması veya oluşmasını önlemesi durumudur. İkincisi baskılayıcı etki olarak adlandırılır. Antioksidanların oksidanlara hidrojen vererek onları inaktive etmesi veya etkilerini azaltması durumudur. Üçüncüsü zincir kırıcı etki olup antioksidanların serbest radikalleri kendine bağlayıp zincirlerini kırma esasına dayanır. Dördüncüsü onarıcı etkidir. Metiyonin sülfoksit redüktaz ve DNA tamir enzimleri kullanılır (Krinsky 1992, Pinchuk and Lichtenberg 2002, Klouche *et al.* 2004).

BHA, BHT, Trolox ve TBHQ fenolik bileşik yapıları en sık kullanılan sentetik antioksidanlardır (Gülçin 2012). BHA mumsu, beyaz, katı yapıları yağda çözünüp suda çözünmeyen sentetik bir antioksidandır (Venkatesh and Sood 2011). İlk kez 1948'de ABD'de kullanımı onaylanmıştır. Bunun üzerinede başka ülkelerde de katı ve sıvı yağlara eklenmiştir (Efsa 2011). BHT ise 1954 yılında gliseridler üzerinden bulunmuştur. Tüketilen gıda ve yağlara eklenmeye başlanmıştır (Çöllü 2007). Beyaz renkli ve kristal yapılarıdır. Yağda çözünür olmalarına karşın suda çözünmezler (Edin *et al.* 2010, Efsa 2012). BHA ve BHT kanserojen ve toksik olma şüphesiyle yasal olarak yasaklanma yoluna gidilmiştir (Wichi 1988; Sherwin 1990). Bu sebeplerden dolayı doğal antioksidanlar sentetiklere oranla daha fazla talep görmekte ve araştırılmaktadır. Sentetik antioksidanlara kıyasla daha güvenli ve sağlıklı bulunmaktadır (Valenzuela and Nieto 1996). Tokoferoller, karatenoidler, flavonoidler

ve c vitaminleri doğal yollarla alınan antioksidanlardan en önemlileridir (Sies and Stahl 1995; Rice-Evans and Miller 1996; Gülçin 2012).



**Şekil 1.12.** Bazı sentetik antioksidanlar

### 1.8. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerde çok az miktarda bulunmalarına rağmen ancak tat ve renk oluşumunda etkilidirler (Shahidi and Naczk 1995). Lezzetinin oluşmasında etkili yendiğinde ağızda buruk tat bırakan doğal bileşenlerdir. Sağlığa yararlı güçlü antioksidan etkileri vardır (Sousa *et al.* 2015). Hava ile temas etmedikçe renksizdirler, temas ettiklerinde ise kırmızı renk alırlar. Su, alkol, eter gibi organik çözücülerde iyi çözünürler. Oldukça zehirli yapıları vardır bu sebeple seyreltilerek kullanılmalıdır. Aksi takdirde yanıklara sebep olabilirler (Anonmyous 1984).

Kimyasal yapıları bir aromatik benzen halkasına bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşik şeklindedir (Shahidi and Naczk 1995). En basit yapılı fenolik madde bir hidroksil grubu ve benzen halkasından oluşan fenoldür (Cemeroğlu ve Acar 1986). Fenoller bünyelerinde bulunan H atomunu serbest radikallere verme eğilimi gösterirler (Ranalli *et al.* 2003). Metabolizmamızda bulunan serbest radikaller oksidatif strese sebep olurlar. Dolayısıyla DNA, protein gibi önemli yapılara zarar verirler. Antioksidanlar bu olumsuz etkileri durdurur ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırır (Kampa *et al.* 2000). Bu sebeptendir ki insan diyetinde yer alan fenolik yapılı bitkisel gıdalar antioksidan etki göstermeleri sebebiyle araştırmalarda daha çok yer almaktadır (Balasundram *et al.* 2006). Bu bileşiklerin gösterdikleri antioksidan aktiviteler; aromatik halka üzerinde bulunan gruplara, hidroksil grupların kaç tane ve nerede olduklarına bağlıdır (Balasundram *et al.* 2006).

Fenolik bileşikler bitkilerde sekonder metabolit olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok örneği yapısal olarak aydınlatılmış ve sıkça kullanılmaktadır (Kafkas vd.

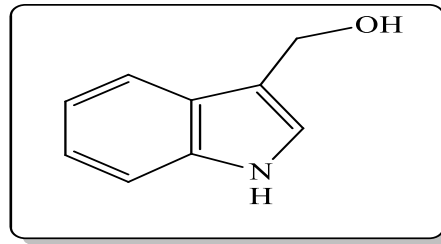


2006). Yapılan çalışmalara bakıldığında ortalama 5000 tane fenolik bileşik tanımlanmış olup bunların yaklaşık 2000 tanesi dağol orjinlidir. Doğal orjinli olanlar genellikle bitkilerin canlı dokularında meyve, yaprak ve çiçek'te glikozit şeklinde; odunsu dokularda aglikonlar formunda bulunurlar. Çekirdek kısımlarında ise hem glikozit hemde aglikonlar şeklinde bulunabilirler (Shahidi and Nacz 1995).

Meyve ve sebzelerin bünyelerinde barındırdıkları C vitamini, E vitamini, karetonoidler ve en çokta flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Gıdalarda en zengin bulunanı flavonoidlerdir ve 6500 türü bilinmektedir (Saldamlı 2007). Meyve ve sebzeyi bolca tüketen toplumlarla dejeneratif hastalıkların az görülmesiyle ilişkilendirilmiştir (Caldwell 2003). Fenolik bileşiklerin fazlaca tüketilmesi toksik etki göstermesi sebebiyle zararlı olabilmektedir. Gırtlak kanserine sebep olabileceği düşünülmektedir. Ancak alınması gereken miktarda tüketildiğinde de kanser, kronik kalp yetmezliği gibi hastalıklarda olumlu etki gösterdiği bilinmektedir (Shahidi and Nacz 1995).

### 1.9.İndol-3-Karbinol (I3C)

Kakule bitkisi zencefilgiller ailesine ait bir bitki olup latince ismi *Elettaria cardamomum* ingilizce'de cardomum olarak adlandırılır. Ülkemizde yetişmemekte ancak yeşil kabuklu türü düzenli olarak ithal edilmektedir. Sağlığa birçok faydası olduğu bilinmektedir (Lawrence 1979). Kakule bitkisi içeriğinde yer alan I3C ve DİM maddeleri çalışmalarımızda etken madde olarak kullanılacaktır.



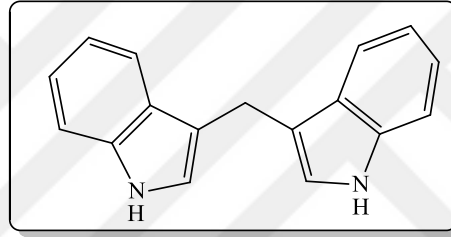
**Şekil 1.13.** İndol-3-karbinol (I3C) yapısı

Bir benzen ve pirol halkasının birleşiminden oluşmuş benzopirol halkasına indol denir. Doğal ve sentetik birçok aktif bileşiğin yapısını oluştururlar (Broadbent ve Broadbent 1998). I3C lahanası, brokoli ve brüksel lahanası gibi brassica sebzelerinde ve kakulede doğal olarak bulunan bir bileşendir (Cover *et al.* 1998).

Vücuttaki doğal detoksifikasyon enzimlerinin antioksidanı ve uyarıcısıdır. Ayrıca prostat ve akciğer kanseri tümör hücreleri üzerinde serbest antioksidan etkisi olduğu saptanmıştır (Kaymaz 2006). İndol, ilaç keşfinde en önemli motiflerden birini temsil etmektedir. İndol türevleri peptidlerin yapısını taklit eden ve enzimlere geri dönüşümlü olarak bağlanabilen eşsiz bir özelliğe sahiptir. İndol biyolojik açıdan aktif doğal ürünlerin her yerinde bulunan bir bileşendir (Yıldız 2015).

#### 1.10. 3,3'-Diindolilmetan (DİM)

DİM güçlü anti-kanser, anti-inflamatuvar önleyici özelliklere sahip bir madde olan I3C'un ana metabolitidir. DİM, turunçgil sebzelerin potansiyel bir antikanser bileşeni olan I3C'ün önemli bir sindirim ürünüdür (Le *et al.* 2003). DİM *in vivo* ve *in vitro* olarak oluşturulan I3C'ün bir dimeridir (Ge 1996).



Şekil 1. 14. 3,3'-diindolilmetan (DİM) yapısı

Östrojen reseptörlerine seçici olarak bağlanabilen DİM östrojen antagonisti olarak davranır ve DİM oranı yüksek olduğunda östrojen testosteron oranını normal seviyeye taşımada etkilidir. DİM için östrojenin metabolize olmasında yardımcıdır diyebiliriz (Riby *et al.* 2000).

I3C ve DİM biyolojik çalışmalarda antikanserojen ve antioksidan etkileri nedeniyle araştırmalara konu olmuştur. Çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan bir indol alkaloidi olan Ajmalisin yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan bir anti hipertansiyon ilacıdır. Bir indol alkaloidi olan Rezerpin ruhsal bozukluğu olan hastalarda yüksek kan basıncı ve şiddetli ajitasyon tedavisinde kullanılır. Meme veya testis kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için de kullanılır (Zhang *et al.* 2014).

#### 1.11. Çalışmanın Amacı

Parkinson, şizofreni ve Alzheimer hastalıklarının artışı, dünyada yaşlı nüfusun artışıyla paralel olarak ilerlemektedir. 2018 verilerine göre dünya üzerinde 50 milyon

demans vakası bulunmaktadır. 2050 yılında bu sayının 115,4 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Bu durumda her sekiz kişiden birinin Alzheimer hastası olacağı anlamına gelmektedir (Alzheimer's Association 2015).

Kesin sebebi bilinmeyen bu hastalıkların mutlak tedavisinde bulunamamıştır. Ancak kullanılan bazı ilaçlarla insan yaşamını olumsuz etkileyen semptomlar baskılanarak yaşam kalitesi artırılmaya çalışılmıştır. Bu hastalıkların tedavisinde farklı yaklaşımlar olsada, Parkinson hastalığının tedavisi için MAO-B enziminin seçici inhibitörleri ya da antikolinerjik ilaçlar kullanılırken (Fahn ve Jankovic 2007), AH'nın tedavisi için AChE, BChE (Howell 1996) ve MAO-B enzimlerinin inhibitörleri kullanılmaktadır (Marx 1996). Yine şizofreni hastalarında periferik dokudan alınacak bir belirtecin etkili olacağı düşünüldüğünden mitokondrial elektron zinciri araştırma konusu olmuş dolayısıyla da mitokondri dış zarında lokalize olan MAO-A'nın da tedavide kullanılması düşünülmüştür (Shachar 2002; Praabakaran 2004). Kullanılan bazı ilaçların hasta metabolizmasında ciddi hasarlara sebep olduğu saptanmıştır. Bu sebeple yan etkisi daha az olan ya da olmayan doğal hammadde arayışında olmak gerekmektedir.

Yapılan çalışmanın amacı tam olarak tedavi yolu bulunamayan nörodejeneratif hastalıkları iyileştirme sürecinde kullanılabilecek doğal etken maddeye ulaşabilmektir. Geçmişte yapılan çalışmalar göz önüne alındığında kullandığımız maddelerin kimyevi yapısı ve tercih edilen enzimler bu konuda oldukça ümit vermektedir. Tercih ettiğimiz maddelerin daha önce bu konuda yapılan çalışmalarda kullanılmamış olması çalışmanın özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Hedefimiz dünya üzerinde bu hastalıklardan müzdarip insanlara daha kaliteli yaşam sürebilmeleri için hastalığı geciktirecek, bıraktığı hasarları ortadan kaldıracak veya hafifletebilecek çözüm yolunda bir basamak olabilmektir.

## 2. KAYNAK ÖZETİ

Dale tarafından 1914 yılında öne sürülen kolinesterazların varlığı Loewi ve Navratil tarafından 1926 yılında göz önüne serilmiştir. İlk defa 1938 yılında *Torpedo marmoreta* 'dan saflaştırılan AChE diğer esterlerden ayrılmıştır (Phillips 1996). Akıncıoğlu ve ekibinin (2013) yaptığı çalışmalara göre asetilkolinin beyindeki miktar farklılıklarının bazı hastalılara sebep olduğu vurgulanmıştır. AH'da bu hastalıklardan biridir ve asetilkolin miktarındaki azalma hastalığın biyokimyasal anlamdaki en büyük değişikliğidir. Metabolizmada AChE enziminin asetilkolini asetat ve koline hidrolizini katalizlediği bilinmektedir. Alzheimer hastalığının tedavisi için AChE enzimi inhibe edilerek, metabolizmadaki asetilkolin miktarı artırılması yönünde çalışmalar yapılmıştır.

BChE enzimi metabolizmada bütirilkolinin bütirat ve koline hidroliz olayını katalizleyen enzimdir. Bu enzimin memelilerde bilinen bir substratı yoktur (Kutty *et al.* 1989). Mossoulie ve diğerlerinin yaptığı çalışmalar Alzheimer hastalığında AChE gibi BChE enziminin beyindeki miktarının fazla olduğunu bulmuştur. Bu sebepledirki AChE enzimi inhibitörlerinin BChE enzim inhibisyonu da ilgili olabileceği düşünülmüştür (Gülçin vd. 2016).

Binda ve diğerlerinin (2002) yaptıkları çalışmalara göre 1968 yılında MAO'nun iki farklı formu olduğu bulunmuştur. İnsan beyindeki MAO'nun %80'i MAO-B'dir. Bu iki form %70 oranında benzer yapılar ihtiva etmektedirler. MAO-A'nın 527 MAO-B'nin 520 aminoasit kalıntısı vardır (Lee *et al.* 2006). Sahoo ve arkadaşarının (2010) bu konuda yaptıkları araştırmalara göre MAO-A inhibitörleri depresyon gibi ruhsal bozukluklarda kullanılırken, MAO-B inhibitörleri ise Alzheimer, Parkinson gibi demans hastalıklarında tedavi amaçlı kullanılır. Şizofreni hastalığı tedavi sürecinde periferik dokudan alınacak bir belirtecin hastalığın tanısında etkili olacağı düşünülmüş ve bu sebeple de mitokondrial elektron transport sisteminde araştırmalar artırılmıştır (Shachar 2002; Praabakaran 2004).

PH'lığında Karataş (2005) bazı tipik ilaç tedavileri yapıldığını söylemiştir. İlaç tedavilerindeki amaç altın standart olarak bilinen L-Dopanın beyinde dopamine dönüşmesidir. Hastaya verilen levodopanın beyine kolayca geçip dopamine dönüşmesi esasına dayanır. MAO-B inhibitörleri, antikolinerjikler, dopamin antagonistleri gibi başka tedavi yolları olduğunda söylemiştir.

Gülçin (2006) fenolik bileşiklerin hemen hemen bütün bitkisel kökenli materyallerde bulunan ikincil bitki metaboliti olduğunu söylemiştir. İnsan ve hayvan diyetlerinin bu metabolitleri içerdiği düşünülmektedir. Günümüze kadar bu konuda pek çok çalışma yapılmış ve fenolik yapıları bileşiklerin çoğunluğunun doğal antioksidan olduğu bulunmuştur. Bunlardan en önemlileri flavonoidler, tokoferoller, fenolik asitlerdir (Shahidi and Nacz 1995; Gülçin 2012).

Çilek (Abuja *et al.* 1998), brokoli (Gülçin *et al.* 2004e), nane (Elmastas *et al.* 2005), kızılçık (Gülçin *et al.* 2005c), semizotu (Oliveira *et al.* 2009), karanfil (Gülçin *et al.* 2004d), kivi (Dawes and Keene 1999), defne (Elmastas *et al.* 2006a), karabiber (Gülçin 2005), tarçın (Chua *et al.* 2007), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*.) (Şerbetçi and Gülçin 2009), patates (Friedman 1997), lavanta (Gülçin *et al.* 2004d), karnabahar (Köksal and Gülçin 2008), ılgın (Oktay *et al.* 2007), mantar (Elmastas *et al.* 2006b), reyhan (Gülçin *et al.* 2007a), zencefil (Stoilova *et al.* 2006), zeytinyağı (Blekas *et al.* 1998), soğan (Ewald *et al.* 1999), propolis (Gülçin *et al.* 2010b), ıspanak (Gil *et al.* 1999), madımak (*Polygonum cognatum*) (Yıldırım *et al.* 2001), kuru erik (Donavan 1998) gibi birçok sebze ve meyve antioksidan yöntemlerle çalışılmıştır.

Zhang ve arkadaşları (2014) I3C ve DİM ile yaptıkları çalışmalarda antikanserojen ve antioksidan etkilerinden bahsetmişlerdir. Meme ve testis kanseri başta olmak üzere birçok kanser türünün tedavisinde kullanılabileceğini aktarmışlardır.

### 3. MATERYAL YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışması esnasında kullanılan kimyasallar; Tris (Trihidroksi metilamino metan), EDTA, HCl (Hidroklorik asit), NaOH (Sodyum hidroksit), asetilkolinyodat, DTNB (5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit), sodyum sitrat, sodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), bütirilkolinyodat,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , TCA (trikloroasetik asit),  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$ , neokuprin, etanol,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyoazolin-6-sülfonik asit)),  $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ,  $\text{NaCH}_3\text{COO}$ , TPTZ (Tripiridil triazin), 4-aminoantiripin, vanilik asit, p-tiramin,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , selegilin, klogilin I3C (İndol-3-karbinol), DİM (3,3'-diindolilmetan), Monoamin oksidaz A (MAO-A) ve B (MAO-B), Asetilkolinesteraz (AChE), Bütirilkolinesteraz (BChE), Horseradis hperoksidaz (HRP), enzimleri sigma aldrich'den satın alındı.

##### 3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

|                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| UV-VIS Spektrofotometre           | : Evolution 201                       |
| Derin dondurucular (-30 ve -86°C) | : Sanyo, Japan                        |
| pH metre                          | : Thermo                              |
| Hassas terazi                     | : Shimadzu AUX220                     |
| İnkübatör                         | : Wiseven                             |
| Otomatik pipetler                 | : Eppendorf ve Socorex                |
| Çalkalayıcı                       | : Nüve SL 350                         |
| Vorteks                           | : WiseMix                             |
| Saf su cihazı                     | : Firstreem Calypso MK 1 Glass        |
| Magnetik karıştırıcı              | : Jeio Tech                           |
| UV-Spektrofotometre küveti        | : 1 cm <sup>3</sup> 'lük Kuartz Küvet |
| Mikroplaka Okuyucu                | : ThermoFisher Scientific, Multiskan  |

##### 3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çalışmaların tamamında 1mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlanıp kullanıldı.

