

**KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN
İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN BU İZOENZİMLER
ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Deniz NEZİR

Eskişehir 2018

**KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN
İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN BU İZOENZİMLER
ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz NEZİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Aralık 2018

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Deniz NEZİR'in "KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN BU İZOENZİMLER ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezi 14/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR	
Üye	: Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVOĞLU	
Üye	: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN BU İZOENZİMLER ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Deniz NEZİR

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2018

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Tez kapsamında çok sayıda fenolik bileşik içeren bitkilerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra insan karbonik anhidraz I ve II (hCA I ve II) izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bitkilerin içeriğinde LC-MS/MS yöntemiyle tespit edilen etken maddelerin hCA I ve II izoenzimleri ile etkileşimini gösteren moleküler docking çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla, *in vitro* çalışmalar için insan eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimleri Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile sırasıyla, %59,98 ve %64,86 verimle yaklaşık 226,56 ve 614,67 kat saflaştırılmıştır. İzoenzimlerin spesifik aktiviteleri sırasıyla, 5220 ve 14162 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiştir. Sonuçlardan elde edilen %Aktivite - [İnhibitör] grafiklerine bakıldığında, hCA I ve hCA II CO₂-hidrataz aktivitesi üzerine *Equisetum arvense*, *Origanum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* ve *Hypericum perforatum* bitkilerinin su ve etanol ekstralarının inhibisyon etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bitki konsantrasyonları µg/mL olarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değerlerinin %Aktivite - [İnhibitör] grafiklerinden hCA I ve hCA II için 24,64 ile 86,25 µg/mL aralığında olduğu gözlenmiştir.

Bu bitkilerin su ve etanol ekstralarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için; demir indirgeme, FRAP, CUPRAC, süperoksit anyon radikali giderme, DPPH, ABTS, Bipiridil, DMPD, toplam fenol miktarı ve total antioksidan aktivite metodları kullanıldı. Çalışmada kullanılan bitki ekstralarının sitotoksisiteleri Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT) ile belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Karbonik anhidraz, enzim saflaştırma, inhibisyon, docking, antioksidan aktivite, MTT

ABSTRACT

PURIFICATION OF CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES FROM HUMAN ERYTHROCYTES AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PLANT EXTRACTS ON THESE ISOENZYMES

Deniz NEZİR

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2018

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

In this thesis, apart from the antioxidant properties of phenolic compounds in plant, inhibition effects on human carbonic anhydrase I and II (hCA I and II) isoenzymes was also investigated with *in vitro* studies. In addition, interaction of active compounds with hCA I and II isoenzymes was studied using docking methodology. Additionally, the compounds were characterized with LC-MS/MS system.

For this purpose, hCA I and hCA II isoenzymes, found in human erythrocyte, were purified using Sepharose 4B-L-tyrosine- sulphanilamide affinity chromatography with 59.98% and 64.86% efficiency (nearly 226.56 and 614.67 times), respectively. Specific activities of isoenzymes were calculated as 5220 EU/mg protein for hCA I and 14162 EU/mg protein for hCA II. Purity of enzymes was tested using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). According to results obtained from %Activity-[Inhibitor] graphics, inhibition activities of water and ethanol extracts of *Equisetum arvense*, *Origanum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* and *Hypericum perforatum* on hCA I ve hCA II CO₂-hydratase were observed. Concentration of plants were calculated as µg/ml. IC₅₀ values were obtained at the range of 24.64 and 86.25 µg/mL from %Activity-[Inhibitor] graphs.

Antioxidant activities of water and ethanol extracts were evaluated using Ferrous ions Reducing Capacity, FRAP, CUPRAC, superoxide anion radical scavenging assay, DPPH, ABTS, Bipyridyl, DMPD, total phenolic contents and total antioxidant activity methods. Also, cytotoxicity of plant extracts was investigated with Mitochondrial Activity Test (MTT).

Keywords: Carbonic anhydrase, enzyme purification, inhibition, docking, antioxidant activity, MTT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın her aşamasında yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Yüksek lisansa başladığım günden beri bütün çalışmaları beraber yürüttüğüm, tez çalışmalarında en az benim kadar emeği geçen ve her an yanımda olup bana destek olan değerli dostum Uzm. Kimyager Oya BÜYÜKEMİR'e,

Çalışmama katkılarını ve emeklerini sunan, bizleri her zaman güler yüzüyle karşılayan değerli Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Zerrin SELLER'e,

Hücre kültürü çalışmalarını birlikte yürüttüğüm hocam Sayın Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye ve değerli dostum Biyolog Mehmet Onur AKSOY'a,

Çalışmamda desteklerini aldığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ, Prof. Dr. Betül DEMİRCİ, Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE, Doç. Dr. Nafiz Öncü CAN, Doç. Dr. Mehlika Dilek ALTINTOP ve Dr. Öğr. Gör. Cüneyt TÜRKEŞ'e,

Çalışmamın diğer kısımlarında büyük yardımları dokunan değerli arkadaşlarım, Dr. Öğr. Gör. Hülya Tuba KIYAN, Arş. Gör. Belgin SEVER, Dr. Yeliz DEMİR, Uzm. Kimyager Murat KOZANLI, Uzm. Biyolog Şennur GÖRGÜLÜ, Uzm. Biyolog Emre ODUNCU, Uzm. Biyolog Arda SEVER, Ecz. Asaf Evrim EVREN ve Ecz. Aysun GEVEN'e,

Tez çalışmalarım boyunca hem makine teçhizat hem de sarf malzemesi ihtiyaçları için destek aldığım 1610S681 no'lu BAP projesine,

Hayatım boyunca hiçbir fedakârlığı esirgemeyen, her zaman desteklerini hissettiğim annem Zeliha NEZİRİ, babam Eran NEZİRİ ve biricik kardeşim Tansu NEZİRİ'ye teşekkür ederim.

14/12/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Deniz NEZİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzim aktivitesine etki eden faktörler	3
1.1.2. Enzim inhibisyonu	3
1.2. Karbonik Anhidraz.....	6
1.2.1. CA I	10
1.2.1.1. <i>CA I inhibitörleri</i>	12
1.2.1.2. <i>CA I aktivatörleri</i>	14
1.2.2. CA II.....	15
1.2.2.1. <i>CA II inhibitörleri</i>	18
1.2.2.2. <i>Antiglukom ajanlar</i>	20
1.2.2.3. <i>CA II aktivatörleri</i>	24
1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	25
1.3.1. Serbest radikaller ve ROS oluşumu	27
1.3.2. Bazı reaktif oksijen türleri ve özellikleri.....	29
1.4. Antioksidanlar	33
1.4.1. Hücrel antioksidan enzim sistemleri.....	34

1.4.2. Bitkilerin doğal antioksidanları.....	36
1.5. Bitkiler.....	41
1.5.1. Tarla atkuyruğu (<i>Equisetum arvense</i>)	42
1.5.1.1. Bilimsel sınıflandırma	42
1.5.1.2. Genel özellikleri	42
1.5.1.3. Toplanması ve kurutulması.....	43
1.5.2. Keklik otu (<i>Origanum vulgare</i>)	43
1.5.2.1. Bilimsel sınıflandırma	43
1.5.2.2. Genel özellikleri	44
1.5.2.3. Toplanması ve kurutulması.....	44
1.5.3. Civanperçemi (<i>Achillea millefolium</i>)	45
1.5.3.1. Bilimsel sınıflandırma	45
1.5.3.2. Genel özellikleri	45
1.5.3.3. Toplanması ve kurutulması.....	46
1.5.4. Pelin otu (<i>Artemisia absinthium</i>)	46
1.5.4.1. Bilimsel sınıflandırma	46
1.5.4.2. Genel özellikleri	47
1.5.4.3. Toplanması ve kurutulması.....	47
1.5.5. Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)	47
1.5.5.1. Bilimsel sınıflandırma	47
1.5.5.2. Genel özellikleri	48
1.5.5.3. Toplanması ve kurutulması.....	48
1.6. Çalışmanın Amacı	49
2. KAYNAK BİLGİSİ	51
3. GEREÇLER.....	57
3.1. Kullanılan Maddeler.....	57
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	60

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	61
3.3.1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve aktivite tayin yöntemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler	61
3.3.2. Antioksidan aktivite tayinleri için çalışılan yöntemlerde kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler	64
4. YÖNTEMLER	69
4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	69
4.2. Bitki Ekstrelerinin İçeriğinin LC-MS/MS Yöntemi ile Belirlenmesi	69
4.3. Moleküler Modelleme (Docking) Çalışmaları	69
4.4. İnsan Kanı Temini ve Hemolizatının Hazırlanması	70
4.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına Yönelik Çalışmalar.....	70
4.6. Protein Tayin Yöntemleri.....	74
4.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	74
4.8. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayini	75
4.9. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan CAI ve II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi	76
4.10. Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstreleri İçin Antioksidan Kapasite Tayinleri.....	76
4.10.1. Demir indirgeme metodu (Fe^{3+} - Fe^{2+})	76
4.10.2. FRAP metodu	77
4.10.3. CUPRAC metodu	77
4.10.4. Süperoksit anyon radikali giderme	77
4.10.5. DPPH metodu	78
4.10.6. ABTS metodu	78
4.10.7. DMPD radikali giderme aktivitesi tayini.....	78
4.10.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	79
4.10.9. Total fenol miktarı tayini	79

4.10.10. Total antioksidan aktivite tayini.....	79
4.11. MTT Sitotoksosite Testi	80
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR	81
5.1. LC-MS/MS Yöntemi ile Bitki Ekstrelerinin İçerik Analizi	81
5.1.1. <i>Equisetum arvense</i> bitkisinin içerik analizi.....	81
5.1.2. <i>Origanum vulgare</i> bitkisinin içerik analizi.....	83
5.1.3. <i>Achillea millefolium</i> bitkisinin içerik analizi	85
5.1.4. <i>Artemisia absinthium</i> bitkisinin içerik analizi.....	87
5.1.5. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinin içerik analizi	89
5.2. Moleküler Modelleme (Docking) Bulguları	91
5.2.1. <i>Equisetum arvense</i> ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları.....	91
5.2.2. <i>Origanum vulgare</i> ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları	95
5.2.3. <i>Achillea millefolium</i> ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları.....	99
5.2.4. <i>Artemisia absinthium</i> ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları	103
5.2.5. <i>Hypericum perforatum</i> ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları	107
5.3. Karbonik Anhidraz Enzimi Saflaştırma ve Kantitatif Tayin Bulguları..	111
5.3.1. hCA I ve II izoenzimleri için elde edilen saflaştırma sonuçları	111
5.3.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik	112
5.3.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü..	113
5.4. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) Hidrataz Aktivitesi Üzerine Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları	114

5.4.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine <i>Equisetum arvense</i> ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları.....	114
5.4.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine <i>Origanum vulgare</i> ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları	115
5.4.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine <i>Achillea millefolium</i> ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçlar	117
5.4.4. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine <i>Artemisia absinthium</i> ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları ..	118
5.4.5. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine <i>Hypericum perforatum</i> ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları	120
5.5. Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemleri	122
5.5.1. Demir indirgeme metodu (Fe^{3+} - Fe^{2+})	122
5.5.2. FRAP metodu	125
5.5.3. CUPRAC metodu	128
5.5.4. Süperoksit anyon radikali giderme	131
5.5.5. DPPH metodu	134
5.5.6. ABTS metodu	137
5.5.7. DMPD radikali giderme aktivitesi tayini.....	140
5.5.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	143
5.5.9. Total fenol miktarı tayini	146
5.5.10. Total antioksidan aktivite tayini.....	147
5.6. MTT Sitotoksosite Testi	151
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	152
KAYNAKÇA.....	159
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Aktif α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımı	8
Tablo 1.2. Reaktif oksijen ve azot türleri	27
Tablo.1.3. Major ROS molekülleri ve metabolizması	29
Tablo 1.4. <i>Equisetum arvense</i> bilimsel sınıflandırma.....	42
Tablo 1.5. <i>Origanum vulgare</i> bilimsel sınıflandırma.....	43
Tablo 1.6. <i>Achillea millefolium</i> bilimsel sınıflandırma.....	45
Tablo 1.7. <i>Artemisia absinthium</i> bilimsel sınıflandırma.....	46
Tablo 1.8. <i>Hypericum perforatum</i> bilimsel sınıflandırma	47
Tablo 4.1. CA hidrataz aktivitesi prosedürü	76
Tablo 5.1. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırma tablosu.....	112
Tablo 5.2. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren <i>E. arvense</i> ekstralarının r ² ve IC ₅₀ değerleri	115
Tablo 5.3. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren <i>O. vulgare</i> ekstralarının r ² ve IC ₅₀ değerleri	116
Tablo 5.4. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren <i>A. millefolium</i> ekstralarının r ² ve IC ₅₀ değerleri .	118
Tablo 5.5. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren <i>A. absinthium</i> ekstralarının r ² ve IC ₅₀ değerleri..	119
Tablo 5.6. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren <i>H. perforatum</i> ekstralarının r ² ve IC ₅₀ değerleri .	121
Tablo 5.7. Bitki ekstralarının gallik asit'e toplam fenol miktarları.....	146
Tablo 5.8. MTT testi sonuçları.....	151
Tablo 6.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılması, molekül kütlesi tayini ve inhibisyon çalışmaları ile ilgili toplu sonuçlar	156
Tablo 6.2. hCA I ve hCA II izoenzimleri için docking çalışmalarının toplu sonuçları	157
Tablo 6.3. Antioksidan deneylerin toplu sonuçları	158