**a) Asetilkolinesteraz Enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponunun (pH:8) Hazırlanışı: 30,27 g Tris hassas terazide tartılıp 5 mM'lık 0,370 g EDTA ile 200 mL destile suda çözülüp pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı. Son hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 10 mM'lık Asetilkolinyodat Çözeltisinin Hazırlanışı: 0.145 g Asetilkolinyodat hassas terazide tartılıp 50 mL destile suda çözüldü.
3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanışı: 0.01 g DTNB ve 0,5 g sodyum sitrat hassas terazide tartılıp 50 mL destile suda çözüldü.

**b) Bütirilkolinesteraz enziminin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. 50 mM'lık Fosfat Tamponunun (pH: 8) Hazırlanışı: 1,7745 g sodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) hassas terazide tartılıp 200 mL destile suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 8'e ayarlandı. Son hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 0,5 mM'lık Bütirilkolin iyodat Çözeltisinin Hazırlanışı: 0.008 g Bütirilkolin iyodat hassas terazide tartılıp 50 mL destile suda çözüldü.
3. 0,35 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisinin Hazırlanışı: 7 mg DTNB hassas terazide tartılıp 50 mL destile suda çözüldü.

**c) MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler**

1. Kromojenik Çözeltinin Hazırlanışı: Bu çözelti hazırlanırken kullanılan 500  $\mu\text{M}$  4-Aminoantiripin çözeltisi, 1 mM vanilik asit çözeltisi ve 4 U/mL Horseradish peroksidaz enzimi 2:1:1 oranında karıştırılarak günlük olarak hazırlandı. Bu çözelti gün içinde +4 °C de saklandı (Evranoş B. 2011).
2. 1mM Vanilik Asit Çözeltisi Hazırlanışı: 0.0168 g Vanilik asit hassas terazide tartılıp 75 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı (Evranoş 2011).
3. 500  $\mu\text{M}$  4- Aminoantiripin Çözeltisi Hazırlanışı: 0.0101 g 4- Aminoantiripin hassas terazide tartılıp 75 mL destile suda çözüldü. Çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlandı (Evranoş 2011).
4. Substrat çözeltisi Hazırlanışı: Substrat olarak çalışmalarımızda molekül ağırlığı 137.18 g/mol olan p-tiramin kullanıldı. Kullanılan p-tiramin'in

konsantrasyonu MAO-A enzimi için 500  $\mu$ M olacak şekilde hazırlanırken, MAO-B için 2,5 mM olacak şekilde hazırlandı (Evrano 2011).

5. 0,2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Tampon Çözeltisi (pH:7.6) Hazırlanışı: 7,6 pH'sı olan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu hazırlamak için 6,8  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartılıp 150 mL saf suda çözüldü. Ardından pH metrede NaOH çözeltisi eklenerek pH'sı 7,6 olarak ayarlandı. Çözeltinin son hacmi 250 mL tamamlandı (Evrano 2011).
6. Standart Olarak Kullanılan MAO-A ve MAO-B İzoenzimlerinin Seçici İnhibitör Çözeltileri: MAO-A için klorgilin standart inhibitör olarak kullanıldı. Klorgilinden 10 mg alınıp 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı. MAO-B için ise selegilin standart inhibitör olarak kullanıldı. Selegilinden 10 mg hassas terazide tartılıp 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı. Stok çözeltiler üzerinden gerekli seyreltmeler yapıldı (Evrano 2011).

**d)  $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$  indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,2 M fosfat tamponunun (pH: 6,6 ) hazırlanışı: 6,24g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  yaklaşık 180 mL destile suda çözülüp pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim 200 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
2. %1'lik  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  çözeltisinin hazırlanışı: 1,5 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  destile suda çözülüp ve son hacim 150 mL'ye destile su ile tamamlandı.
3. %10'luk TCA çözeltisinin hazırlanışı: 10 g TCA destile suda çözülüp ve son hacmi 100 mL'ye destile suyla tamamlandı.
4. %0,1'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltisinin hazırlanışı: 85 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  destile suda çözülüp son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

**e) Kuprak metoduna göre indirgeme kapasitesi tayini ile ilgili çözeltiler**

1. 0,01 M'lik  $\text{CuCl}_2$  çözeltisinin hazırlanması: 47 mg  $\text{CuCl}_2$  hassas terazide tartılıp 50 mL destile suda çözüldü.
2.  $7,5 \times 10^{-3}$  M'lik etanolik neokuprin çözeltisinin hazırlanışı: 78 mg Neokuprin hassas terazide tartılıp 50 mL etanolda çözüldü.
3. 1 M'lik  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  tamponunun (pH: 6,5) hazırlanışı: 7,7 g  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  hassas terazide tartılıp 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.



**f) DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler**

1. 3 M'lık DPPH çözeltilisinin hazırlanışı: 40 mg DPPH 100 mL etanolda manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar bir gece etanolda karıştırıldı.

**g) ABTS<sup>+</sup> giderme aktivitesi ile ilgili çözeltiler**

1. 0,1 M'lık fosfat tamponunun hazırlanışı (pH: 7,4): 2,84 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 180 mL destile suda çözülüp pH metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son hacim destile su ile 200 mL'ye tamamlandı.
2. 2 mM'lık ABTS çözeltilisinin hazırlanışı: 0,1 M'lık 1mg ABTS ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
3. 2,5 mM'lık potasyum persülfat çözeltilisinin hazırlanışı: 0,1 M'lık 66,25 mg K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**h) FRAP indirgeme metodu ile ilgili çözeltiler**

1. 0,3 M'lık Asetat Tamponunun (pH:3.6) Hazırlanışı: 2,46 g NaCH<sub>3</sub>COO hassas terazide tartılıp 80 mL destile suda çözülüp ve pH metre kullanılarak pH'sı 3,6'ya ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye destile su ile tamamlandı.
2. 40 mM'lık HCl Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,334 mL %37 lik HCl çözeltilisinden hassas terazide tartılıp son hacim 100 mL olacak şekilde destile su ile tamamlandı.
3. 10 mM'lık TPTZ Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,312 g TPTZ hassas terazide tartılıp 100 mL 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.
4. 20 mM'lık FeCl<sub>3</sub> Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,54 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O hassas terazide tartılıp 100 mL destile suda çözüldü.
5. FRAP Reaktifinin Hazırlanması: 0,3 M'lık asetat tamponu, 10 mM'lık 1 hacim TPTZ ve 20 mM'lık 1 hacim FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O çözelti karışımlarıyla hazırlandı.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Enzim inhibisyon çalışmaları

##### a) AChE ve BChE Enzimlerinin Aktivitelerinin Tayini

Elman metodunun modifikasyonu ile AChE ve BChE enzimleri üzerinde çalışıldı. Çalışmanın esası asetilkolinesterazın asetilkolini asetat ve koline parçalama esasına dayanmaktadır. Bu katalizleme reaksiyonunun ardından tiyokolin ile DTNB ürün olarak açığa çıkar ve reaksiyona girerek sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Elde edilen çözelti 412 nm’de ölçüldü (Ellman *et al.* 1961).

İlk olarak stok enzimler seyreltilerek aktivite ölçümleri yani kontrol ölçümleri her iki enzim için de yapıldı. Aktivite ölçümü yaparken kuvvet içeriği Çizelge 3.1.’de verildiği gibi kullanıldı. Aktivite ölçümü için pipetleme miktarları tabloda verilen kontrol tüpü içeriği şeklinde yapıldı. 5. dakikanın sonunda meydana gelen absorbans farkı bulunarak EU/mL hesabı yapıldı ve enzimlerin aktiviteleri belirlendi. Asetilkolintiyoiyodat AChE enzimi için substrat olarak kullanılırken, bütiriltiyokolinyodat BChE enzimi için substrat olarak kullanıldı.

**Çizelge 3.1.** AChE ve BChE enzimlerinin aktivite tayininde kullanılan kuvvet içerikleri

| Kullanılan Maddeler   | Kontrol Tüpü (µL) | Numune Tüpü (µL) |
|-----------------------|-------------------|------------------|
| Tris-HCl              | 100               | 100              |
| Saf Su                | 790               | 780              |
| Örnek                 | -                 | 10               |
| Enzim çözeltisi       | 10                | 10               |
| Asetilkolintiyoiyodat | 50                | 50               |
| DTNB                  | 50                | 50               |

Çalkalanır ve 30 °C’de 5 dakika inkübe edildi. 412 nm dalga boyunda kör ve örnek kuvvetlerin başlangıç ve 5. dakikaları ölçülüp aradaki farkı alındı. Bütiriltiyokolintiyokoline hidrolizini bütirilkolinesteraz katalizler. BChE için aktivite ölçümü prensip olarak bütiriltiyokolinyodat’ın kataliz sonrası tiyokolin oluşturması esasına dayanır. Sonrasında DTNB ile oluşan tiyokolinin reaksiyonu sonucu sarı renkli bir bileşik olan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin 412 nm’de absorbans

ölçümü yapılır. Ellman metodunun modifikasyona uğramış hali olan bu yöntemde en iyi absorbans 412 nm’de gözlenmektedir (Ellman et al. 1961).

Aktivite ölçümü sonrasında inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Bunun için pipetleme işlemi Çizelge 3.1.’de verilen numune tüpü içeriğine göre yapıldı. Enzimlerin aktivitelerindeki değişim 412 nm’de absorbansta UV spektrofotometresindeki ölçüm ile takip edildi. Kullanılan her bir inhibitör için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplandı. İnhibisyon etkisi gösteren inhibitörler için aktivite (%) - [I] grafiği çizilip ve bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) hesaplandı. Ayrıca inhibisyon etkisi gösteren inhibitörlerin bu iki enzim ile etkileşim kinetikleri Lineweaver-Burk grafiği ile hesaplandı. Sayısal olarak  $K_i$  değerleri tespit edilerek inhibitörlerin enzimlere olan ilgisi yorumlandı. Lineweaver- Burk grafiği, beş farklı substrat konsantrasyonunda  $1/V$  nin  $1/S$ ’ye karşı grafiğe edilmesi ile oluşturuldu. Bu çalışma sonunda inhibitörlerin AChE ve BChE enzimlerini üzerine inhibisyon etkileri ile ilgili veriler değerlendirilerek seçicilik özellikleri ve inhibisyon türleri belirlendi.

#### **b) MAO-A ve MAO-B İzoenzimlerinin Aktivitelerinin Tayini**

1 Mm Vanillik asit, 500  $\mu$ M 4-aminoantipirin ve 4 U.mL<sup>-1</sup> HRP içeren kromojenik çözelti hazırlandı. Bu çözelti günlük hazırlanması gereken bir çözeltidir. Aktivite tayininde 96 kuyucuklu mikropate kullanıldı. Deney sırasında kuyu içeriği 50  $\mu$ L kromojenik çözelti, 200  $\mu$ L substrat çözeltisi (500  $\mu$ M p-tiramin MAO-A için, 2.5mM MAO-B için) ve 50  $\mu$ L  $K_2HPO_4$  tamponundan (pH 7.6) ve 50  $\mu$ L enzimden oluşur. Kuyucuklara çözeltiler pipetlenirken öncelikli olarak substrat çözeltisi, tampon ve enzim eklendi daha sonra 60 sn çalkalamadan sonra 15 dk 37 °C’de karanlıkta inkübe edildi. Ardından kromojenik çözelti konularak 498 nm ‘de 15 dk boyunca takip edildi. Absorbans farkı dikkate alınarak enzimlerin aktiviteleri hesaplandı (Bozdağ Dünder vd. 2008; B. Evranos, 2010).

#### **MAO-A ve MAO-B İzoenzimlerinin Yeni İnhibitörlerle Etkileşiminin Kinetik Tayini**

Bir bileşiğin veya inhibitörün  $IC_{50}$  değeri, ilgili enzimin aktivitesinin %50’ sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonudur.  $IC_{50}$  değeri, bir bileşiğin bir enzime olan afinitesinin doğrudan belirteci olmamakla beraber inhibitörün enzime olan ilgisinin bir ifadesi olan  $K_i$  değeri ile ilişkilidir. Bu ilişkiyi ifade etmek için şu ifade kullanılabilir. (Cheng and Prusoff, 1973; Evranos vd. 2007; Bozdağ Dünder vd. 2008).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_m}$$

IC<sub>50</sub> : İnhibitörün fonksiyonel aktivitesinin bir ifadesi,

[S] : Substrat konsantrasyonu,

K<sub>m</sub> : Enzimin substratına olan ilgisinin bir gösterir.

MAO-A ve MAO-B izoenzimlerinin yapılacak inhibisyon çalışmalarında 96 kuyucuklu siyah mikrolateler kullanıldı.

İnhibisyon etkisi gösteren inhibitörler için Aktivite(%)-[I] grafiği çizildi ve bu grafikten %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri) hesaplandı.

### 3.2.2. Antioksidan Çalışmalar

**a) Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme kapasitesi:** Öncelikli olarak 1 mg/mL konsantrasyonunda I3C ve DİM stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 40, 80, 120 µg/mL olacak şekilde deney tüplerine aktarıldı. Deney tüplerindeki çözelti hacmi 1 mL olacak şekilde destile suyla tamamlandı. Çalışmanın devamında deney tüplerinin her birine 2,5 mL 0,2 M'lık fosfat tamponu (pH:6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] eklenerek karışım 20 dakika 50 °C'de inkübe edilir. Devamında elde edilen reaksiyon karışımına 2,5 mL %10'luk TCA eklendi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alınıp ve bunun üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL %0,1'lik FeCl<sub>3</sub> ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de okundu. Kör olarak destile su kullanıldı. Kontrol olarak ise numune yerine destile su kullanıldı.

**b) Cu<sup>2+</sup>-Cu<sup>+</sup> indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu):** I3C ve DİM molekülünün Cu<sup>2+</sup> indirgeme aktivitesi Apak metodunun (Apak *et al.* 2006) hafif bir modifikasyonu ile yapıldı (Ak and Gülçin 2008). 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan I3C ve DİM stok çözeltisi; 10, 20, 30 µg/mL olacak şekilde pipetlenip sırasıyla 0,25 mL CuCl<sub>2</sub> çözeltisi (0,01 M), 0,25 mL etanolikneokuprin çözeltisi (7,5x10<sup>-3</sup> M) ve 0,25 mL CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> tampon çözeltisi (1 M) eklendi. 450 nm'de yarım saat sonra destile su olan köre karşı absorbans değerleri ölçüldü.

**c) FRAP indirgeme aktivitesi:** Öncelikli olarak 1 mg/mL konsantrasyonunda I3C ve DİM stok çözeltisi hazırlandı. Deney tüplerine 50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarına denk gelecek şekilde I3C ve DİM stok çözeltilerinden ve standart çözeltilerden aktarıldı. Tampon çözeltiyle hacimleri 0,5 mL'ye tamamlandı.

Çalışmanın devamında deney tüplerine sırasıyla 20 mM'lık  $\text{FeCl}_3$  çözeltisi 2250 mL olarak ve FRAP reaktifi 2250  $\mu\text{L}$  eklenerek toplam hacmin 5 mL'ye tamamlandı. Vortex'de deney tüpleri karıştırılıp 10 dakika sonra 593 nm'de absorbanları kaydedildi. Asetat tamponu kör olarak kullanıldı (Göçer ve Gülçin 2011).

**d) 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikali giderme aktivitesi:**

DPPH'nin 1 mM'lık çözeltisi serbest radikal olarak kullanıldı. Stok çözeltisi önceden hazırlanıp 1 mg/mL konsantrasyonunda deney tüplerine eklendi. Deney tüplerine sırasıyla 25, 50 ve 75  $\mu\text{g/mL}$  stok çözeltiden eklendi. Etanol ile toplam hacimleri 3 mL olarak ayarlandı. Çalışmanın devamında stok DPPH çözeltisinden her bir numune tüpüne 1 mL olacak şekilde eklendi. Yarım saat karanlıkta ve oda sıcaklığı inkübe edildi. Kör olarak etanol kullanılıp 517 nm'de absorban okundu. Kontrol olarak, 1 mL DPPH çözeltisi ve 3 mL etanol kullanıldı (Göçer ve Gülçin 2011).

**e) 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali**

**giderme aktivitesi:** Re ve arkadaşlarının metodu doğrultusunda ABTS radikali giderme aktivitesi çalışıldı (1999). İlk olarak 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. ABTS radikalleri üretmek için çözeltiye 2,45 mM'lık persülfat çözeltisi eklendi. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılmadan önce 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile kontrol çözeltisi 734 nm'de absorbanı  $0,700 \pm 0,025$  olacak şekilde ayarlandı. 1 mg/mL konsantrasyonunda I3C ve DİM stok çözeltisi hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarına (20-40 ve 60  $\mu\text{g/mL}$ ) ABTS radikal çözeltisi ilave edilip yarım saat inkübe edildi. 734 nm'de etanoldan oluşan köre karşı absorban değerleri kaydedildi.

### **3.2.3. Moleküler Docking**

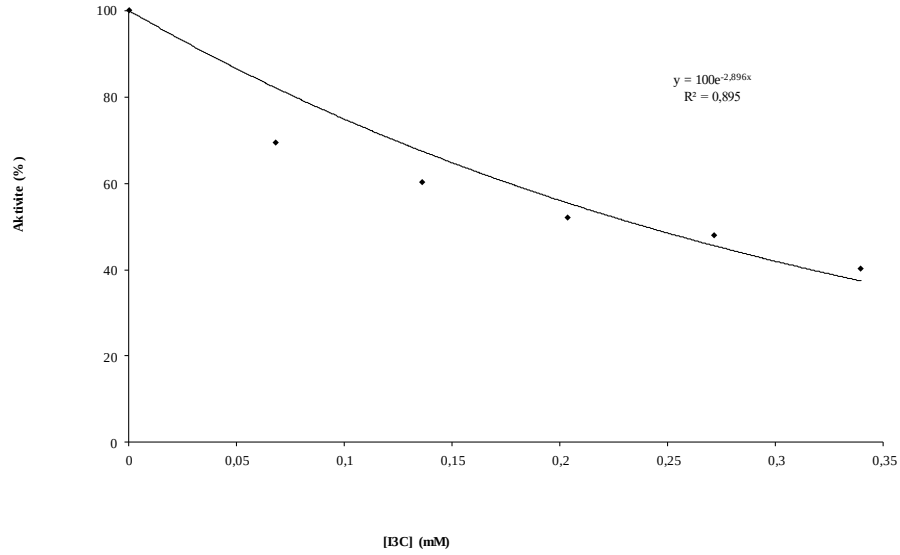
İnhibitörler ve enzimler arasındaki bağlanma afinitesini ve olası etkileşimleri belirlemek için moleküler docking çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, Asetilkolin esterase (PDB kodu: 4TVK), Butirilkolin esterase (PDB kodu: 5NN0), Monoamin oksidaz-A (PDB kodu: 2Z5X) ve Monoamin oksidaz-B (PDB kodu: 2V60) enzimlerinin yüksek çözünürlüklü x-ray kristal yapıları Protein Data Bank (PDB)'dan temin edildi. Elde edilen x-ray yapıları moleküler docking çalışmalarında kullanıldı. Moleküler docking simülasyonları için Schrödinger Maestro programı kullanıldı (Maestro Version 12.4.072, Release 2020-2). Öncelikle, elde edilen 3 boyutlu protein yapıları Protein Preparation Wizard kullanılarak hazırlandı. Maestro programı bünyesinde bulunan Prime modülü kullanılarak eksik olan rezidüel yapıya eklendi. Amino asitler, Propka

modülü yardımıyla fizyolojik pH'da iyonize edildi. Protein veya liganttan 3 Å uzaklıkta bulunan su molekülleri yapıdan uzaklaştırıldı. Enerji minimasyonu OPLS\_2005 Force Field kullanılarak gerçekleştirildi. Ligandların 3 boyutlu yapıları LigPrep programı yardımıyla elde edildi. Ligandların pH  $7.0 \pm 2.0$ 'da doğru moleküler geometrilerinin ve protonasyon durumlarının eldesi için Epik modülü ve OPLS\_2005 force field kullanıldı. Receptor Grid Generation platformu kullanılarak, dockingi yapılacak olan ligandların muhtemel bağlanma bölgesi belirlendi. Daha sonra, Glide kullanılarak hazırlanan ligandlar hedef enzimlere dock edildi. Docking gerçekleştirilirken protein rijid yapıda tutulurken, ligandlar esnek olarak ayarlandı ve ekstra hassasiyet (Extra Precision (XP)) ayarlanarak docking hesaplamaları yapıldı. Docking işleminden sonra inhibitörlerin enzimlerin aktif bölgesinde bulunan aminoasit rezidüleriyle olan etkileşim türleri ve docking skorları gibi çeşitli parametreleri belirlendi.

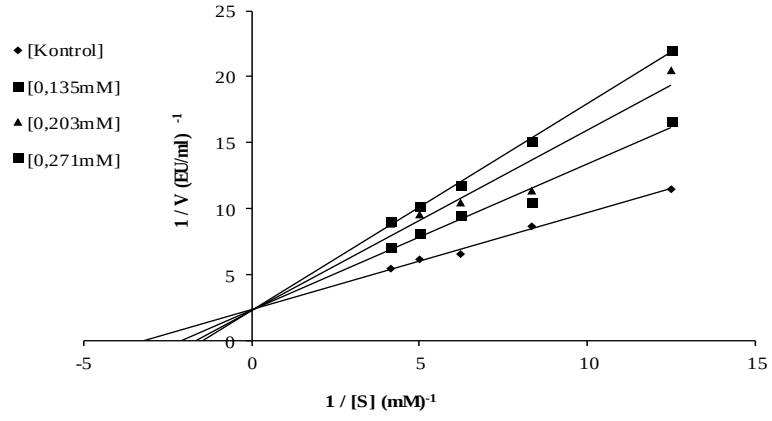
## 4. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

### 4.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Moleküllerinin İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları

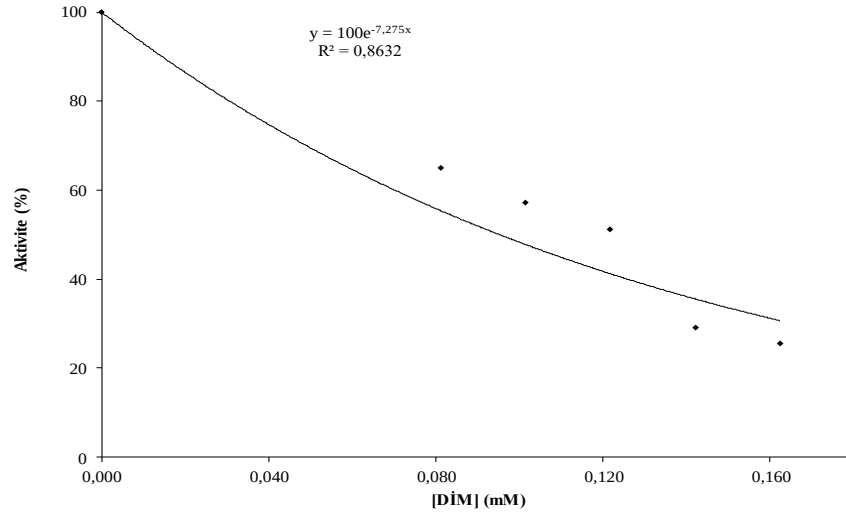
Asetilkolinesteraz enzimi için doygun substrat konsantrasyonunda I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon çalışmaları yapıldı. Ölçümler Ellman metodunun hafif modifikasyona uğramış şekliyle gerçekleştirildi. İnhibisyon gösteren maddeler için Aktivite(%)-[I] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri her bir madde için çizilen grafikler üzerinden hesaplandı.



**Şekil 4.1.** Asetilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği

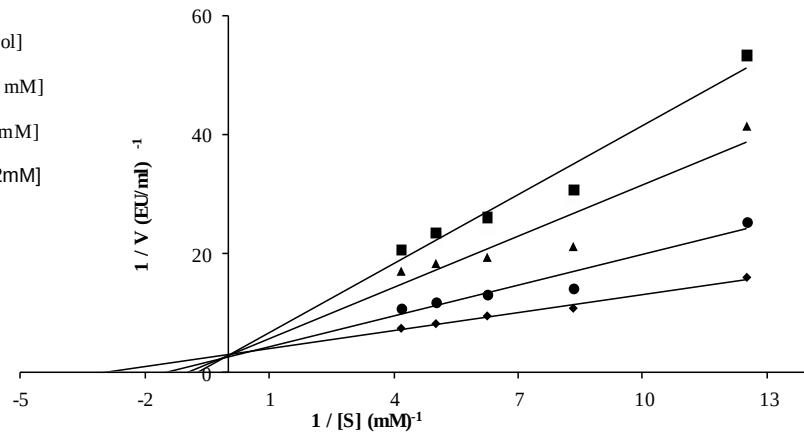


**Şekil 4.2.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



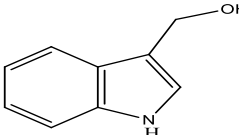
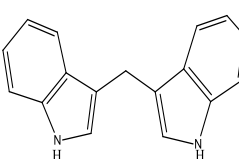
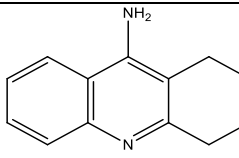
**Şekil 4.3.** Asetilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği





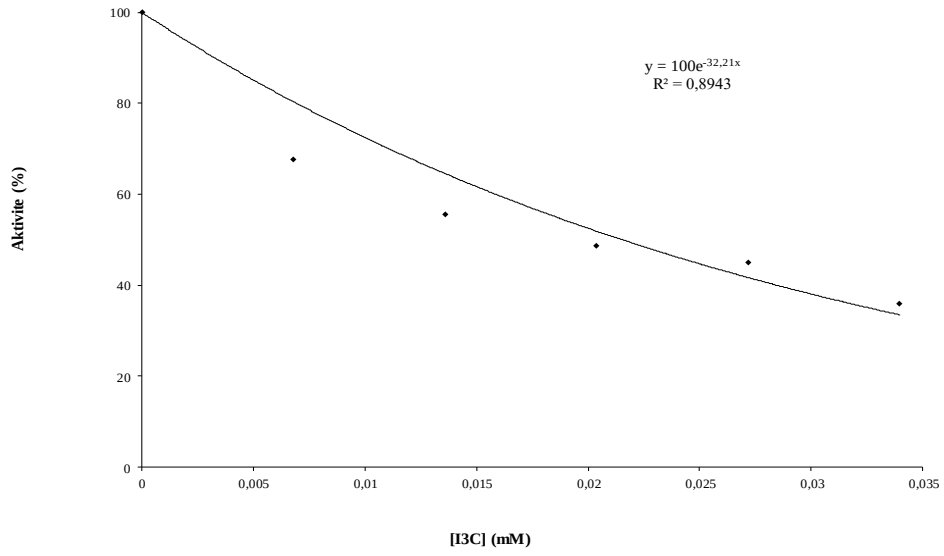
**Şekil 4.4.** Asetilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.1.** AChE enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon sonuçları

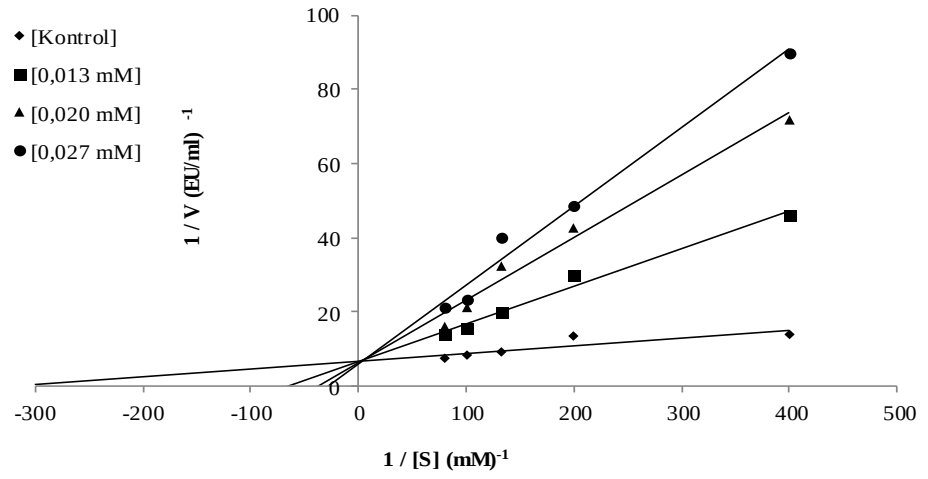
| İnhibitör                                                                                     | IC <sub>50</sub><br>(µM) | K <sub>i</sub> Ortalama<br>(µM) | İnhibisyon<br>Türü | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|----------------|
| <br>I3C    | 239,295                  | 243,528±33,7                    | Yarışmalı          | 0,895          |
| <br>DIM    | 95,257                   | 67,195±28,3                     | Yarışmalı          | 0,863          |
| <br>Takrin | 0,116                    | 6,31E-05                        | Yarışmalı          | 0,888          |

#### 4.2. Bütirilkolinesteraz Enziminin Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Molekülleri İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları

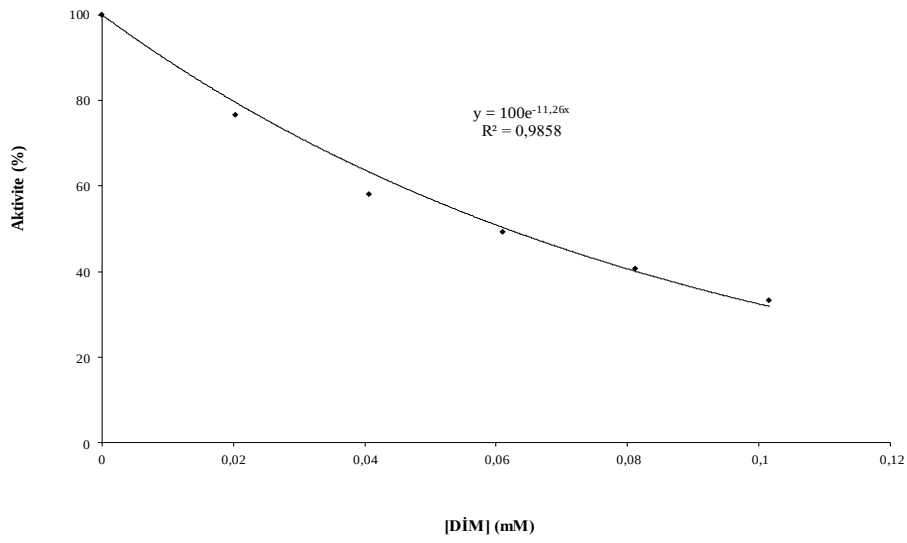
Bütirilkolinesteraz için doymuş substrat konsantrasyonunda I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon çalışmaları yapıldı. Ölçümler Ellman metodunun hafif modifikasyona uğramış şekliyle gerçekleştirildi. İnhibisyon gösteren maddeler için Aktivite(%)-[I] ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri her bir madde için çizilen grafikler üzerinden hesaplandı.



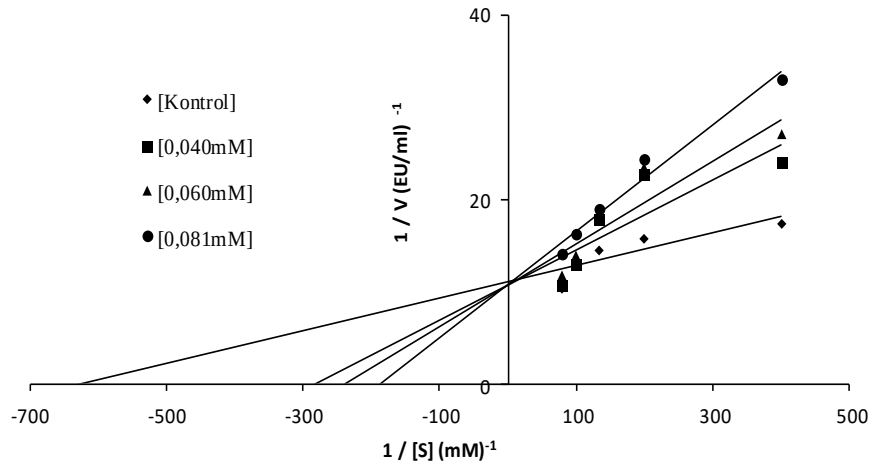
**Şekil 4.5.** Bütirilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği



**Şekil 4.6.** Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.7.** Bütirilkolinesteraz enziminin çalışılan beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği



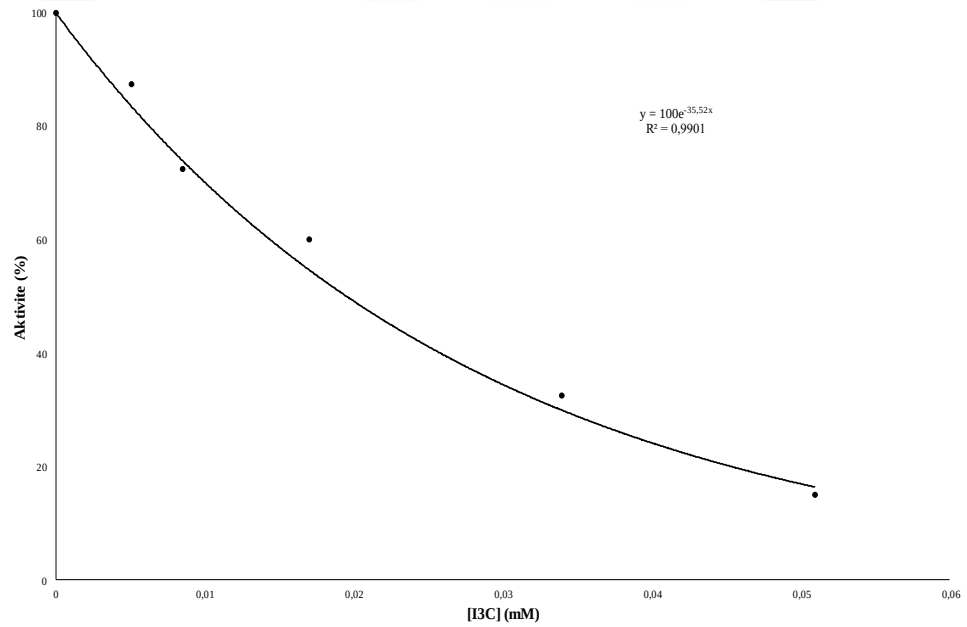
**Şekil 4.8.** Bütirilkolinesteraz enzimi kullanılarak beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.2** BChE enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon sonuçları

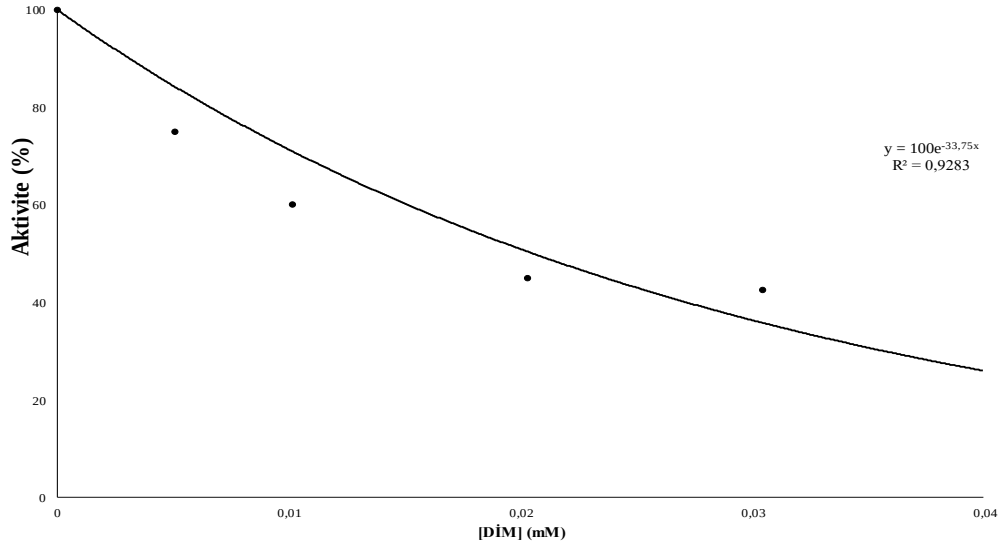
| İnhibitör  | IC <sub>50</sub> (µM) | K <sub>i</sub><br>Ortalama(µM) | İnhibisyon<br>Türü | R <sup>2</sup> |
|------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------|----------------|
| <br>I3C    | 21,51                 | 2,784±0,4                      | Yarışmalı          | 0,894          |
| <br>DIM    | 61,54                 | 35,529±2,0                     | Yarışmalı          | 0,985          |
| <br>Takrin | 165,78                | 0,136                          | Yarışmalı          | 0,966          |