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli.....	2
Şekil 1.2. Etkileşim sonucu uyum modeli	2
Şekil 1.3. Yarışmalı inhibitör varlığında hız ve substrat ilişkisi grafiği.....	4
Şekil 1.4. Yarışmasız inhibitör varlığında hız-substrat konsantrasyonu grafiği.....	4
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyonunda hız-substrat konsantrasyonu grafiği.....	5
Şekil 1.6. CA izoenzim ailesi tarafından katalizlenen çeşitli hidrolitik reaksiyonlar	6
Şekil 1.7. Çeşitli CA ailelerinde metal iyon koordinasyonu	7
Şekil 1.8. α -CA'ların katalitik mekanizması	9
Şekil 1.9. CA-I katalitik aktif bölgesi (PDB ID: 2FW4)	10
Şekil 1.10. Sülfonamid türevleri	13
Şekil 1.11. Sülfonamidlerin CA I aktif bölgesine bağlanma şekli	14
Şekil 1.12. CA I aktivatörleri (histamin ve histidin)	15
Şekil 1.13. X-ışını kristalografisi ile belirlenen hCA II'nin üç boyutlu yapısı (PDB: 1CA2)	17
Şekil 1.14. (A) bisülfid, (B) bromür, (C) format ve (D) nitrat ile kompleks haline getirilmiş hCA II'nin yapısı	18
Şekil 1.15. Örnek bir sülfonamid inhibitörü ve hCA II aktif bölgesi arasındaki anahtar etkileşimlerin şematik gösterimi	19
Şekil 1.16. Benzensülfonamid'in hCA II aktif bölgesine bağlanması	20
Şekil 1.17. hCA II'ye bir NO-bağlayan sülfonamid (9) eklenmesi	22
Şekil 1.18. CA inhibitörleri L-adrenalin (siyah) ve histamin (beyaz) ile üst üste hidrolize edilmiş kumarin (gri renkli) CA II aktif bölgesine bağlanması. Kumarin ve CA-Aktivatörlerinin bağlanma bölgeleri aynıdır	24
Şekil 1.19. ROS oluşumu ve kaybı ile ilgili reaksiyonların gösterimi	26
Şekil 1.20. Singlet oksijen oluşumu yolları	30
Şekil 1.21. ROS oluşumu ve hücre içi düzeyde metabolizma için basitleştirilmiş şeması	31
Şekil 1.22. Askorbik asitin dehidroaskorbata dönüşüm mekanizması	36
Şekil 1.23. Tokoferollerin sınıflandırılması	37

Şekil 1.24. α -Tokoferolün radikal giderme mekanizması	38
Şekil 1.25. Bitkilerin toplandığı bölge.....	41
Şekil 1.26. <i>Equisetum arvense</i> bitkisinin görünüşü	42
Şekil 1.27. <i>Origanum vulgare</i> bitkisinin görünüşü	44
Şekil 1.28. <i>Achillea millefolium</i> bitkisinin görünüşü	45
Şekil 1.29. <i>Artemisia absinthium</i> bitkisinin görünüşü.....	46
Şekil 1.30. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinin görünüşü	48
Şekil 4.1. Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonlar	72
Şekil 4.2. A: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'nin SEM görüntüsü; B: Sülfanilamid kenetlendirilmesi sonrasında jelin SEM görüntüsü	72
Şekil 4.3. Afinite kolonunun paketlenmesi	73
Şekil 5.1. <i>E. arvense</i> sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	81
Şekil 5.2. <i>E. arvense</i> etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	82
Şekil 5.3. LC-MS/MS analizi sonucu <i>Equisetum arvense</i> ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	82
Şekil 5.4. <i>O. vulgare</i> sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları	83
Şekil 5.5. <i>O. vulgare</i> etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları	84
Şekil 5.6. LC-MS/MS analizi sonucu <i>Origanum vulgare</i> ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	84
Şekil 5.7. <i>A. millefolium</i> sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	85
Şekil 5.8. <i>A. millefolium</i> etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	86
Şekil 5.9. LC-MS/MS analizi sonucu <i>Achillea millefolium</i> ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	86
Şekil 5.10. <i>A. absinthium</i> sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları	87
Şekil 5.11. <i>A. absinthium</i> etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları	88
Şekil 5.12. LC-MS/MS analizi sonucu <i>Artemisia absinthium</i> ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	88
Şekil 5.13. <i>H. perforatum</i> sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	89
Şekil 5.14. <i>H. perforatum</i> etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları.....	90
Şekil 5.15. LC-MS/MS analizi sonucu <i>Hypericum perforatum</i> ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler	90

- Şekil 5.16.** A: Ekonazol, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri .. 91
- Şekil 5.17.** *Equisetum arvense* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A:Ekonazol’ün etkileşimi, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten’in etkileşimi. 92
- Şekil 5.18.** A: Ekonazol, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri . 93
- Şekil 5.19.** *Equisetum arvense* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A:Ekonazol’ün etkileşimi, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten’in etkileşimi. 94
- Şekil 5.20.** A: Metisilin, B: Loperamid ve C: Sitrik asit bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri 95
- Şekil 5.21.** *Origanum vulgare* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Metisilin’in etkileşimi, B: Sitrik asit’in etkileşimi ve C: Loperamid’in etkileşimi. 96
- Şekil 5.22.** A: Metisilin, B: Loperamid ve C: Sitrik asit bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri 97
- Şekil 5.23.** *Origanum vulgare* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Metisilin’in etkileşimi, B: Sitrik asit’in etkileşimi ve C: Loperamid’in etkileşimi. 98
- Şekil 5.24.** A: Klorojenik asit, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit C: Luteolin ve D: Rutin bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri..... 99
- Şekil 5.25.** *Achillea millefolium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit’in etkileşimi, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit’in etkileşimi, C: Luteolin’in etkileşimi ve D: Rutin’in etkileşimi.100

- Şekil 5.26.** A: Klorojenik asit, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit C: Luteolin ve D: Rutin bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri..... 101
- Şekil 5.27.** *Achillea millefolium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit'in etkileşimi, C: Luteolin'in etkileşimi ve D: Rutin'in etkileşimi.102
- Şekil 5.28.** A: Klorojenik asit, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ve C: P-Simen bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri..... 103
- Şekil 5.29.** *Artemisia absinthium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol'ün etkileşimi ve C: P-Simen'in etkileşimi..... 104
- Şekil 5.30.** A: Klorojenik asit, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ve C: P-Simen bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri..... 105
- Şekil 5.31.** *Artemisia absinthium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol'ün etkileşimi ve C: P-Simen'in etkileşimi. 106
- Şekil 5.32.** A: Kafeoil kinik asit, B: Rutin ve C: Hiperozid bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri 107
- Şekil 5.33.** *Hypericum perforatum* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu:1AZM) ile etkileşimi. A: Kafeoil kinik asit'in etkileşimi, B: Rutin'in etkileşimi ve C: Hiperozid'in etkileşimi. 108
- Şekil 5.34.** A: Kafeoil kinik asit, B: Rutin ve C: Hiperozid bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri 109
- Şekil 5.35.** *Hypericum perforatum* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Kafeoil kinik asit'in etkileşimi, B: Rutin'in etkileşimi ve C: Hiperozid'in etkileşimi..... 110