#### 4.3. Monoamin Oksidaz A ve B Enzimi Aktivitesi Üzerine İndol-3-Karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) Molekülleri İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesiyle İlgili Yapılan Çalışma Sonuçları

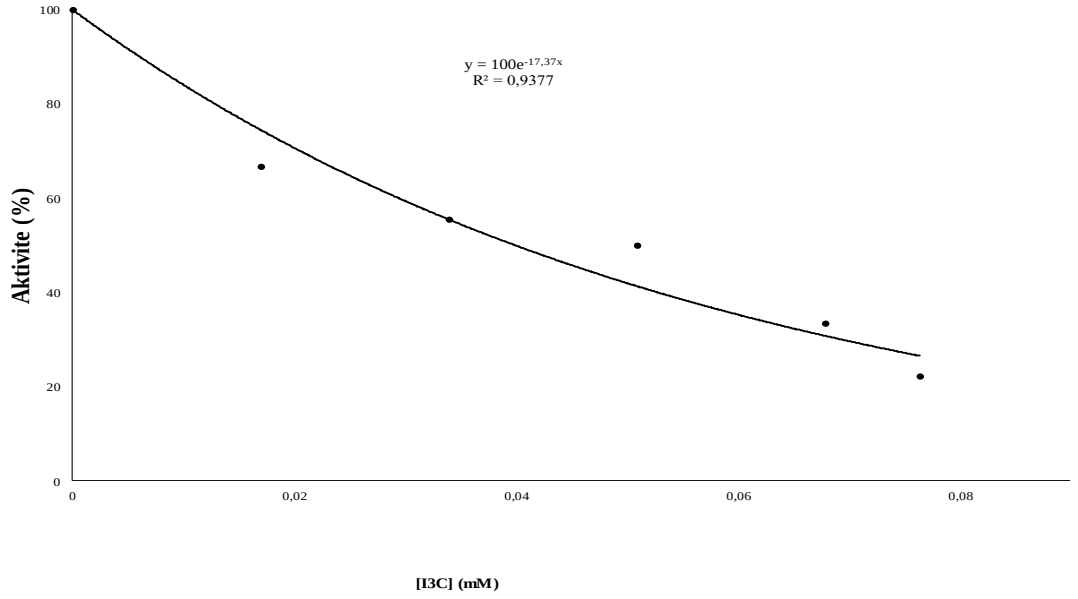
MAO-A ve MAO-B içerisinde HRP bulunan koromojenik çözeltiyle I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon çalışmaları yapıldı. Çalışmada 96 kuyucuklu siyah mikropate kullanıldı. 498 nm’de 15 dk absorbans değeri ölçülüp enzim aktivitesi hesaplandı. İnhibisyon gösteren maddeler için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilip IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.



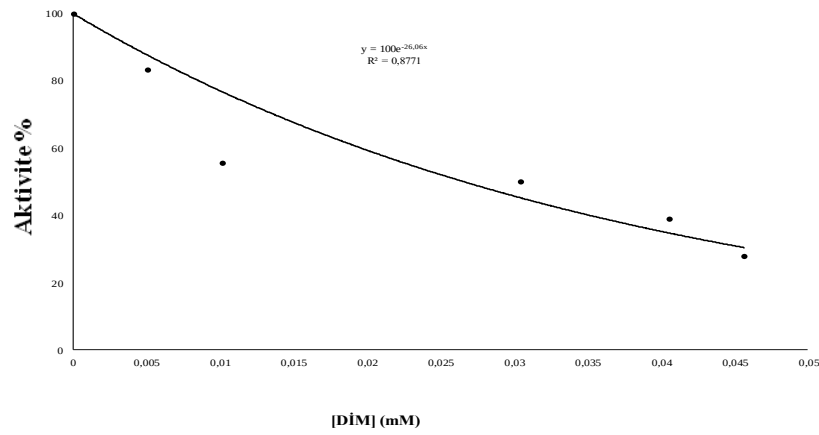
**Şekil 4.9.** MAO-A enzimi kullanılarak beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği



**Şekil 4.10.** MAO-A enzimi kullanılarak beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği



**Şekil 4.11.** MAO-B enzimi kullanılarak beş farklı indol-3-karbinol (I3C) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[I3C] grafiği



**Şekil 4. 12.** MAO-B enzimi kullanılarak beş farklı 3,3'-diindolilmetan (DİM) konsantrasyonunda çizilen Aktivite (%)-[DİM] grafiği

**Çizelge 4.3.** MAO-A ve MAO-B enzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM moleküllerinin IC<sub>50</sub> ve R<sup>2</sup> değerleri

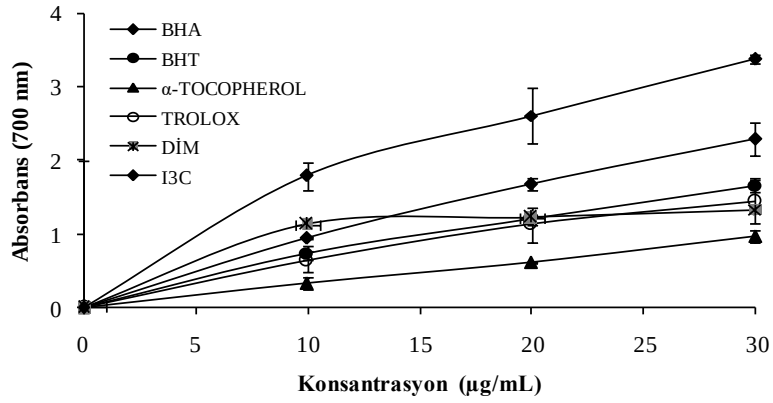
|              | indol-3-karbinol      |                | 3,3'-diindolilmetan   |                | Klorgilin*            |                | Selegilin <sup>‡</sup> |                |
|--------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------------------|----------------|
|              | IC <sub>50</sub> (μM) | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> (μM) | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> (nM) | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub> (nM)  | R <sup>2</sup> |
| <b>MAO-A</b> | 19,52                 | 0,990          | 20,56                 | 0,928          | 2,869                 | 0,914          | -                      | -              |
| <b>MAO-B</b> | 40,05                 | 0,937          | 26,65                 | 0,877          | -                     | -              | 53,00                  | 0,963          |

\*: MAO-A için pozitif kontrol; <sup>‡</sup>: MAO-B için pozitif kontrol

#### 4.4. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

##### a) Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup> indirgeme kuvveti bulguları

İndirgeme metodlarından biri olan demir indirgeme metodunda antioksidan maddelerin indirgeme özelliğinden dolayı test çözeltisinin sarı olan rengi yeşil renk almaktadır (Gülçin 2006b; Gülçin vd. 2006a). Çalışmada kullanılan I3C ve DİM moleküllerinin ortamda artan konsantrasyonla birlikte indirgeme kapasitesi artış göstermektedir. I3C ve DİM'in indirgeme potansiyel farkı ölçülürken farklı konsantrasyonlarda 10-20 ve 30 μg/mL olmak üzere pipetleme yapıldı. 700 nm'de ölçüm yapılarak absorbens değerleri bulundu.



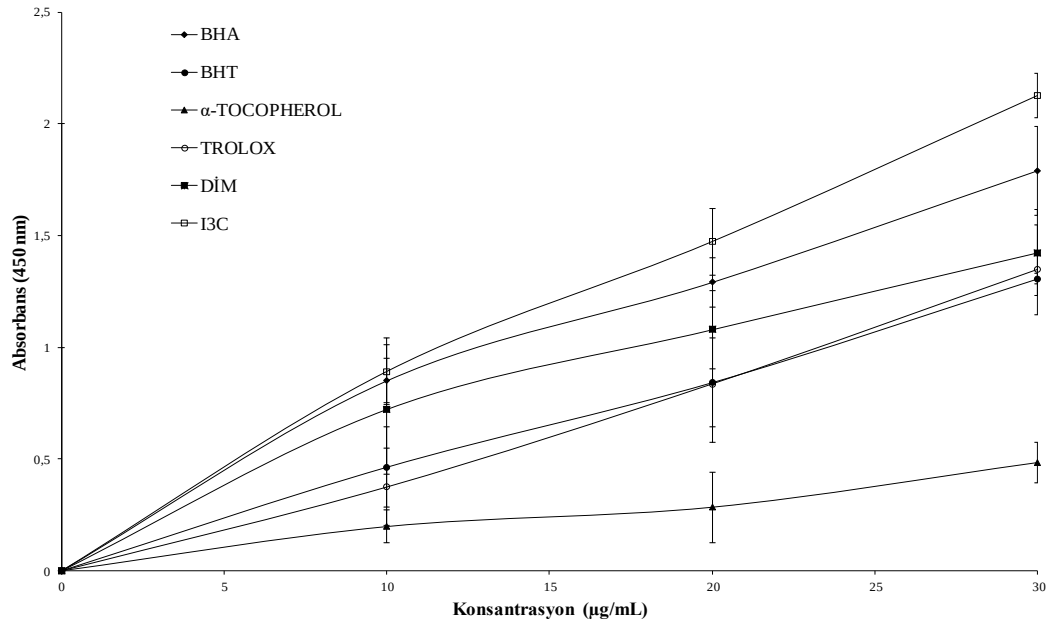
**Şekil 4.13.** Farklı konsantrasyonlardaki (10-30µg/mL) I3C ve DİM moleküllerinin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

I3C ve DİM moleküllerinin ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi grafiği çizildi. Daha sonra her bir standart antioksidan, İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) için 10 µg/mL'ye karşılık gelen absorbans değerleri çizelge 4.4.'de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı. Bu konsantrasyonda İndol-3-karbinol (I3C), 3,3'-diindolilmetan (DİM) ve standart antioksidanların ferrik iyonlarını ( $Fe^{3+}$ ) indirgeme kuvvetlerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları  $I3C > DİM > BHA > BHT > Troloks > \alpha$ -Tokoferol şeklinde olduğu belirlendi. Çizelgedeki yüksek absorbans değerleri maddelerin yüksek indirgeme kapasitesi olduğunu göstermektedir.

#### **b) $Cu^{2+}$ - $Cu^+$ indirgeme kuvveti (Kuprak metodu) bulgular**

İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) moleküllerinin kuprik iyonlarının ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi. İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM)'in kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyondaki (10-30µg/mL) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. İndol-3-karbinol (I3C), 3,3'-diindolilmetan (DİM)'in çözeltilerinin ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $Cu^{2+}$ ) indirgeme grafiği çizildi. Daha sonra her bir standart antioksidan, İndol-3-karbinol (I3C), 3,3'-diindolilmetan (DİM) için 10 µg/mL'ye karşılık gelen absorbans değerleri çizelge 4.4.' de verilerek birbirleriyle karşılaştırıldı.



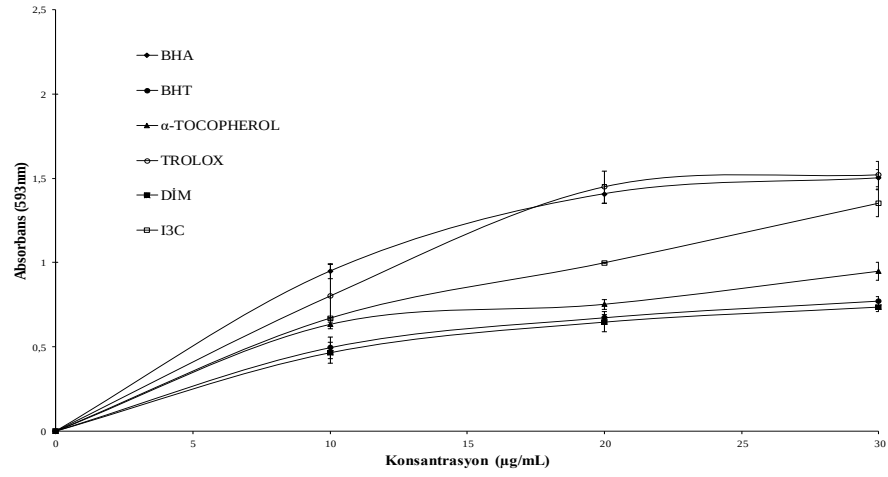


**Şekil 4.14.** I3C, DİM moleküllerinin farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) indirgeme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

10µg/mL konsantrasyonda I3C, DİM ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını ( $\text{Cu}^{2+}$ ) kupröz iyonlarına ( $\text{Cu}^{+}$ ) indirgeme aktiviteleri birbirleriyle karşılaştırıldı. Sonuçlar  $\text{I3C} > \text{BHA} > \text{DİM} > \text{BHT} > \text{Toroloks} > \alpha\text{-Tokoferol}$  olarak bulundu.

### c) Ferrik indirgeme kuvveti (FRAP) bulguları

Elektron vererek antioksidan aktivite gösteren metodlardan bir diğeri FRAP metodudur. Ferrik iyonlarının ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenmesi esasına dayanır. Elde edilen ferröz ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iyonları Tripiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks 593 nm’de maksimum absorbans gösterir.



**Şekil 4.15.** Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM moleküllerinin (10-30 µg/mL) FRAP indirgeme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

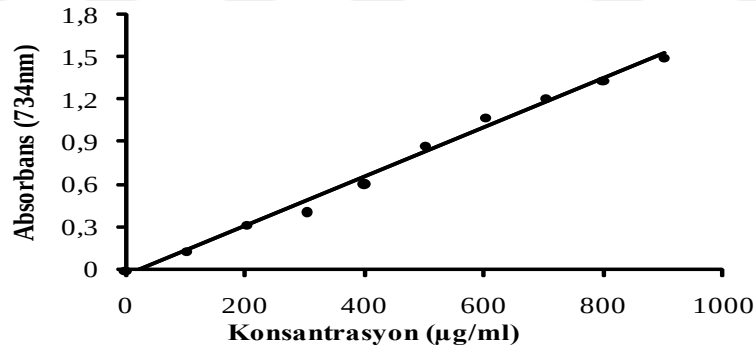
I3C ve DİM moleküllerinde FRAP metoduna göre ferrik iyonlarının ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferröz iyonlarına ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgeme kapasitesinin konsantrasyon ile doğru orantılı olarak arttığı bulundu. Ayrıca İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM)'in standart antioksidanlarla karşılaştırıldı. Sonuç olarak  $\text{I3C} > \text{Troloks} > \text{BHA} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{DİM} > \text{BHT}$  şeklinde sıralama elde edildi.

**Çizelge 4.4.** 10 µg/mL konsantrasyonunda I3C ve DİM'in çözeltilerinin ferrik iyonlarını ( $\text{Fe}^{3+}$ ), kuprik ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iyonlarını ve FRAP indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırmaları

| Antioksidanlar                       | $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$<br>indirgeme | $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^{+}$<br>İndirgeme | FRAP<br>İndirgeme |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|
| <b>BHA</b>                           | 0,946                                            | 0,850                                           | 0,948             |
| <b>BHT</b>                           | 0,743                                            | 0,464                                           | 0,495             |
| <b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b> | 0,331                                            | 0,197                                           | 0,633             |
| <b>Troloks</b>                       | 0,628                                            | 0,374                                           | 1,228             |
| <b>I3C</b>                           | 3,590                                            | 1,784                                           | 1,340             |
| <b>DİM</b>                           | 1,131                                            | 0,722                                           | 0,581             |

**d) DPPH serbest radikal giderme aktivitesi bulguları**

DPPH radikal giderme aktivite tayin metodu için ilk olarak standart grafik çizildi. ( $r^2:0,991$ )



**Şekil 4.16.** DPPH radikal giderme aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik

DPPH radikal miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda verilen denklemden hesaplandı.

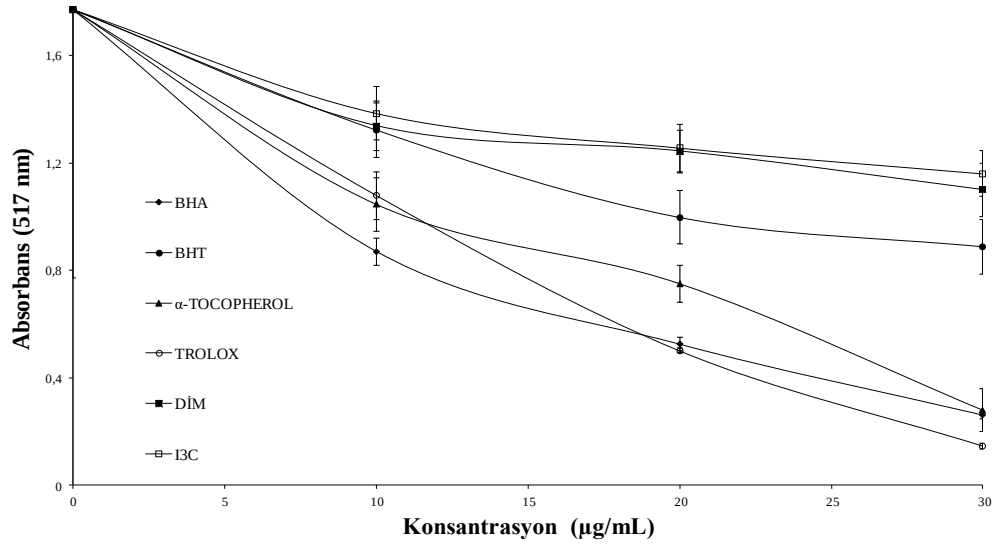
$$(\text{Absorbans } \lambda_{517}) = 0,0028 \times [\text{DPPH}] - 0,0125$$

DPPH radikali ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada  $\lambda_{517-N}$  DPPH radikal çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{517-K}$  ise sadece DPPH radikal çözeltisi içeren kontrol değerinin

absorbans değerini ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks kullanıldı.