Şekil 5.36. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenimlerinin elüsyon grafiği.....	111
Şekil 5.37. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan BSA standart grafığı.....	112
Şekil 5.38. SDS-PAGE fotoğrafı.....	113
Şekil 5.39. SDS-PAGE 3 boyutlu görünümü	113
Şekil 5.40. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktivitesi üzerine <i>E. arvense</i> bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC ₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri.....	114
Şekil 5.41. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktivitesi üzerine <i>O. vulgare</i> bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC ₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri.....	116
Şekil 5.42. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktivitesi üzerine <i>A. millefolium</i> bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC ₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri	117
Şekil 5.43. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktivitesi üzerine <i>A. absinthium</i> bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC ₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri	119
Şekil 5.44. hCA I ve II izoenzimlerinin CO ₂ -Hidrataz aktivitesi üzerine <i>H. perforatum</i> bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC ₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri	120
Şekil 5.45. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının Fe ³⁺ -Fe ²⁺ iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	122
Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstralarının Fe ³⁺ -Fe ²⁺ iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart	

antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.	123
Şekil 5.47. Sulu bitki ekstrlerinin 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	124
Şekil 5.48. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	124
Şekil 5.49. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) su ile hazırlanan bitki ekstrlerinin FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.....	125
Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) etanol ile hazırlanan bitki ekstrlerinin FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.	126
Şekil 5.51. FRAP reaktifi ile sulu bitki ekstrlerinin 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarının (Fe^{2+}) indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması	127
Şekil 5.52. FRAP reaktifi ile etanollü bitki ekstrlerinin 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarının (Fe^{2+}) indirgeme aktivitesi için 593 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması	127
Şekil 5.53. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) su ile hazırlanan bitki ekstrlerinin Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.	128
Şekil 5.54. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) etanol ile hazırlanan bitki ekstrlerinin Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.	129

Şekil 5.55. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu ²⁺ indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	130
Şekil 5.56. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu ²⁺ indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması.....	130
Şekil 5.57. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstrlerinin süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.	131
Şekil 5.58. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstrlerinin süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	132
Şekil 5.59. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali (O ₂ ^{•-}) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması.....	133
Şekil 5.60. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali (O ₂ ^{•-}) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması.....	133
Şekil 5.61. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DPPH grafiği.....	134
Şekil 5.62. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstrlerinin DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	134
Şekil 5.63. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstrlerinin DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	135
Şekil 5.64. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	136

Şekil 5.65. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	136
Şekil 5.66. ABTS• ⁺ serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart ABTS• ⁺ grafiği	137
Şekil 5.67. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının ABTS• ⁺ radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	137
Şekil 5.68. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstralarının ABTS• ⁺ radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	138
Şekil 5.69. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	139
Şekil 5.70. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	139
Şekil 5.71. DMPD• ⁺ serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DMPD grafiği	140
Şekil 5.72. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının DMPD• ⁺ serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	140
Şekil 5.73. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstralarının DMPD• ⁺ serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	141
Şekil 5.74. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	142

Şekil 5.75. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması	142
Şekil 5.76. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstrlerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.....	143
Şekil 5.77. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstrlerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması	144
Şekil 5.78. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması	145
Şekil 5.79. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması	145
Şekil 5.80. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	146
Şekil 5.81. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen sulu ekstrlerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks ve α- Tokoferol ile karşılaştırılması	147
Şekil 5.82. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen etanollü ekstrlerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks ve α- Tokoferol ile karşılaştırılması	148
Şekil 5.83. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan sulu ekstrlerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması.....	149
Şekil 5.84. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan etanollü ekstrlerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması	150

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
BSA	: Sığır serum albümin
CNBr	: Siyanojen bromür
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DMPD	: N,N'-Dimetil-fenilendiamin
DMPD ^{•+}	: N,N'-Dimetil-fenilendiamin radikali
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
DPPH [•]	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
E-	: Negatif iyon modu
E.C.	: Enzim kod numarası
E+	: Pozitif iyon modu
EÜ	: Enzim ünitesi
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
hCA I	: İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	: İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _m	: Maksimum hızı yarıya düşüren substrat konsantrasyonu
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi – kütle spektrometri sistemi
LOO [•]	: Lipit peroksit radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
O ₂ ^{•-}	: Süperoksit anyon radikali
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	: Amonyum persülfat
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCA	: Triklorasetik asit
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilendiamin

Tris	: Trihidroksimetil amino metan
Trolox	: 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V	: Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	: Maksimum hız

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda meydana gelen bütün biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeksizin %100'lük ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir kısmı hariç, enzimler protein yapısındadır ve aynı zamanda proteinlerin en büyük grubunu oluştururlar. Günümüze kadar yaklaşık 200 tane enzim saflaştırılmış olup, bunun yanı sıra 2000'e yakın enzim olduğu bilinmektedir [1].

Substratlar ve kofaktörler enzimin aktif bölgesine bağlanırlar, aynı zamanda bu bölgede yer alan ve katalitik etkiye sahip amino asitler bağ yapımı ve yıkımında görev alırlar. Her bir enzimin farklı yapısı, spesifikliğı ve katalizleme yeteneğı vardır. Substratlar, kovalent bağlara oranla daha zayıf bağlarla enzimin küçük bir kısmını oluşturan aktif bölgesine bağlanırlar. Aktif bölgenin, şekil değıştirmeyen ve formunu koruyan yapıların aksine esnek ve değışebilir bir yapıda olduğı bilinmektedir. Sonuç olarak bu tip enzimlerde substrat ile etkileşmeden önce aktif bölgenin substrata göre şekillenip uygun bir bağlanmanın gerçekleştiğı görölmüşür [1, 2].

Substrat aktif bölgeye bağlandığında Enzim-Substrat kompleksi, Enzim-Ürün kompleksine dönüştükten sonra Enzim-Ürün kompleksi de Enzim ve Ürüne dönüür [2, 3].



Sadece protein yapısıyla katalizleyebilme özelliğı olan bazı enzimler olduğı gibi herhangi bir reaksiyonu kendi başına katalizleyemeyen enzimler de bulunmaktadır. Bu tip enzimlerin aktivitesi için kofaktöre ihtiyaç vardır. Bu bir metal iyonu ya da koenzim adı verilen kompleks bir organik bileşik olabileceğı gibi bazı enzimler ikisine de ihtiyaç duyabilmektedirler.