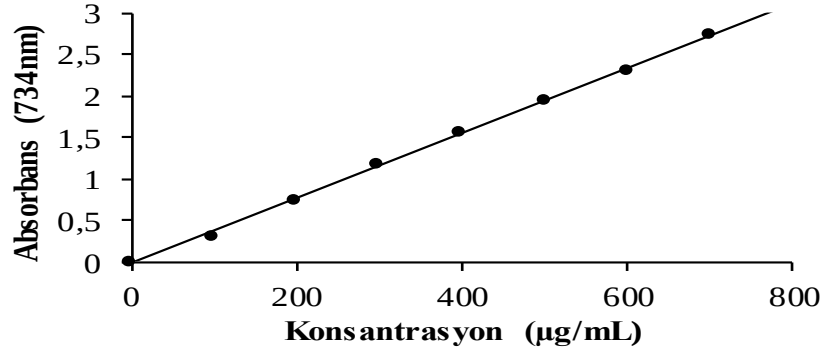


**Şekil 4.17.** Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM'in (10-30 µg/mL) DPPH giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

I3C ve DİM molekülleri ile DPPH radikal giderme aktivitesi grafiği çizildi. Her iki maddeyi de tüm standartlar için  $IC_{50}$  değeri hesaplandı. I3C, DİM ve standart antioksidanlar sırasıyla  $DİM < I3C = BHT < \alpha$ -Tokoferol  $< BHA < Troloks$  sıralamasıyla aktivite gösterdiler.

#### e) ABTS radikal giderme aktivitesi bulguları

ABTS'den  $ABTS^{+}$ 'nin oluşturulması için gerekli çözeltiler bir gece önceden hazırlandı. Daha sonra 734 nm'de  $0.750 \pm 0.025$  değerlerine ulaşak şekilde seyreltilti.  $ABTS^{+}$  giderme aktiviteleri tayini için ilk olarak standart grafik çizildi. ( $r^2:0,999$ )



**Şekil 4.18.** ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesi tayininde kullanılan ABTS<sup>•+</sup> için hazırlanan standart grafik

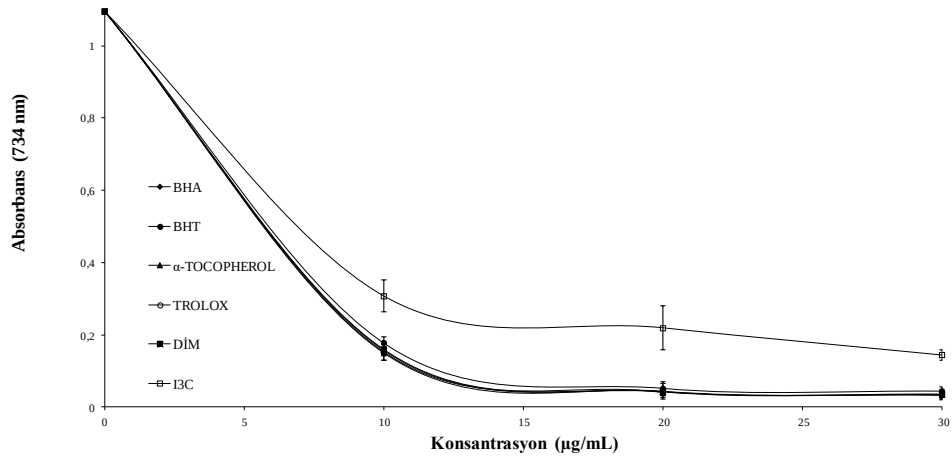
ABTS<sup>•+</sup> giderme aktivitesi tayininden sonra geriye kalan ABTS<sup>•+</sup> miktarı standart grafikten elde edilen ve aşağıda da verilen denklemden hesaplandı.

$$\text{Absorbans } (\lambda_{734\text{nm}}) = 0.0017 \times [\text{ABTS}^{\bullet+}] - 0.0359$$

ABTS<sup>•+</sup> giderme ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

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

Burada  $\lambda_{734\text{-N}}$  ABTS<sup>•+</sup> çözeltisine numune ilavesinden sonra bulunan absorbans değeri,  $\lambda_{734\text{-K}}$  ise sadece ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi içeren kontrol değerinin absorbansını ifade eder. Pozitif kontrol olarak BHA, BHT,  $\alpha$ - tokoferol ve troloks kullanıldı.



**Şekil 4.19.** Farklı konsantrasyonlardaki I3C ve DİM moleküllerinin (10-30 µg/mL) ABTS<sup>++</sup> giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks ile karşılaştırması

ABTS<sup>++</sup> radikali giderme aktivitesi grafiği I3C, DİM ve standartlar için çizildikten sonra her biri için IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı. İndol-3-karbinol (I3C), 3,3'-diindolilmetan (DİM) ve standart antioksidanlar sırasıyla BHT < BHA = Troloks = DİM < I3C < α-Tokoferol sırasıyla aktivite gösterdiler.

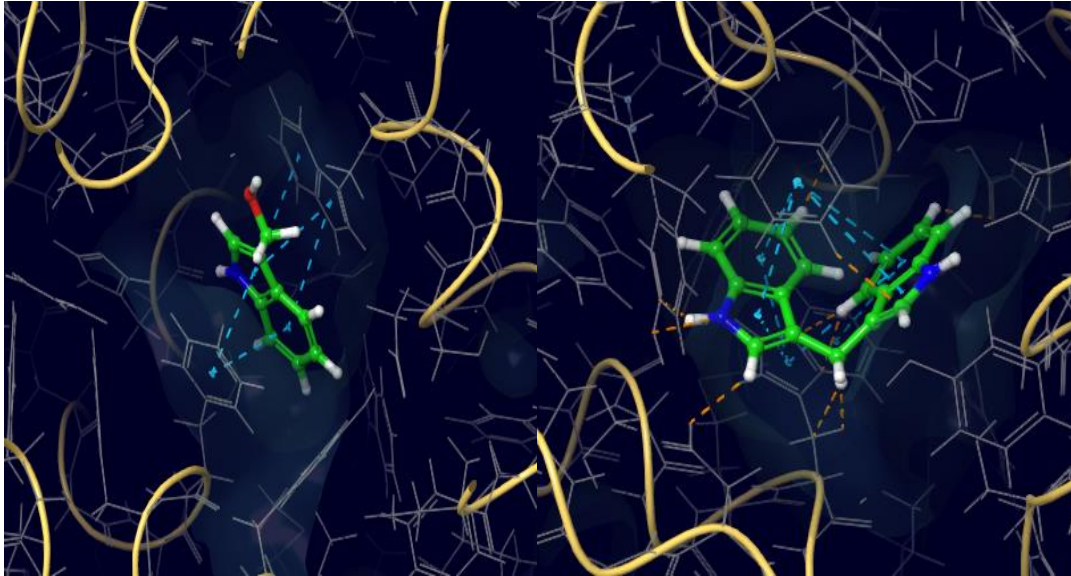
**Çizelge 4.5.** I3C, DİM molekülleri ve standart antioksidanlara ait DPPH<sup>•</sup> ve ABTS<sup>++</sup> radikal giderme aktiviteleri sonucu hesaplanan IC<sub>50</sub> (µg/mL) ve R<sup>2</sup> değerleri

| DPPH <sup>•</sup> Giderme |                  |                | ABTS <sup>++</sup> Giderme |                |
|---------------------------|------------------|----------------|----------------------------|----------------|
|                           | IC <sub>50</sub> | R <sup>2</sup> | IC <sub>50</sub>           | R <sup>2</sup> |
| <b>BHA</b>                | 11,35            | 0,995          | 5,33                       | 0,875          |
| <b>BHT</b>                | 34,65            | 0,962          | 5,77                       | 0,860          |
| <b>α-Tokoferol</b>        | 13,86            | 0,946          | 4,07                       | 0,986          |
| <b>Troloks</b>            | 9,90             | 0,948          | 5,33                       | 0,865          |
| <b>I3C</b>                | 34,65            | 0,890          | 4,95                       | 0,855          |
| <b>DİM</b>                | 69,30            | 0,891          | 5,33                       | 0,864          |

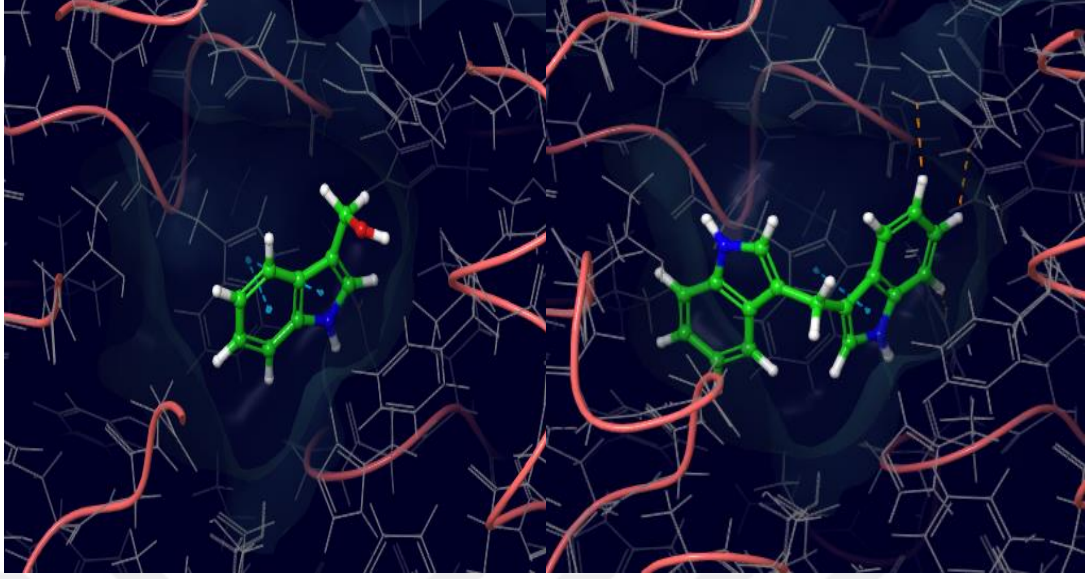
## f) Moleküler Docking Sonuçları

**Çizelge 4.6.** Çalışılan inhibitörlerin moleküler docking skorları, bağlanma enerjileri (kcal/mol ) ve ligand etkileşim türlerinin sonuçları

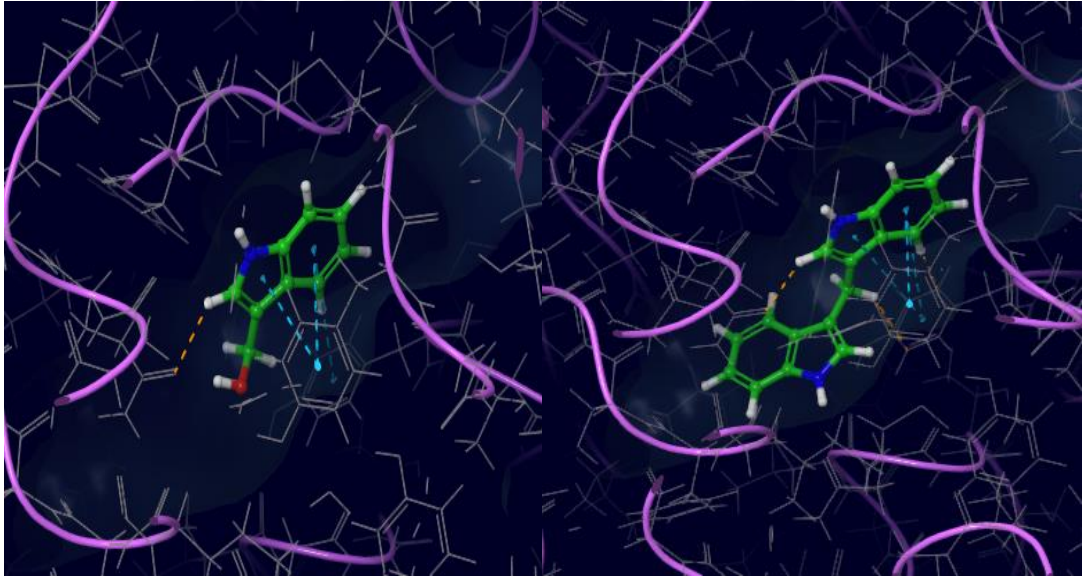
| Hedef Enzim  | Molekül | Docking skoru | $\Delta G$ vdW | $\Delta G$ coulomb | Glide energy | Glide emodel | H-bağı         | Pi-Pi Etkileşimi |
|--------------|---------|---------------|----------------|--------------------|--------------|--------------|----------------|------------------|
| <b>AChE</b>  | I3C     | -9,16         | -22,29         | -7,35              | -29,64       | -39,66       | HIS440         | PHE330, TRP84    |
|              | DİM     | -8,63         | -22,34         | -2,60              | -24,95       | -44,42       | TYR334         | PHE330, TRP84    |
| <b>BChE</b>  | I3C     | -6,82         | -19,88         | -4,43              | -24,31       | -31,87       | ALA328, HIS438 | TRP82            |
|              | DİM     | -8,78         | -31,47         | -3,59              | -35,07       | -51,72       | HIS438         | TRP82            |
| <b>MAO-A</b> | I3C     | -7,41         | -20,63         | -9,06              | -29,69       | -39,78       | TYR69, GLN215  | TYR407, TYR444   |
|              | DİM     | -10,05        | -38,88         | -4,87              | -43,76       | -64,73       | TYR69, ASN181  | TYR407, TYR444   |
| <b>MAO-B</b> | I3C     | -7,64         | -25,34         | -5,72              | -31,06       | -41,45       | ILE199, TYR326 | -                |
|              | DİM     | -10,18        | -32,47         | -1,52              | -33,99       | -56,90       | TYR326         | TYR326           |



**Şekil 4.20.** Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin AChE enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi

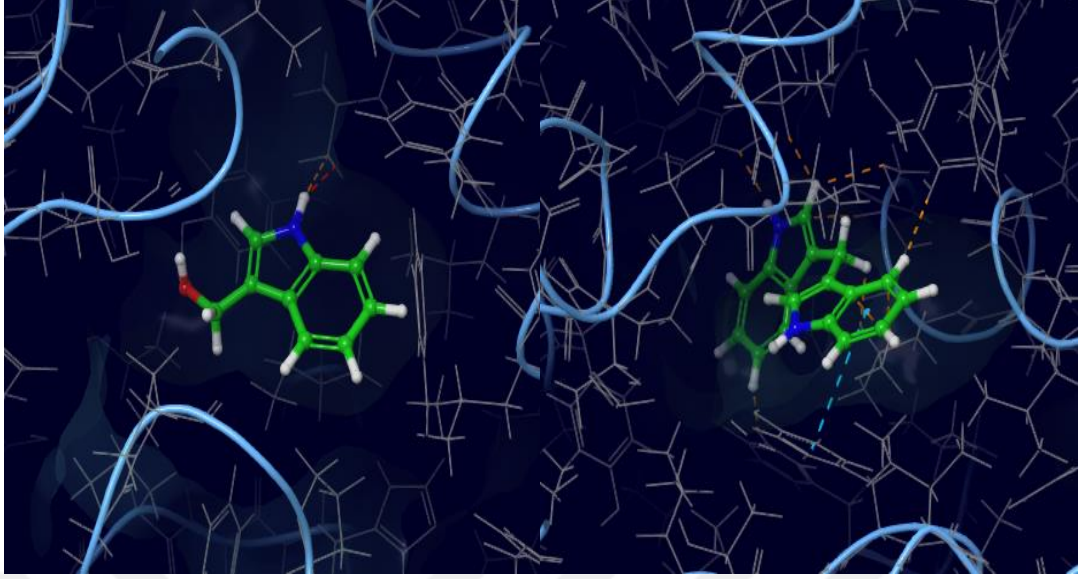


**Şekil 4.21.** Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin BChE enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi

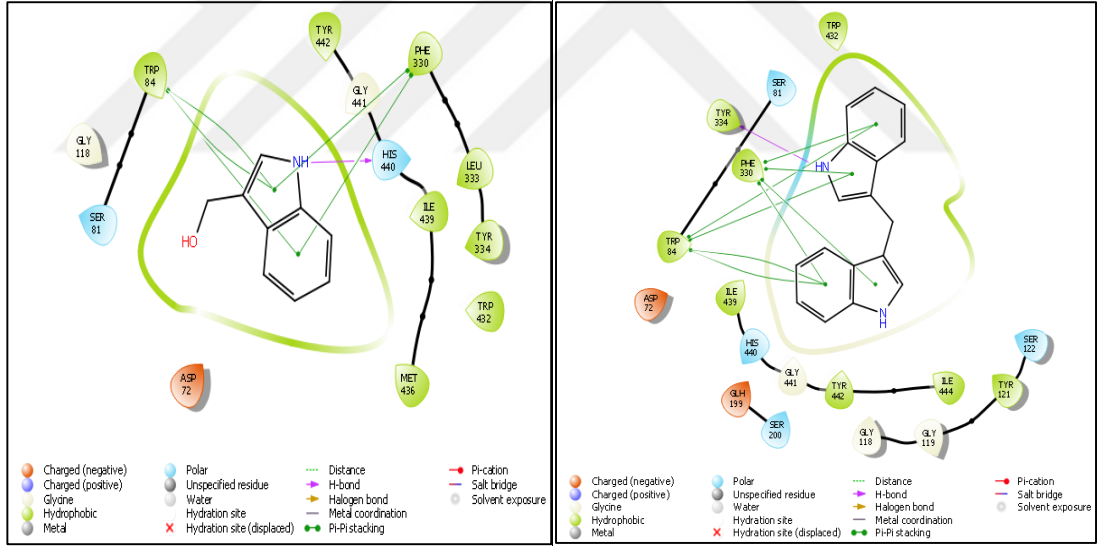


**Şekil 4.22.** Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin MAO-A enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi

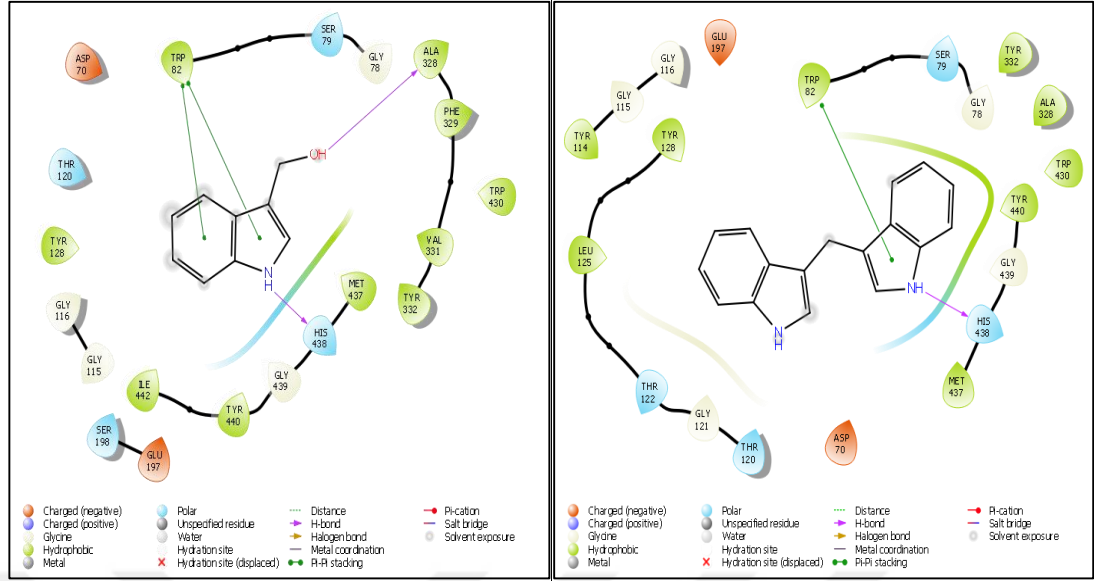




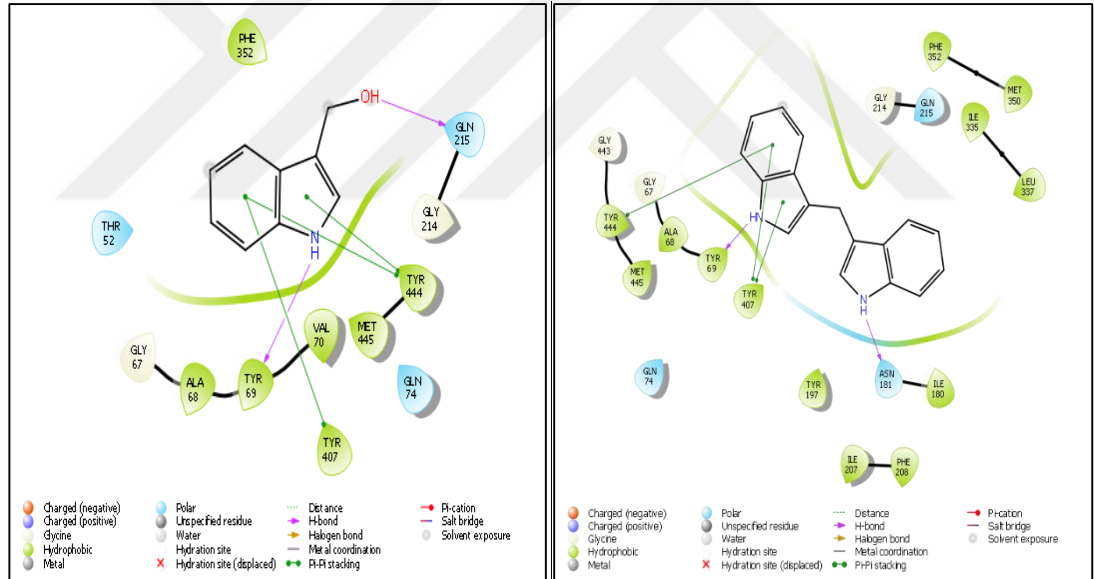
**Şekil 4.23.** Sırasıyla I3C ve DİM moleküllerinin MAO-B enzimi ile etkileşimlerini gösteren docking pozları. Katalitik olarak aktif ligand bağlanma bölgeleri katı yüzey olarak gösterimi



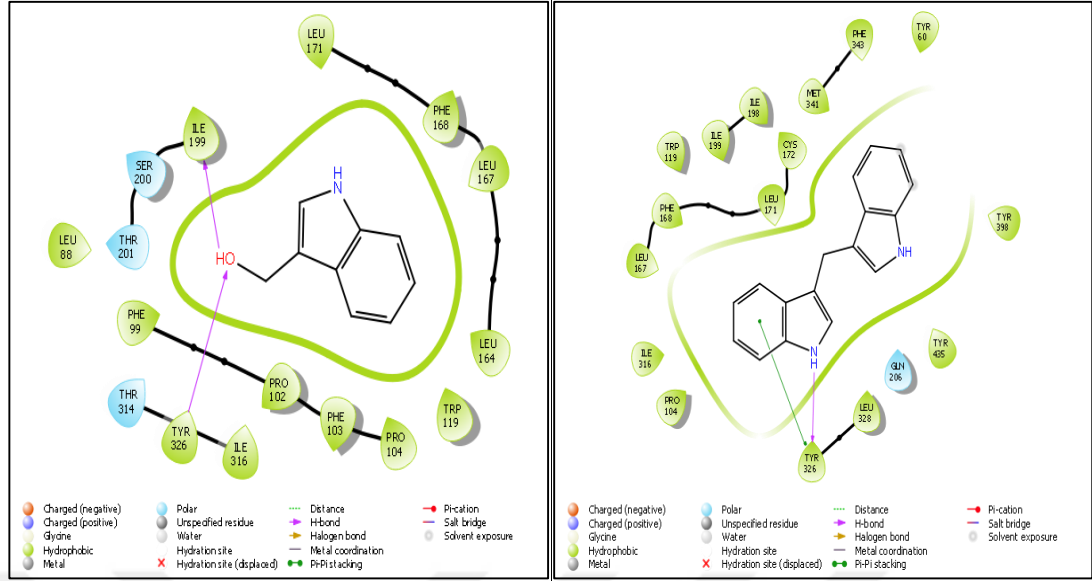
**Şekil 4.24.** AChE enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları



**Şekil 4.25.** BChE enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları



**Şekil 4.26.** MAO-A enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları

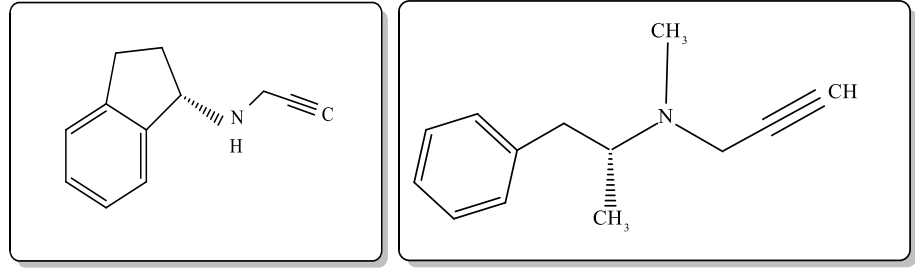


**Şekil 4.27.** MAO-B enziminin aktif bölgesiyle I3C ve DİM ligandlarının anahtar amino asitlerle etkileşimlerini gösteren 2D ligand etkileşim diyagramları

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Mitokondri dış zarında bulunan MAO enzimi flavin içerir ve aminlerin iminlere oksidasyonunu katalizler (De Colibus *et al.* 2005). 1930 yılında ilk olarak bulunmuştur (Youdim and Riederer 2004). Enzim kod numarası (E.C.1.4.3.4) Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından verilmiştir (Weyler *et al.* 1990). MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki formu olduğu 1968 yılında bulunmuştur (Binda *et al.* 2002). % 70 benzerlik gösteren MAO-A ve MAO-B'nin aminoasit kalıntı miktarları farklılık gösterir (Lee *et al.* 2006). Bu enzimin iki formu inhibitör seçicilikleri, substrat tercihleri, aminoasit dizilimleri, dokudaki dağılımları, immünolojik özellikleriyle birbirlerinden ayrılırlar (Abdelhafez *et al.* 2013). Beyinde, karaciğerde, plasentada miktarca fazla bulunurken, dalakta az miktarda bulunurlar (Kalgutkar *et al.* 2001). Primer ve sekonder âminlerin iminlere oksidasyonunu katalizlerler. Serotonin, dopamin gibi nörotransmitterlerin oksidasyonunu katalizler. Bu nörotransmitterler nörodejeneratif hastalıklarda oldukça azalmaktadırlar. MAO'nun substratı olan bu nörotransmitterlerin seviyesinin yükselmesi ise MAO enzimlerinin aktivitelerinin durdurulması yani inhibe edilmesi ile olur. MAO-A enzimini inhibe eden bileşikler, norepinefrin ve serotonin miktarındaki azalmayı engelleyeceğinden dolayı antidepresyon etki gösterirler. Dopaminin parçalanmasında etkili olan MAO-B inhibitörleri ise Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadırlar. MAO-I yani enzimi inaktif hale getiren bileşikler anti-depresif ve anti-parkinson etkiye sahiptir (Binda *et al.* 2004).

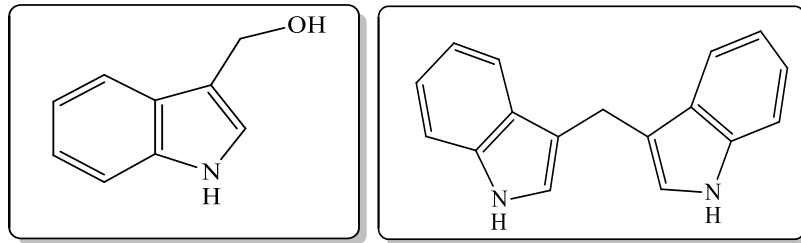
MAO enziminin insan beyinde %80'i MAO-B'dir (Binda *et al.* 2002). Beyinde histaminerjik ve serotonerjik nöronlar MAO-B içerirken, katekolaminerjik nöronlar MAO-A içerir (Naoi *et al.* 2016). Epinefrin, serotonin ve norepinefrini MAO-A seçici olarak okside ederken klorigin tarafından selektif olarak inhibe edilir. Benzilamin ve  $\beta$ -fenetilamini MAO-B oksitler. Ayrıca rasagilin ve selegilin tarafından inhibe edilir (Matos *et al.* 2012; Abdelhafez *et al.* 2013).



**Şekil 5.1.** Rasagilin ve selegilin yapısı

Literatürde MAO enzimleri ile alakalı özellikle inhibisyon çalışmaları fazlaca bulunmaktadır. Yapılan inhibisyon çalışmalarının geniş yelpazede ve özellikle yapı-aktivite ilişkilerinin göz önünde bulundurularak yapılması yeni ilaçların tasarlanabilmesine olanak sağlayacaktır. Genel olarak da pek çok metabolik olaya bilimsel açıdan yaklaşılarak daha iyi anlaşılmasında önemli ölçüde yarar sağlayacaktır.

Bütün bunlar dikkate alındığımızda, tez çalışması kapsamında ilk olarak I3C ve DİM moleküllerinin MAO-A ve MAO-B enzimlerini inhibe etme potansiyellerini araştırıldık. Bu araştırmayı yapmamızda, MAO-A ve MAO-B enzimlerinin nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili olması, bu hastalıkların tedavisinin henüz tam bulunamamış olması ve önleyici ilaçlarında yan etkilerinin ciddi boyutta olması bizi yönlendiren önemli sebeplerdi. İnhibisyon çalışmalarında inhibitör potansiyelini incelediğimiz I3C ve DİM molekülleri özellikle kakule bitkisinde bulunan fitokimyasallardır. Bu moleküllerin doğal kaynaklı olması sebebiyle inhibitör olarak kullanılan ve yan etkisi olan birçok ilaç ve molekülden daha faydalı olacağı muhakkaktır. Bu açıdan yaklaşılarak yaptığımız tez çalışmasının bu ayağında, sonuçlara bakıldığında mikromolar seviyede her iki molekülün her bir enzim için iyi inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi.



**Şekil 5.2.** İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3'-diindolilmetan (DİM) moleküllerinin yapısı

İnhibisyon etkisi gösteren I3C ve DİM molekülleri için Aktivite (%)-[I3C] ve Aktivite(%)-[DİM] grafikleri ayrı ayrı çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Pozitif kontrol olarak klorgilin (MAO-A için) ve selegilin (MAO-B için) molekülleri kullanıldı ve çalışmalar yapıp sonuçlar karşılaştırıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde I3C ve DİM moleküllerinin MAO-A ve MAO-B enzimleri için iyi bir inhibitör potansiyeline sahip olduğu tespit edildi. I3C ve DİM moleküllerinin MAO-A enzimi için IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 19,522 - 20,563 µM olarak hesaplanırken, MAO-B enzimi için ise sırayla 40,057 - 26,653 µM olarak hesaplanmıştır. Çalışma sırasında moleküllerin stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan çözücülerin de, sanki bir inhibitörmüş gibi enzimler üzerine denenerek inhibisyon etkilerinin olup olmadığı çalışmalarla belirlenmiştir. Sayısal verilere çözücülerden gelen interferans bir etki olmaması için inhibitör konsantrasyonu, küvet içeriğinin %1'ini geçmeyecek şekilde gerekli pipetlemeler yapılmıştır. Pozitif kontrollerinde çalışıldığı bu çalışmada, MAO-A enzimi için klorgilin MAO-B enzimi için ise Selegilin standar molekül olarak kullanılmıştır.

**Çizelge 5.1.** MAO-A, MAO-B enzimlerinin I3C ve DİM moleküllerinin IC<sub>50</sub> sonuçları

|              |                   | IC <sub>50</sub> |         |         |
|--------------|-------------------|------------------|---------|---------|
|              | Klorgilin<br>(nM) | Selegili<br>(nM) | I3C(µM) | DİM(µM) |
| <b>MAO-A</b> | 2,869             | -                | 19,521  | 20,563  |
| <b>MAO-B</b> | -                 | 53,000           | 40,057  | 26,653  |

Tez kapsamında yapılan çalışmaların ikinci basamağında ise, I3C ve DİM moleküllerinin AChE, BChE enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Kolinesterazlardan olan AChE beyin, sinir, kan hücrelerinde BChE ise pankreas, karaciğer, merkezi sinir sistemi ve kan serumunda yüksek konsantrasyonda bulunur (Kaplay 1976; Rao *et al.* 2007). AChE enzimi ACh'ni asetat ve koline hidrolizler (Vale 1998; Pope *et al.* 2005). Nörotransmitter olan ACh biyolojik açıdan da önemli bir maddedir (Nacmansohn 1952). Sinirler arası impuls iletimi, kas lifleri ve sinir hücrelerinde biyoelektriksel akım oluşturma gibi görevleri vardır (Wilson and

Nachmansohn 1954; Carlson 1992). Sinapstaki ACh miktarı AChE ve ChAT enzimlerine bağlıdır (Nelson and Cox 2005).

Çalışma sırasında moleküllerin stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan çözücülerin de, sanki bir inhibitörmüş gibi enzimler üzerine denenerek inhibisyon etkilerinin olup olmadığı çalışmalarla belirlenmiştir. Sayısal verilere çözücülerden gelen interferans bir etki olmaması için inhibitör konsantrasyonu, kuvvet içeriğinin %7'yi geçmeyecek şekilde gerekli pipetlemeler yapılmıştır.

AChE'nin en önemli inhibitörlerinden olan OF'lu pestisitler enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsüne kovalent bağlanır ve enzimin katabolizmasını engeller ve inhibisyon oluşur (Dailianis *et al.* 2003). Enzim inhibe olur ve sonuç olarakta sinaps ve nöromuskular boşluklarda ACh artışıyla kolinerjik sistem hata verir (Soreq and Zakut 1993; Hazarika *et al.* 2003; Tuovinen 2004). BChE ise bütirilkolini bütirat ve koline hidrolizler (Kutty *et al.* 1989). Alzheimer hastalığı nörotransmitter azalışıyla özellikle de ACh azalışıyla ilgilidir (David *et al.* 2004).

Beyindeki ACh düzeyindeki azalış bu hastalık için biyokimyasal en büyük belirtisidir (Akincioğlu vd 2013). Alzheimer hastalığının kesin tedavisi yoktur. Şuan kullanılan tedaviler hastalık belirtilerini ortadan kaldırmaya yöneliktir (Göçer vd 2013). Alzheimer hastalığında AChE enzimin yanı sıra BChE enzimi'nin de beyindeki miktarının fazla olduğu saptanmıştır. Bu nedenle AChE inhibitörlerinin BChE inhibitörleriyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Gülçin vd. 2016).

AChE, BChE enzimleri için inhibisyon çalışmaları spektrofotometrik bir metot olan Ellman metodu ile yapılmaktadır (Ellman *et al.* 1961). Tez çalışması kapsamında ticari olarak (Sigma AChE C3389, BChE C4290), temin edilen AChE ve BChE enzimlerini kullanarak I3C ve DİM molekleri ile inhibisyon çalışması yapıldı. Çalışmaların sonucunda doğal kaynaklı fitokimyasallar olan I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon potansiyelleri değerlendirildi. Her bir enzim için beş farklı inhibitör derişiminde, sabit substrat konsantrasyonunda 412 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. I3C ve DİM için Aktivite (%)-[I3C] ve Aktivite (%)-[DİM] grafikleri ayrı ayrı çizildi. Grafiklerden yararlanılarak IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Aynı işlem AChE ve BChE enzimlerinin pozitif kontrolü olarak kullanılan takrin için de tekrarlandı ve grafik çizilip IC<sub>50</sub> değeri hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde moleküllerin enzimler üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu belirlendi ve bununla birlikte inhisyon türü ve K<sub>i</sub> değerlerinin tespiti için çalışmalar sürdürüldü. Üç farklı

inhibitör derişiminde, beş farklı substrat derişimi kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi.  $1/V$  (EU/mL)<sup>-1</sup> ye karşı  $1/[S]$  (nM)<sup>-1</sup> grafikleri çizildi. Bu grafikler ışığında  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi. Sonuçlar pozitif kontrol ile (TACRİN) karşılaştırıldığında Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2. 'de I3C ve DİM'in AChE ve BChE enzimleri için güçlü birer inhibitör olduğu tespit edilmiş oldu.

Sonuçların sayısal verilerine göre; I3C molekülünün AChE enzimi için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri sırası ile 239,295;  $243,528 \pm 33,7$   $\mu$ M iken BChE enzimi için ise sırasıyla 21,515;  $2,785 \pm 0,4$   $\mu$ M olarak hesaplandı. Aynı değerlendirmeler DİM molekülü için yapıldığında ise AChE enzimi için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri sırası ile 95,257;  $67,195 \pm 28,3$   $\mu$ M BChE enzimi için ise sırasıyla 61,545;  $35,529 \pm 2,0$   $\mu$ M olarak hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 5.2' de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** AChE, BChE enzimlerinin I3C ve DİM ile inhibisyon çalışma sonuçlarından elde edilen  $IC_{50}$  ve  $K_i$  ortalama değerleri

| İnhibitör  | AChE                    |                    | BChE                    |                  |
|------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|------------------|
|            | $IC_{50}$<br>( $\mu$ M) | $K_i$ Ortalama     | $IC_{50}$<br>( $\mu$ M) | $K_i$ Ortalama   |
| <br>I3C    | 239,29                  | $243,528 \pm 33,7$ | 21,51                   | $2,784 \pm 0,4$  |
| <br>DIM    | 95,25                   | $67,195 \pm 28,3$  | 61,54                   | $35,529 \pm 2,0$ |
| <br>Takrin | 0,11                    | $6,31E-05$         | 165,78                  | 0,136            |

Yaptığımız inhibisyon çalışmalarının sonuçları incelendiğinde kullandığımız moleküller I3C ve DİM'in farmakolojik çalışmalarda ilaç tasarımında kullanılabilecek potansiyelde moleküller oldukları düşünülmüştür. Alzheimer, Parkinson, Depresyon



gibi nörodejeneratif hastalıkların kesin tedavi yolunun bulunmasında basamak olabilecek niteliktedir.