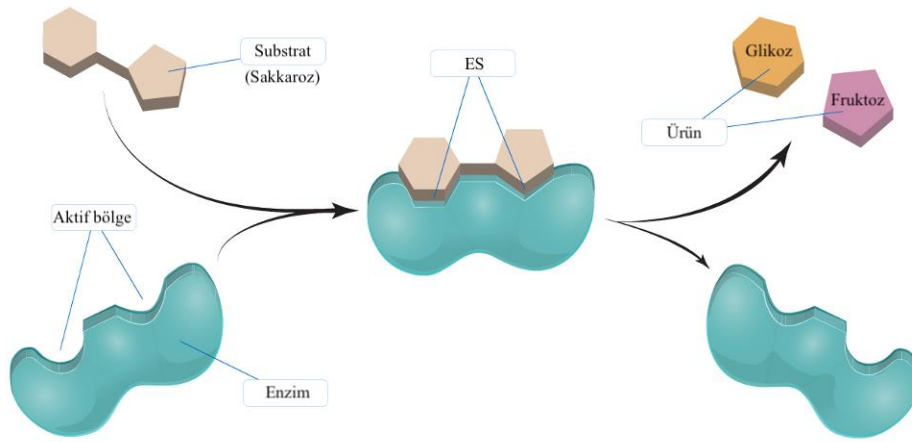
Kofaktörü olmayan proteine apoenzim, kofaktöre sahip olan ve katalitik etki gösterebilen enzime holoenzim adı verilir. Bazı koenzimler enzimin aktif bölgesine diyalizle ayrılmayacak şekilde sıkı bağlanırlar, böyle gruplara prostetik grup adı verilmektedir. Enzimden ayrılabilen gruplar ise prostetik olmayan gruplardır. Enzimler

katalizledikleri reaksiyonların aktifleşme enerjilerini düşürerek reaksiyonların hızını arttıırırlar [1].

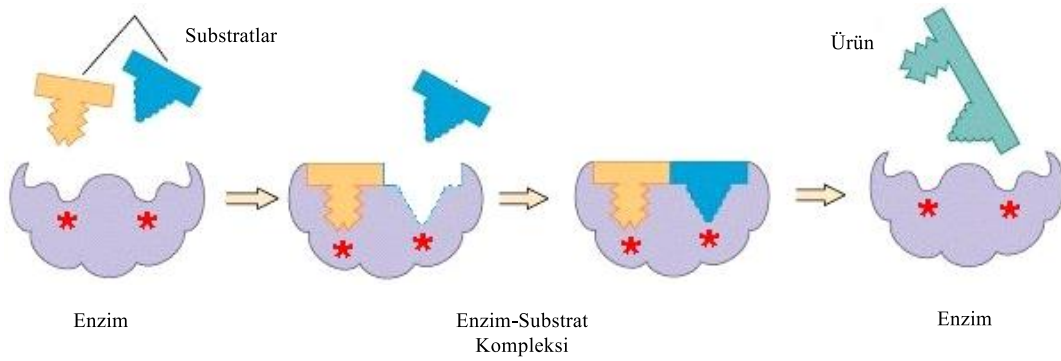
Ayrıca enzimlerin katalitik mekanizmasında, substrat molekülleri enzim yapısına iki şekilde bağlanabilirler;

- a) Anahtar kilit modeli (Şekil 1.1)
- b) Etkileşim sonucu uyum modeli (Şekil 1.2)

Her iki bağlanma mekanizması sonucunda da nihai ürün oluşumu meydana gelmektedir.



Şekil 1.1. Anahtar kilit modeli



Şekil 1.2. Etkileşim sonucu uyum modeli

1.1.1. Enzim aktivitesine etki eden faktörler

Kimyasal reaksiyonların tamamı için geçerli olan kinetik prensipler, enzimli reaksiyonlar için de geçerlidir. Enzimli reaksiyonların substrat ile doymuş olup olmaması reaksiyon hızı hakkında bilgi verir. Birinci dereceden reaksiyonlarda, reaksiyon hızı düşük substrat konsantrasyonu ile artar. Sıfır ile birinci derece arasındaki reaksiyonlarda ise substrat konsantrasyonu artışıyla reaksiyon hızının artışında düşüş olduğu gözlenir.

Enzim substratına doymuş zaman reaksiyon maksimum hıza ulaşmış olur, bu aşamadan sonra reaksiyon ortamına substrat eklense bile reaksiyon hızında herhangi bir değişiklik olmaz. Dolayısıyla, her enzim farklı substrat konsantrasyonlarında maksimum hıza (V_{max}) ulaşmaktadır. Bu hızı değiştirebilecek faktörler; sıcaklık, iyonik şiddet, enzim miktarı, pH, kofaktör, substratın yapısı, inhibitör ve aktivatörler'dir [1].

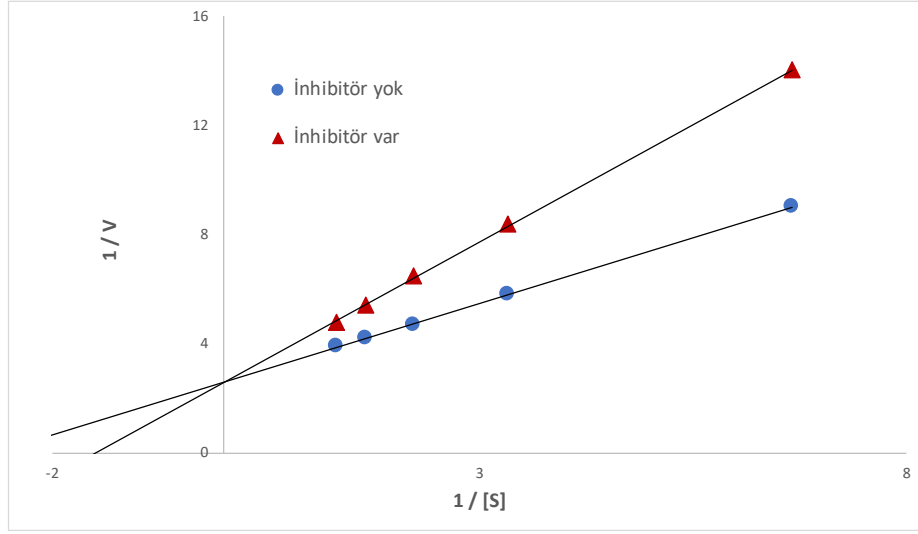
1.1.2. Enzim inhibisyonu

Hem *in vivo* hem de *in vitro* şartlarda gerçekleşen enzimli reaksiyonlarda hızlı bir şekilde ürün oluşumu sağlanır. Fakat gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucu elde edilecek ürünler metabolik ihtiyaca göre ayarlandığından bazen enzimli reaksiyonların yavaşlatılması veya durdurulması gerekmektedir. İşte enzimler tarafından katalizlenen bu reaksiyonların yavaşlatılması veya tamamen durdurulmasına inhibisyon denir. Reaksiyonu yavaşlatan veya durduran bileşiklere inhibitör adı verilmektedir. İnhibitörler genelde küçük molekül kütlelerine sahip maddeler olmaktadır. Bu moleküller enzimleri genelde dönüşümlü veya dönüşümsüz inhibe etmektedirler [1].