Yüksek lisans tez kapsamında I3C ve DİM moleküllerinin inhibisyon çalışmaları yanında beş farklı antioksidan yöntemle her iki molekülün antioksidan ve radikal giderme potansiyelleri araştırıldı. Bilindiği üzere bilimsel çalışmalarda antioksidan çalışmalar son yılların popüler çalışma konuları arasında yer almaktadır. Çünkü bir molekül ya da doğal ürünün antioksidan ve radikal giderme özelliğinin bilinmesi, o doğal ürün ya da molekül için önemli bir veridir. İlaç dizayn çalışmalarında tedavi amaçlı kullanılacak doğal ürün ya da molekülün antioksidan özelliği ilacın yan etkilerini en aza indireceğinden tedavinin lehine bir etki gösterecektir. Özellikle demans tedavisinde (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı vs.) kullanılan ilaçların, hastalığı tamamen ortadan kaldıracı özelliklerinin bulunmaması yanında ciddi yan etkilerinin varlığı hasta açısından olumsuz etkiye sebeptir. Bu nedenle tedavilerde kullanılan ilaçların yan etkilerinin minimize edilmesi ilaç dizayn çalışmaları için önemlidir.

Çalışmamızda kullanılan yöntemler ve sonuçları aşağıda verilmiştir.

1.  $\text{Fe}^{3+}$ - $\text{Fe}^{2+}$  indirgeme kapasitesi
2.  $\text{Cu}^{2+}$  - $\text{Cu}^{+}$  indirgeme kapasitesi (Kuprak metodu)
3. FRAP indirgeme kapasitesi
4. ABTS radikali giderme aktivitesi
5. DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesi

Bu antioksidan yöntemlerin her biri için I3C ve DİM moleküllerinden hazırlanan stok çözeltileri ile antioksidan ve radikal giderme potansiyelleri araştırıldı. I3C ve DİM moleküllerinin konsantrasyonları 10, 20 ve 30  $\mu\text{g/mL}$  artan üç ayrı konsantrasyonda çalışılmış olup, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak indirgeme kapasitelerinde, DPPH, ABTS radikal giderme aktivitelerinde konsantrasyona bağlı artış görülmüştür. Yapılan çalışmaların tamamında standart antioksidanlar olarak BHA, BHT, Troloks ve  $\alpha$ -Tokoferol kullanıldı ve sonuçları mukayese edildi. Sonuçların standartlara yakın ya da daha iyi antioksidan etki gösterdiği belirlendi.

Bir molekülün yükseltgenme özelliğinin varlığı, yani karşısındaki molekülü indirgeme kapasitesine sahip olması, o molekülün antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir etkidir (Göçer 2004). Ancak antioksidan moleküller farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabilirler. Şöyle ki, primer antioksidan enzimlerin (katalaz,

süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi) antioksidan özelliği, onların indirgeme güçlerinden veya fenolik bileşik içerdiklerinden değil, hidrojen peroksiti uzaklaştırabilme özelliklerinden kaynaklanır (Halliwell and Gutteridge 1989). Sonuç olarak, antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini indirgeme, peroksitleri parçalama, radikal giderme gibi özelliklerinden dolayı değişik mekanizmalar ile ortaya koyarlar (Diplock 1997; Gülçin 2002; Gülçin 2012). Çalışmamızda yapılan üç ayrı indirme kapasitesi metodu bu anlamda önem taşımaktadır. İ3C ve DİM molekülünün bu üç indirgeme kapasitesi metodu sonuçlarına bakıldığında moleküllerin İ3C ve DİM güçlü indirgeme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışılan indirgeme metotlarından ilki  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  indirgeme kapasitesi metodudur. Kararlı, kısa sürede sonuç alınabilir olması ve düşük maliyet metodun kullanılabilirliğini artırmaktadır. Metot için kullanılan kontrol çözeltisinin rengi sarıdır. İ3C ve DİM ilavesiyle indirgenen ürüne  $Fe^{3+}$  eklenerek çözelti rengi Prussian mavisine dönüşür. Antioksidan aktiviteye sahip numunelerin tüplere eklenmesiyle maddelerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı tonlarda mavi ve yeşil arası renkler elde edilir. 700nm’de en güçlü absorbans ölçümü yapılır. Kompleksin oluşumuna bağlı olarak absorbans ve indirgeme kapasitesi artışı gözlenir. Çalışma sonuçları bu metot için değerlendirildiğinde kullanılan fenolik bileşiklerin standart antioksidanlarla sıralaması İ3C > DİM > BHA > BHT > Troloks >  $\alpha$ -Tokoferol şeklindedir.

Tez kapsamında çalışılan diğer bir indirgeme metodu ise kuprak metodudur. Redoks tepkimesi olan bu metot 6,5 pH’da çalışan kromojenik yapıdır. Düşük maliyetli, hızlı sonuç alınan, kolay uygulanabilir bir metottur. (Apak et al. 2006; Gülçin 2008; Köksal et al. 2009). Etanol ile hazırlanan neokuprin ve  $CuCl_2$  çözeltisi kullanılır. Kuprak metodunun esası kuprik iyonlarını ( $Cu^{+2}$ ) kupröz iyonlarına ( $Cu^{+}$ ) dönüşmesi şeklindedir. Elde edilen kompleks için 450nm’de en güçlü absorbans ölçümü yapılır. Çalışma sonuçları bu metot için değerlendirildiğinde kullanılan fenolik bileşiklerin standart antioksidanlarla sıralaması İ3C > BHA > DİM > BHT > Troloks >  $\alpha$ -Tokoferol şeklindedir.

Çalışılan üçüncü indirgeme metodu FRAP’tır. Ferrik iyonlarının ( $Fe^{+3}$ ) ferröz iyonlarına ( $Fe^{+2}$ ) indirgenmesi esasına dayanır.  $Fe^{3+}$ -TPTZ kompleksi  $Fe^{2+}$ -TPTZ kromojenik kompleksine dönüşür. Bu yöntem düşük maliyetli, kolay ve hızlı uygulanabilir yapıdadır. Düşük pH’da çalışılan bu yöntem için 595nm’de en güçlü

absorbans gözlenir. Çalışma sonuçları bu metot için değerlendirildiğinde I3C > Troloks > BHA >  $\alpha$ -Tokoferol > DİM > BHT > şeklindedir.

I3C ve DİM'in indirgenme kapasitesini tayin etmek için çalışılan her üç metot içinde birbiriyle bağlantılı sonuçlar çıktığı gözlenmiştir. Her üç metotta da artan konsantrasyona bağlı olarak indirgenme kapasitesi artışı ve standart antioksidanlara yakın sonuçlar alınmıştır.

**Çizelge 5.3.** Çalışmada kullanılan I3C ve DİM moleküllerinin 10  $\mu$ g/mL konsantrasyonunda Demir indirgeme, Kuprak ve FRAP indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlarla mukayesesi.

| Antioksidanlar      | $\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$<br>İndirgeme<br>(700nm) | $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{+}$<br>İndirgeme<br>(450nm) | FRAP<br>İndirgeme<br>(593nm) |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------|
| BHA                 | 0,946                                                     | 0,850                                                    | 0,948                        |
| BHT                 | 0,743                                                     | 0,464                                                    | 0,495                        |
| $\alpha$ -Tokoferol | 0,331                                                     | 0,197                                                    | 0,633                        |
| Troloks             | 0,628                                                     | 0,374                                                    | 1,228                        |
| I3C                 | 3,590                                                     | 1,784                                                    | 1,340                        |
| DİM                 | 1,131                                                     | 0,722                                                    | 0,581                        |

Antioksidanlar radikal giderme aktivitesi yaparak serbest radikallerin farmasötik üretimlerde, gıda ve biyolojik sistemlerde olumsuz etkilerini azaltma ve giderme yönünde oldukça etkilidirler. Antioksidanların olmadığı yerlerde serbest radikaller meydana gelip lipit peroksidasyonunu hızlandırır ve hasara neden olur (Min 1998). DPPH $\cdot$  ve ABTS $^{+\cdot}$  gibi radikal giderici metotlar gıda, bitkisel ekstraktlar ve saf maddelerin antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan spektrofotometrik yöntemlerdir. Kolay uygulanabilir, hızlı ve hassas sonuç alınabilen bu kromojenik metotlar sıkça tercih edilir (Awika *et al.* 2003; Van den Berg *et al.* 2000; Yu *et al.* 2002). Yeşil-mavi renkli ABTS $^{+\cdot}$  ve menekşe renkli DPPH $\cdot$  kromojenleri birçok numuneyle aynı anda çalışma kolaylığı sunduğu gibi duyarlılığı yüksek metotlardır (Awika *et al.* 2003) ABTS $^{+\cdot}$  ve DPPH $\cdot$  radikallerine antioksidan maddeler ilave edildiğinde reaktifler indirgenerek renksizleşme meydana gelir.

ABTS $^{+\cdot}$  radikal giderme metodu sulu karışımlarda, saf maddelerde, ekstrakt ve içeceklerde sıkça tercih edilmektedir (Miller 1996; Gülçin 2006b). Kolay

uygulanabilir, kısa sürede sonuç alınan, tekrarlanabilir nitelikte ve seçici bir metottur (Özcelik *et al.* 2003). ABTS radikali oluşturmak için  $K_2S_2O_8$  (persülfat) ve  $Mn_2O_3$  (mangan oksit) oksidan maddeleri kullanılır. ABTS' den  $K_2S_2O_8$  ve  $Mn_2O_3$  oksidanları kullanılarak mavi yeşil renkli  $ABTS^{++}$  oluşturulur. Radikalin en güçlü absorbansı 734 nm'de ölçülür. ABTS radikallerini giderme tayininde de I3C ve DİM  $IC_{50}$  değeri 4,95-5,33 $\mu$ g/mL olduğu bulunmuştur.

DPPH radikal giderme metodu ise, radikal giderme metotlarından en sık kullanılanıdır (Özcelik *et al.* 2003). Yöntemin esası hidrojen veren grup barındıran antioksidan yapıdaki maddeler ile etil alkolde çözünen DPPH $\cdot$  radikallerinin indirgenmesi şeklindedir. İndirgenmiş ve radikal hali DPPH-H olan moleküller 517nm'de absorbans vermezler. Bu sayede geride kalan DPPH $\cdot$  radikalleri ile 517nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılarak aktivite tayini yapılır (Gülçin 2002). DPPH radikallerini giderme tayininde de I3C ve DİM  $IC_{50}$  değeri 34,65-69,3  $\mu$ g/mL olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 5.4.** I3C ve DİM ve standart antioksidanlara ait DPPH $\cdot$  ve  $ABTS^{++}$ radikal giderme aktiviteleri sonucu hesaplanan  $IC_{50}$  ( $\mu$ g/mL) ve  $R^2$  değerleri

|                                      | DPPH $\cdot$ Giderme |       | ABTS $^{++}$ Giderme |       |
|--------------------------------------|----------------------|-------|----------------------|-------|
|                                      | $IC_{50}$            | $R^2$ | $IC_{50}$            | $R^2$ |
| <b>BHA</b>                           | 11,35                | 0,995 | 5,33                 | 0,875 |
| <b>BHT</b>                           | 34,65                | 0,962 | 5,77                 | 0,860 |
| <b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b> | 13,86                | 0,946 | 4,07                 | 0,986 |
| <b>Troloks</b>                       | 9,90                 | 0,948 | 5,33                 | 0,865 |
| <b>I3C</b>                           | 34,65                | 0,890 | 4,95                 | 0,855 |
| <b>DİM</b>                           | 69,30                | 0,891 | 5,33                 | 0,864 |

Her iki metot için sonuçlar standart antioksidanlarla kıyaslandığında neredeyse aynı ya da daha güçlü antioksidan kapasiteye sahip oldukları görülmüştür. Sonuçlar Çizelge 5.4.'de verilmiştir.

Tez çalışmasının devamında yapılan çalışmaların tutarlılığını desteklemek için moleküler docking çalışmaları da yapılmıştır. Moleküler docking yaklaşımı, hedef

proteinlerin bağlanma bölgesindeki küçük moleküllerin davranışlarını karakterize etmemize ve aynı zamanda temel biyokimyasal süreçleri aydınlatmamıza izin veren küçük bir molekül ve bir protein arasındaki etkileşimi atomik düzeyde modellemek için kullanılır. Docking işlemi iki temel adımı içerir: ligand konformasyonunun tahmini ve bunun yanı sıra bu bölgeler içindeki pozisyonu ve yönlendirmesi (genellikle poz olarak adlandırılır) ve bağlanma afinitesinin değerlendirilmesi.

Docking çalışmaları için AChE (PDB kodu: 4TVK), BChE (PDB kodu: 5NN0), MAO-A (PDB kodu: 2Z5X) ve MAO-B (PDB kodu: 2V60) enzimleri PDB'den temin edilerek yöntem kısmında anlatıldığı şekliyle hazırlandı ve docking işlemleri için kullanıldı. I3C ve DİM ligandları yine Schrödinger paket programında bulunan LigPrep programı kullanılarak 3 boyutlu yapıları ve doğru konformasyonları ayarlanarak docking işlemleri için hazır hale getirildi. AChE enzimi için yapılan docking çalışmalarının sonuçları I3C ve DİM moleküllerinin enzimin aktif merkezinde benzer aminoasit rezidüleriyle etkileştiğini göstermektedir. Aktif merkezde bulunan PHE330 ve TRP84 aminoasitleriyle iki bileşiğin de  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi yaptığı görülmektedir şekil 4.20. Docking skorları ve diğer etkileşimler gözönüne alındığında DİM molekülünün enzimin aktif merkeziyle daha iyi etkileştiği görülmektedir çizelge 4.6. I3C bileşiği için AChE enziminin aktif bölgesinde bulunan HIS440 rezidüsü ile hidrojen bağı yaparken, DİM molekülü TYR334 rezidüsü ile hidrojen bağı yapmıştır. Bu iki aminoasitin enzimin inhibisyonunda kilit bir öneme sahip olduğu sonucu çıkarılabilir. BChE enzimi için yapılan docking çalışmalarının sonuçlarından I3C ve DİM moleküllerinin enzimin aktif merkezinde benzer aminoasit rezidüleriyle etkileştiği görülmektedir. İki bileşik de TRP82 aminoasidiyle  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi yaparken, yine HIS438 amino asidiyle de H-bağı yapmışlardır. BChE inhibisyonunda bu aminoasitlerin önemli rol oynadıkları açıktır. Docking skorları, Van der Waals etkileşimleri ve diğer etkileşimler gözönüne alındığında BChE enzimiyle DİM molekülünün I3C molekülünden daha iyi etkileştiği ve enzimin katalitik olarak aktif bölgesine daha iyi yerleştiği söylenebilir. İnsan MAO-A enzimi için yapılan docking çalışmalarının sonuçlarına göre her iki molekül de TYR407 ve TYR444 rezidüleriyle  $\pi$ - $\pi$  etkileşimi yapmışlardır. I3C bileşiği TYR69 ve GLN215 aminoasitleriyle H-bağı yaparken DİM bileşiği TYR69 ve ASN181 aminoasitleriyle H-bağı yapmıştır. I3C bileşiği ALA68, TYR69, VAL70, TYR407, MET445, TYR444 ve PHE352 hidrofobik rezidüleri dahil toplam 12 aminoasit ile etkileşirken, DİM molekülü insan MAO-A

enziminin aktif merkezinde 19 aminoasit ile etkileşmiştir (Şekil 4.22). Yine skorlar ve etkileşim enerjileri gözönüne alındığında MAO-A enzimiyle DİM molekülünün I3C molekülünden daha iyi etkileştiği görülmektedir. MAO-B enzimi için yapılan docking çalışmalarının sonuçlarından I3C ve DİM moleküllerinin enzimin aktif merkezinde yine benzer aminoasit rezidüleriyle etkileştiği görülmektedir. I3C molekülü ILE199 ve TYR326 aminoasitleriyle H-bağı yaparken DİM molekülü TYR326 aminoasitiyle H-bağı yapmıştır. I3C molekülü enzimle herhangi bir  $\pi$ - $\pi$  etkileşiminde bulunmazken DİM molekülü TYR326 amino asitiyle  $\pi$ - $\pi$  etkileşiminde bulunmuştur. İnhibitörlerle yaptığı etkileşimler düşünüldüğünde MAO-B enziminin inhibisyonunda TYR326 aminoasitinin çok önemli bir rol üstlendiği açıkça görülmektedir. Her iki molekülün de enzimin hidrofobik bölgesiyle etkileştiği Şekil 4.23'den görülmektedir. Diğer bütün enzimlerde olduğu gibi yine skorlar ve etkileşim enerjilerinin değerleri düşünüldüğünde DİM molekülünün I3C molekülünden MAO-B enzimiyle daha iyi etkileştiği ve katalitik merkeze daha iyi yerleştiği sonucu çıkarılabilir.

Sonuç olarak, I3C ve DİM moleküllerinin AChE, BChE, MAO-A ve MAO-B enzimleriyle yapılan docking çalışmalarının sonuçları moleküllerin teorik olarak bahsi geçen enzimler için iyi birer inhibitör oldukları sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Yapılan docking çalışmaları sonucunun deneysel sonuçlarla büyük oranda örtüştüğü görülmüştür.