Dönüşümsüz inhibisyon: Enzim inhibitörüne kovalent bağla bağlanmıştır ve kolay şekilde ayrılamayan bir kompleks oluşturur. Bu inhibisyona örnek olarak sinir gazı tarafından inhibe edilen asetilkolin esterase enzimi verilebilir.

Dönüşümlü inhibisyon: Dönüşümlü inhibisyon üç şekilde incelenebilir;

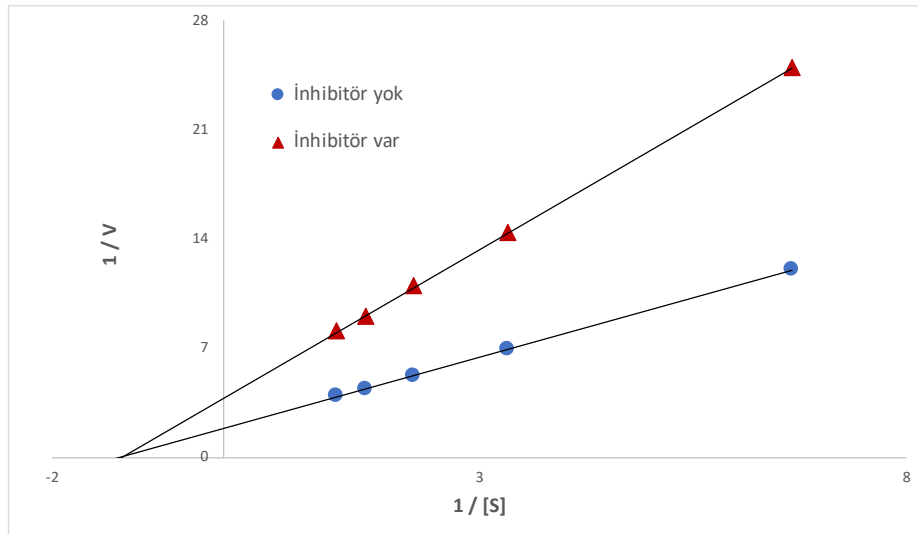
a.Yarışmalı (competitive) inhibisyon: Yarışmalı inhibitörler substrata olan yapısal benzerliklerinden dolayı yüksek konsantrasyonlarda enzime bağlanacak olan substrata önce enzimin aktif bölgesine bağlanırlar. Bu durumda inhibisyon etkisinin azaltılabilmesi substrat konsantrasyonunun artırılmasına bağlıdır [1].



Şekil 1.3. Yarışmalı inhibitör varlığında hız ve substrat ilişkisi grafiği

Şekil 1.3'deki grafikte görüldüğü gibi V_{max} sabit kalırken enzimin substrata karşı olan ilgisi azalır. Bunun sonucunda K_m artar.

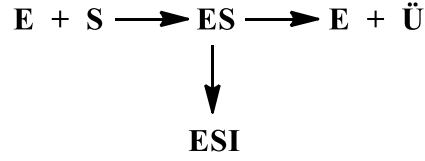
b.Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon: Substrat enzime bağlanırken aynı zamanda enzimin farklı bir bölgesine bağlanabilen inhibitörler yarışmasız inhibitör olarak adlandırılırlar. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlandığından dolayı substrat konsantrasyonu artırıldığında bile inhibisyonda bir azalma gözlenmez [1].



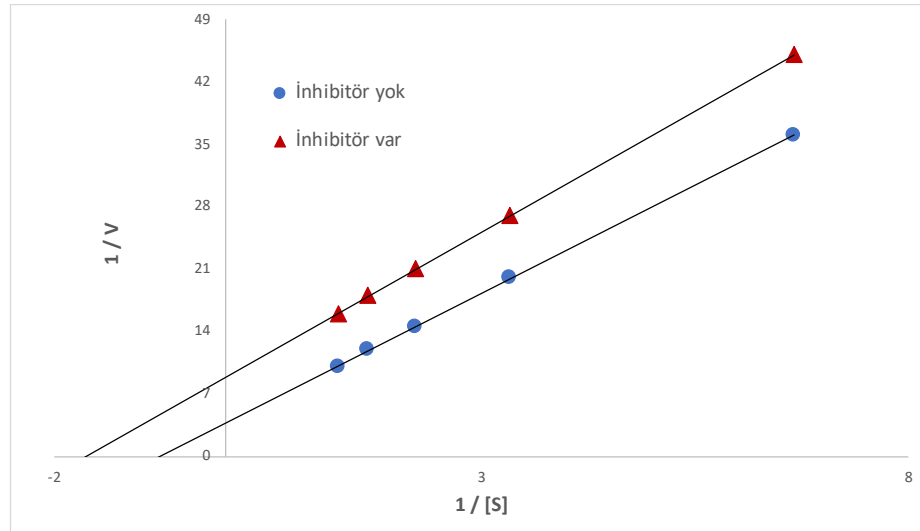
Şekil 1.4. Yarışmasız inhibitör varlığında hız-substrat konsantrasyonu grafiği

Şekil 1.4'teki grafikte görüldüğü gibi enzimin substrata karşı olan ilgisi değişmemektedir fakat $V_{\max}$ değeri azalır

c.Yarı yarışmalı (uncompetetive) inhibisyon: Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör direk enzime bağlanmaz, enzim substrata bağlandıktan sonra oluşan komplekse bağlanır.



Bu tip inhibisyonda enzimin substratına olan ilgisinin azalma sebebi enzim-substrat kompleksi oluşması gerekirken enzim-substrat-inhibitör kompleksinin oluşmasıdır. Enzim-substrat-inhibitör kompleksinin ortamda artmasıyla reaksiyonun maksimum hızı ($V_{\max}$) düşer [1].



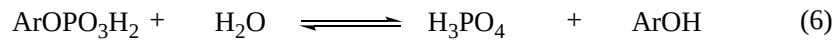
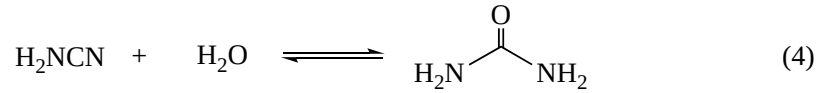
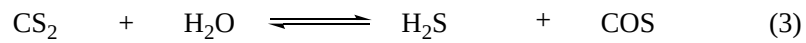
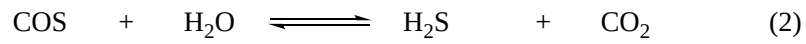
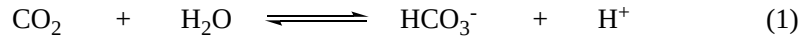
Şekil 1.5. Yarı yarışmalı inhibisyonda hız-substrat konsantrasyonu grafiği

1.2. Karbonik Anhidraz

CO₂, yaşamın merkezi unsuru olup çok kararlı bir karbon türüdür ve atmosferde oldukça bol miktarda bulunan basit moleküllerden biridir. Bu gaz su ile reaksiyona girerek, kendiliğinden bikarbonat ve protonlara dönüşen aynı zamanda kararsız bir bileşik olan H₂CO₃'ün oluşmasına sebep olur [4].

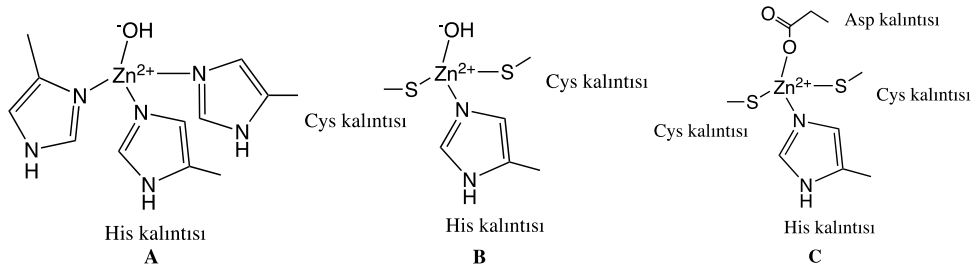
Bununla birlikte bu reaksiyon özellikle 7,5 veya daha düşük pH değerlerinde yavaştır, bu çoğu doku ve organizmada genellikle fizyolojik pH değeridir. Diğer taraftan CO₂ hidrasyonu 12'den yüksek olan pH değerlerinde çok daha etkilidir [5].

CO₂'in birçok organizmada çeşitli reaksiyonlar sonucunda yüksek miktarda üretildiği bilinmektedir. Apolar bir bileşik olan CO₂'in taşınması ve atılması sürecinde, çözünebilir ve taşınabilir bir bileşiğe (HCO₃⁻) dönüşümü önemlidir. Bu dönüşüm karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Karbonik anhidraz CO₂'in geri dönüşümlü hidrasyonunu bikarbonat ve protonlara katalize eden metalloenzimdir (reaksiyon 1). Bununla birlikte, COS ve CS₂ hidrasyon (reaksiyon 2 ve 3), siyanamid hidrasyon (reaksiyon 4), ester hidrolizi (reaksiyonlar 5-7) gibi birçok hidrolitik süreç, bu CA izoenzim ailesinin bazı üyeleri tarafından katalize edilmektedir [6-8].



Şekil 1.6. CA izoenzim ailesi tarafından katalizlenen çeşitli hidrolitik reaksiyonlar [4, 5]

Çok geniş bir gen ailesine sahip olan karbonik anhidrazlar 5 farklı grup içerir. Bu gruplar α -, β -, γ -, δ - ve ζ -CA izoenzimleri olup, katalizin gerçekleşmesi için aktif bölge içinde kullanılan metal iyonları yönünden farklılık gösterirler. Zn^{2+} iyonları bu grupların tümü tarafından kullanılır. γ -CA izoenzimlerinin aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu yanı sıra Fe^{2+} ve Co^{2+} iyonları da bulunabilir [4, 5]. ζ -CA izoenzimleri fizyolojik katalitik reaksiyon gerçekleştirmek için Zn^{2+} veya Cd^{2+} kullanır [9].



Şekil 1.7. Çeşitli CA ailelerinde metal iyon koordinasyonu [10]

Şekil 1.6'da: (A) α -, γ - ve δ -CA'larda Zn^{2+} iyonuna bağlı üç His rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksit iyonu bulunur. γ -sınıfının bazı üyelerinde ise, üç His rezidüsü ve iki su molekülü ile Zn^{2+} iyonunun bipiramidal koordinasyonu da gözlenmiştir. (B) β - ve ζ -CA'larda bir ve iki Cys rezidüsü ile su molekülü/hidroksit iyonu içerdiğinde (aktif bölgede çinko olup kadmiyum olmadığı durumda). (C) β -CA'ların aktif bölgesinde bir His rezidüsü ile bir Asp ve iki Cys bulunur [10].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin her biri farklı üç boyutlu katlanma göstermektedir. α -CA'lar genelde monomer şekilde olup az da olsa dimer şekilde görülür. β -CA'lar dimer, tetramer, oktamer gibi üç farklı yapıda bulunurken, γ -CA'lar sadece trimer yapıdadır. δ - ve ζ -CA'ların monomer yapıda olduğu tahmin edilmektedir [11].

Bütün insan CA'ları, bu enzim ailesinin α sınıfına aittir. 13 tanesi katalitik olarak aktif, 3 tanesi nonkatalitik olan toplamda 16 CA izoenzimi tanımlanmıştır [4].

Tablo 1.1. *Aktif α -CA izoenzimlerinin organ/doku dağılımı [4]*

Enzim	Katalitik aktivite	Organ/Doku dağılımı
CA I	Düşük	Eritrositler, gastrointestinal sistem, göz
CA II	Yüksek	Eritrositler, göz, gastrointestinal sistem, böbrek, akciğer, testis, beyin
CA III	Çok düşük	İskelet kası, adipositler
CA IV	Orta	Böbrek, akciğer, pankreas, beyin kılcal damarları, kolon, kalp kası, göz
CA VA	Düşük	Karaciğer
CA VB	Yüksek	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, omurilik, gastrointestinal sistem
CA VI	Düşük	Tükürük ve meme bezleri
CA VII	Yüksek	Merkezi sinir sistemi
CA IX	Yüksek	Tümörler, gastrointestinal mukoza
CA XII	Düşük	Böbrek, bağırsak, üreme epitelyumu, göz, tümörler
CA XIII	Düşük	Böbrek, beyin, akciğer, bağırsak
CA XIV	Düşük	Beyin, karaciğer, göz, iskelet kası