## KAYNAKÇA

- Abdelhafez, O. M., Amin, K. M., Ali, H. I., Abdalla, M. M., and Batran, R. Z. 2013. Monoamine oxidase A and B inhibiting effect and molecular modeling of some synthesized coumarin derivatives. *Neurochemistry International*, 62(2), 198-209.
- Akkuş, İ. 1995. Serbest oksijen radikalleri ve fizyopatolojik etkileri. *Mimosa Basım Yayın ve Dağıtım*, Konya, 1-15.
- Allam, A. R., Sridhar, G. R. and Das, U. N. 2007. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypothesis*, 69, 1272-1276.
- Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 11(3), 332-384.
- Aruoma, O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 32, 671-683.
- Aydın, H., 2011. Bazı baharatların farklı ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Aynacı, E. 2009. (Aminometil) polistirene takılı Schiff bazı ve O'nun Ni(II) kompleksinin sentezi, karakterizasyonu ve  $\beta$ -galaktosidaz enziminin immobilizasyon özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Baytop, T. 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
- Binbay, T., Alptekin, K., Elbi, H., Zağlı, N., Drukker, M., Tanık, F. A., and Van Os, J. 2012. Lifetime Prevalence and Correlates of Schizophrenia and Disorders with Psychotic Symptoms in the General Population of Izmir, Turkey. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 23(3), 1-11.
- Binda, C., Newton-Vinson, P., Hubalek, F., Li, M., Edmondson, D.E. and Mattevi, A. 2002. Structure of Human Monoamine Oxidase B, a Drug Target for the Treatment of Neurological Disorders, *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 22-26.
- Bonnesen, C., Eggleston, I. M., and Hayes, J. D. 2001. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer research*, 61(16), 6120-6130.
- Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., and Del Tredici, K. 2006. Gastric  $\alpha$ -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters*, 396(1), 67-72.
- Broadbent, T. A., and Broadbent, H. S. 1998. The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl) indole.[Part I]. *Current Medicinal Chemistry*, 5, 469-491.
- Bcheanan, R.W., Carpenter, W.T. 2000. izofreni ve diğer psikotik bozukluklar, izofreni kavramı. Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry, VIII. Basım, Sadock BJ, Sadock VA (Ed.), Lippincott, Williams & Wilkins, 1329-1345.

- Carlberg, I., and Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in enzymology*, Academic Press, 113, 484-490.
- Cassani, R., Estarellas, M., San-Martin, R., Fraga, F. J., and Falk, T. H. “Systematic review on resting-state EEG for Alzheimer’s disease diagnosis and progression assessment,” *Disease Markers*, vol. 2018, Oct. 2018, Art. no. 5174815
- Castaner A, Roig E, Serra A, De Flores T, Magrina J, Azqueta M, Sanz G and Betriu A. 1990. Risk stratification and prognosis of patients with recent onset angina. *Eur Heart J*, 11, 868–875.
- Chatonnet, A. and Lockridge, O. 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal.*, 260, 625-634.
- Chaurasiya, N.D. Ganesan, S. Nanayakkara, N.P.D. Dias, L.R.S. 2012. Walker, L.A. and Tekwani, B.L.: Inhibition of human monoamine oxidase A and B by 5-phenoxy 8-aminoquinoline analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 22, 1701-1704.
- Chen, C., Pearson, A. M. and Gray J. I. 1992. Effects of Synthetic Antioxidants (BHA, BHT and PG) on The Mutagenicity of IQ-Like Compounds. *Food Chem.*, 43, 177– 183.
- Çokuğraş, N. 2003. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry.*, 28 (2), 54-61
- Çöllü, Z.2007. *Urtica Pilulifera L. Bitkisinin Antioksidant Aktivitesinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.*
- Çubukçu, B., Meriçli A.H., Mat, A. Sarıyar G, Sütülpınar, N.ve Meriçli F. 2002. *Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.*
- Darley-Usmar V, Halliwell B. 1995. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters.*, 369: 131-135.
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., and Mattevi, A. 2005. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12684-12689.
- De Lau, L. M., and Breteler, M. M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525-535.
- Devlin, T.M., 2002. *Textbok of Biochemistry with clinical correlations*. Kanada.
- Edin, K. Fida-Lassang, N. and Schmaltz, L. 2010. Determination of Butylated Hydroxytoluene in Chewing Gum Using GC-MS. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 1, 14-18.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). 2011. Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(10), 2392.
- EFSA. 2012. Scientific Opinion on The Re-Evaluation of Butylated Hydroxytoluene BHT (E 321) as A Food Additive. *Efsa. Journal.*, 10, 2588.
- Eken, S. 2007. *Bazı Materyallerde Antioksidan Tayinleri. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen BilimLeri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.*
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Robert, M. 1961. Featherstone. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Eröztürk, N. 2000. *Bir Yudum Sağlık. Anahtar Yayınları, İstanbul,*
- Ertuğrul, A. 2010. *Şizofreninin Nörobiyolojisi. Yüksel N. (ed.) Temel Psikofarmakoloji. 1. Baskı. Ankara.*



- Eskidere, Ö. 2012. Ses Ölçümlerinden Parkinson Hastalığının Teşhisi İçin Öznelik Seçme Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Sigma*, 20, 402-414.
- Fahn, S. R. L. E. 1987. Unified Parkinson's disease rating scale. Recent development in Parkinson's disease.
- Fırat, S. 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya AB Dalı, Uzm. Tezi, Ankara,
- Fischer, E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. II. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 27(3), 3479-3483.
- Fisher, A. 2008. Cholinergic treatments with emphasis on m1muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 5 (3): 433-442.
- Fortinash, M. K. and Holoday, A. P. 1995. Person With Cronic Mental Illness, *Psychiatric Mental Health Nursing*, Mosby Year Book, Missoure, 685-709.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry.*, 64 (97)-112.
- Gaynes, BN. Identifying difficult-to-treat depression: differential diagnosis, subtypes, and comorbidities. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2009, 70 Suppl 6: 10-15.
- Gaweska, H. And Fitzpatrick, P. F. 2011. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *Biomolecular concepts*, 2, (5), 365-377.
- Göçer, H.ve Gülçin, İ. 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. doi:10.3109/09637486.2011.585963
- Gözükara, E.M., 2011. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Guillermo, M., Noga, G. Eran, P. and Franciskos C. 2015. Neurodegeneration and Alzheimer's disease (AD). What Can Proteomics Tell Us About the Alzheimer's Brain?. *Mol Cell Proteomics*, 15 (29), 409- 425.
- Güçlü, K., Apak, R. and Özyürek, M. 2009. Hidroksil ve Süperoksit Radikallerinin Süpürülmesine Dayalı Yeni Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Tübitak Projesi.
- Gülçin, İ. 2007. Comparison of Invitro Antioxidant and Antiradical Activities of L-Tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- Güven, A., 2000. Asetilkolinesterazın önemi ve inhibitörleri. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Dergisi*, 6 (1): 145-151.
- Häfner, H., an der Heiden, W., Behrens, S., Gattaz, W. F., Hambrecht, M., Löffler, W., and Stein, A. 1998. Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 24(1), 99-113.
- Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford University Press, New York.
- Halliwell, B.1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*. 42(4), 569 - 605.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M. and Malik, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: A biochemical interaction study. *Toxicology*, 185, 1-8.
- Hermes-Lima, M., and Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 133(4), 537-556.
- Houmani, N., Vialatte, F., Gallego-Jutglà, E. and Dreyfus, G. 2018. Diagnosis of Alzheimer's. disease with Electroencephalography in a differential framework. Plos One,13(3).
- Işık, E.1997. Şizofreni, Kent matbaacılık, 2. Baskı, Ankara.
- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 79(4), 368-376.
- Jankovic, J., and Tolosa, E. (Eds.). 2007. Parkinson's disease and movement disorders. Lippincott Williams & Wilkins.
- JM, M. 1969. Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) Journal of Biological Chemistry., 244, 6049-6055.
- Kadayıfçı, A., Karaaslan, Y., ve Köroğlu, E. 1998. Pratisyen Hekimin El Kitabı Hekimler Yayın Birliği.
- Kalaycıoğlu, L.,Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N. ve Tiftik, A. M., 2013. Biyokimya. Nobel Yayınevi, Ankara.
- Kaplan, B. J. 2016. Kaplan and sadock's synopsis of psychiatry. Behavioral sciences/clinical psychiatry. Tijdschrift voor Psychiatrie, 58(1), 78-79.
- Kaplay S.S., 1976. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain. Biol Neonate, 28(1-2), 65-73.
- Kara, B., 2009. Aldoz redüktaz,  $\alpha$ -Amilaz, Monoamin Oksidaz Ve Ksantin Oksidaz Enzimlerinin İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Karataş, Y., 2005. Parkinson Hastalığının Tedavisi. Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences, 1(44), 67-75.
- Kasapçopur Özel, G.S. ve Birdane, Y.O., "Antioksidanlar ", Kocatepe Veteriner Dergisi 7(2), 41-52, 2014.
- Kayaalp, O. 2005. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (Hacettepe-TAŞ 9. baskı. Cilt, 2, 1252-1264.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum. Kesim, MD., Sigara ve Gebelik. Şişli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni, 38(2), 7-14.
- Kimura N. 2016. Diabetes Mellitus Induces Alzheimer's Disease Pathology: Histopathological Evidence from Animal Models. International Journal of Molecular Sciences.17(4), 503.
- Klouché, K., Morena, M., Canaud, B., Descomps, B., Beraud, J. J., And Cristol, J. P. 2004. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. European Journal of Clinical Investigation, 34(9), 619-625.
- Koch, OR., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S. And Galeotti T. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. Mol Aspects Med, 25, 191-198.
- Koshland Jr, D. E. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 44(2), 98.
- Köse, L. P. 2016. Bazı Doğal Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi, AChE ve BChE Enzimleri ile hCA I ve hCA II İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Aratılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Krinsky, N. I. 1992. Mechanism of Action of Biological Antioxidants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 200, 248-254.

- Krishna, V.R., Krishna, K.B.M. And Babu, B.H., 2014. Development and validation of liquid chromatographic method for the simultaneous estimation of Levodopa, Carbidopa and Entacapone in the combined dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, 8(3), 281-288.
- Layer, P. G., Allebrandt, K., Andermann, P., Bodur, E., Boopathy, R. Bytyqi, A. and H., Paraoanu, L. E. 2005. On the multifunctionality of cholinesterases. *Chem.- Biol. Interact.*, 37 (41), 157-158.
- Lee, S. Sivakumar, K. Shin, W.-S. Xie, F. and Wang, Q. 2006. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives, *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 16, 4596-4599.
- Lieb R, Isensee B, Hofler M, Pfister H, Wittchen HU. Parental major depression and the risk of depression and other mental disorders in offspring: a prospectivelongitudinal community study. *Archives of General Psychiatry*, 2002, 59: 365-374.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X. And Chen, S. 2016. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374.
- Lotti, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin. Chem.*, 41, 1814-1818.
- Marzatico, F., and Cafe, C. 1993. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional Neurology*, 8(1), 51-66.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. and Vallette, F.M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.
- Matos, M. J., Viña, D., Vazquez-Rodriguez, S., Uriarte, E. and Santana, L. (2012) Focusing on New Monoamine Oxidase Inhibitors: Differently Substituted Coumarins As An Interesting Scaffold. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2210-2239.
- Mercan, U. 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.
- Michnovicz, J. J. and Bradlow, H. L. 1990. Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(11), 947-949.
- Naoui, M., Riederer, P. and Maruyama, W. 2016. Modulation of monoamine oxidase (MAO) expression in neuropsychiatric disorders: genetic and environmental factors involved in type A MAO expression. *Journal of Neural Transmission*, 123(2), 91-106.
- Nawaz, H., Shi J., Mittal G.S. and Kakuda Y. 2006. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration, *Separation and Purification Technology* 48, 176–181.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2013. *Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık, Ankara
- Oakeshott, J. G., Van Papenrecht, E. A., Boyce T. M., Healy, M. J. and Russell, R. J. 1993. Evolutionary Genetics of *Drosophila* Esterases. *Genetica*, 90, 239-268.
- Oddo S. 2008. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 12(2), 363-73.
- Onat, T., 1996. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. *Temel Biyokimya* İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, 865-8797.

- Öztürk, O. 1994. Şizofreni, Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. Ankara Nürol Matbaacılık, 165-197.
- Percival, M. 1998. Anti-oxidants. Clin Nutr Insight, 31, 1-4.
- Pinchuk, I., and Lichtenberg, D. 2002. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. Progress in Lipid Research, 41(4), 279-314.
- Pohanka, M. 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia, 155(3), 219-229.
- Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M. and Prina, M. 2014. World Alzheimer Report, Dementia and Risk Reduction an Analysis of Protective and Modifiable Factors.
- Qizilbash, N., Whitehead, A., Higgins, J., Wilcock, G., Schneider, L., Farlow, M., and Dementia Trialists' Collaboration. 1998. Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials. Journal of the American Medical Association., 280(20), 1777-1782.
- Rao, A.A., Sridhar, G.R., and Das, U.N. 2007. Elevated butyrylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. Medical Hypotheses, 69(6), 1272-1276.
- Riby, J. E., Feng, C., Chang, Y. C., Schaldach, C. M., Firestone, G. L., and Bjeldanes, L. F. 2000. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. Biochemistry, 39(5), 910-918.
- Sadock, B. J., and VA, S. 2005. Kaplan & Sadoc Klinik Psikiyatri. Ankara: Güneş Kitabevi, 174-210.
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., and McGrath, J. 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. PLoS Med, 2(5), 141.
- Sarkar, F. H., and Li, Y. 2004. Indole-3-carbinol and prostate cancer. The Journal of Nutrition, 134 (12), 3493-3498.
- Savaş, A., Akbostancı, C. ve Kanpolat, Y., 2008. Parkinson Hastalığının Cerrahi Tedavisi. Türkiye Klinikleri J Neurosurg-Special Topics, 1(2), 5-12.
- Scandalios, J.G., 2002, The rise of ROS, Trends in Biochemical Sciences, 27(9), 483- 486.
- Serafini, M., and Del Rio, D. 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. Redox Report, 9(3), 145-152.
- Setiawan, S. 2020. Perbedaan Koenzim Dan Kofaktor Dalam Biologi.
- Shahidi, F., Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications, The American Oil Chemists Society Press, Champaign, Illinois 1997.
- Shampo, M. A., Kyle, R. A., and Steensma, D. P. 2013. Alois Alzheimer–Alzheimer Disease. In Mayo Clinic Proceedings. 88(12), 155.
- Soreq, H. and Zakut, H., 1993. Human acetylcholinesterases and anticholinesterases. The American Society of Human Genetics, 55, 593-594.
- Sousa, C., Moita, E., Valentão, P., Fernandes, F., Monteiro, P. and Andrade, P. 2015. Effects of Colored and Noncolored Phenolics of Echium Plantagineum L. Bee Pollen in Caco-2 Cells under Oxidative Stress Induced by tert-butyl Hydroperoxide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 2083–2091.
- Şahin, M. V. 1999. Şizofreni: Klinik Özellikler, Tanı, Ayırıcı Tanı. Psikiyatri Dünyası 3, 72-78.

- Şahin, M. V. 1999. Şizofreni: klinik özellikler, tanı, ayırıcı tanı. *Psikiyatri Dünyası*, 3, 72-78.
- Tan, E.K. and Jankovic, J. 2006. Genetic testing in Parkinson disease: promises and pitfalls. *Arch Neurol* 63, 1232–1237.
- Taysi, S., Gul, M., Sari, R.A., Akcay, F. ve Bakan, N. 2002. Serum oxidant/antioxidant status in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med*, 40, 684- 688.
- Temel, H. E. 2008. Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir.
- Tipton, K. F., O’Sullivan, J. and Youdim, M. B. 2004. Monoamine oxidase (MAO): functions in the central nervous system. *Encyclopedia of neuroscience*, 3rd edn. Elsevier, Amsterdam
- Torun, Ş., Uysal, M., Gücüyener, D. ve Özdemir, G. 1995. Parkinson’s disease in Eskişehir, Turkey, 2, 44-45.
- Tuna, S., 2007. Orta Anadolu süne, *Eurygaster maura* (Heteroptera: Scutellaridae) populasyonlarındaki esterase ve süperoksit dismutaz enzimlerinin elektroforetik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Tuovinen, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neurotoxicological damages. *Toxicology*, 196, 31–39.
- Türk Gıda Kodeksi. 2011. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete.
- Tüzün, S., Çiftçili, S. ve Uzun, A. 2010. Tremor II: Ayırıcı tanıda Parkinson. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 14(1), 26-31.
- Tysoe, C., Whittaker, J., Cairns, N. J., Atkinson, P. F., Harrington, C. R., Xuereb, J. and Rubinsztein, D. C. 1997. Presenilin-1 intron 8 polymorphism is not associated with autopsy-confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 222(1), 68-69.
- Uysal, M. 1998. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidanantioksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11, 336-340.
- Varcarolis, E.M.1998. The Several and Persistently Mentally III, Foundations of Psychiatric Mental Health Nursing, Saunders Company, New York, 837–850.
- Venkatesh, R. and Sood, D. 2011. A Review of The Physiological Implications of Antioxidants in Food. Interactive Qualifying Project Report, Worcester Polytechnic Institute.
- Wanasundara, P. K. and Shahidi, F. 2005. Antioxidants: Science, Technology and Applications. Shahidi F. Bailey’s Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. Wiley-Interscience.
- Wang X., Liang Y., Peng C., Xie H., Pan M., Zhang T. and Ito Y. 2011. Preparative isolation and purification of chemical constituents of Belamcanda by mplc, hsccl, and prep-hplc. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 34 (4), 241-257.
- Wang, T. T., Schoene, N. W., Milner, J. A. and Kim, Y. S. 2012. Broccoli-derived phytochemicals indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: Comparison with other cancer preventive phytochemicals. *Molecular Carcinogenesis*, 51(3), 244-256.

- Wells, J. C., Keyl, P. M., Chase, G. A., Aboraya, A., Folstein, M. F., and Anthony, J. C. 1992. Discriminant validity of a reduced set of Mini-Mental State Examination items for dementia and Alzheimer's disease. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 86(1), 23-31.
- Weyler, W., Hsu, Y.-P. and P., Breakefield, X. O. 1990. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacology & Therapeutics*, 47, 391-417.
- Xi, J., He, L., and Yan, L. 2017. Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge. *Food Chemistry*, 230, 354-361.
- Yalçın, A.S. 1992. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, 4, 40-43.
- Yaltkaya, K., Balkan, S. ve Oğuz, Y. 1998. "Nöroloji Ders Notları", 3. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Yavaşer, R. 2011. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın.
- Youdim, M. B., and Riederer, P. F. 2004. A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology*, 63(7 suppl 2), S32-S35.
- Young, I.S., and Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Silifke’de doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2008-2012 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2017 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Hala yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