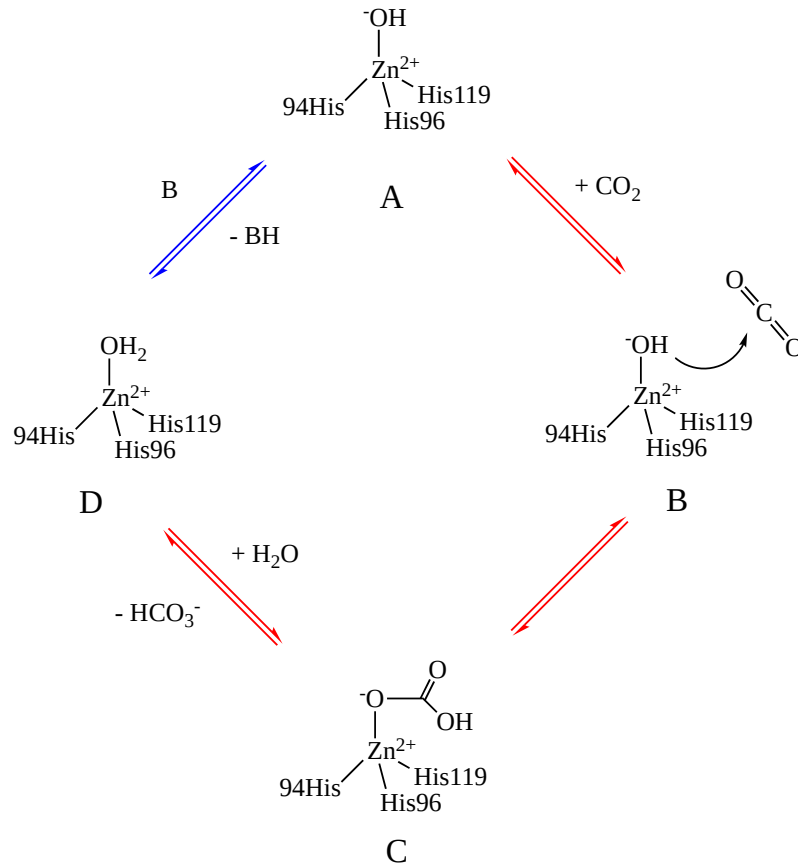
Herhangi bir enzim aktivitesinden yoksun ve CA ile ilişkili proteinler CARP'ler olarak adlandırılır. CA VIII, X ve XI izoenzimleri sindirim sistemi, beyin, kas, kırmızı kan hücreleri, kalp ve göz dokularında bulunur. Bu dokularda gösterdikleri spesifik aktivite oldukça yüksektir [12].

Katalitik olarak aktif olan CA izoenzimleri lokalizasyona bağlı olarak dört farklı alt sınıfa ayrılır. İnsan CA I, II, III, VII ve XIII sitozolde; CA IV, IX, XII, XIV ve XV membranda; CA VA ve VB mitokondride bulunurken CA VI tükürükte salgılanır [4, 5].

CA izoenzimleri vücuttaki farklı dokularda gerçekleşen biyolojik olayların birçoğunda görev alırlar. Asit-baz dengesinin düzenlenmesi, CO₂ ve iyon taşınması, elektrolit salınımı, glukoz ve üre sentezi, fotosentez ve gaz dengesinin sağlanması gibi etkilerinden söz edilebilir. Aynı zamanda CA izoenzimleri bazı hastalıkların (kanser, inme, obezite, serebral ödem, epilepsi, vb) tanı ve tedavisinde aktive veya inhibe olabilmek özelliklerinden dolayı terapötik hedeflerle ilişkilendirilmektedirler [13, 14].

α -CA'lar tarafından katalizlenen reaksiyonda aktif alanda katalitik olarak işlev gören Zn²⁺ bağlı hidroksit ile iki aşamalı bir katalitik mekanizmayı takip eder (Şekil 1.8 A). İlk aşamada, bu hidroksit iyonunun bir karbon dioksit molekülü üzerindeki

nükleofilik atağı (Şekil 1.8 B) çinkoya koordine edilmiş bir bikarbonat iyonunun oluşmasına yol açar (Şekil 1.8 C). Bikarbonatın çinkoya bağlanması oldukça kararsızdır. Dolayısıyla C, su ile reaksiyona girerek çözelti içine bikarbonat serbest bırakılır ve enzimin asidik formunun üretilmesiyle katalitik olarak etkisiz hale getirilir. Sonuç olarak kolaylıkla D'ye dönüştürülür (Şekil 1.8 D) [15, 16]. İkinci aşamada, enzimin katalitik olarak aktif formu, çinko-koordineli su molekülünden harici tampona bir proton transfer reaksiyonu ile rejenere edilir [17].



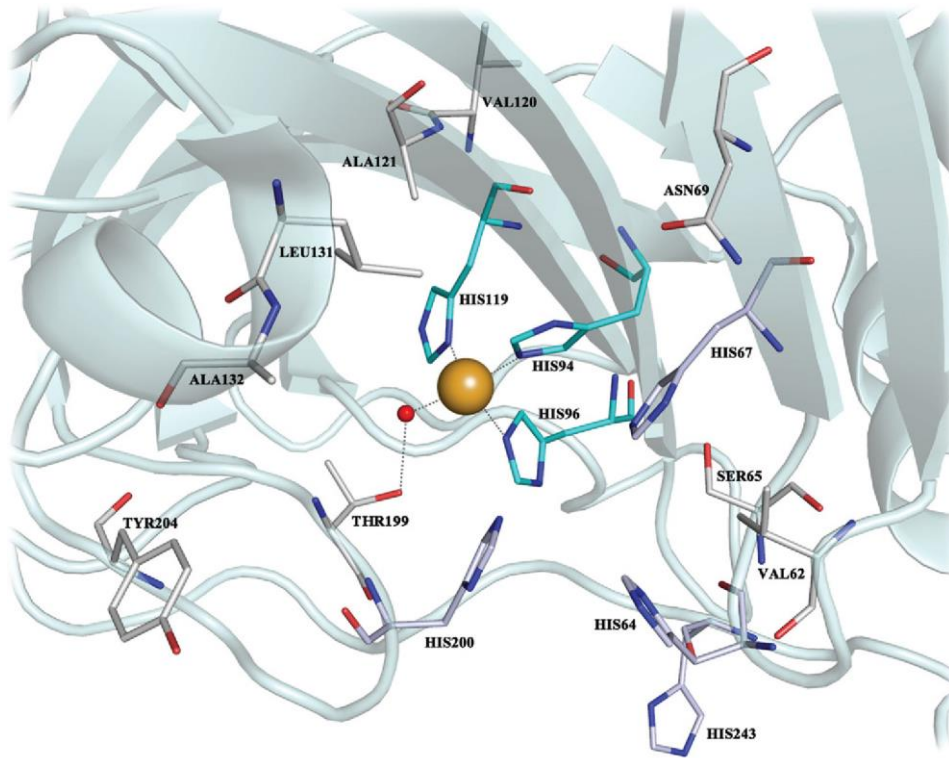
Şekil 1.8. α -CA'ların katalitik mekanizması [17]

Kırmızı oklar, katalitik mekanizmanın ilk aşamanın tanımlayan reaksiyonları gösterirken, mavi oklar ikinci aşamanın reaksiyonunu belirtir.

1.2.1. CA I

CA I'in birincil transkripti 261 rezidü içerir. Bu yapı, başlatıcı metioninin çıkarılmasından sonra matürasyona uğrar ve sonuç olarak CA I sekansı 2 ile 261 arasında numaralandırılır. CA I 260 rezidüden oluşan 30 kDa'luk tek bir zincirdir. [18].

Elde edilen apoenzim katalitik aktiviteden yoksundur ve işlevsel olması için bir Zn^{2+} iyonuna ihtiyaç duyar. Bugüne kadar CA I'de 19 adet X-ışını kristalografik yapısı bulunmaktadır [19]. CA I izoenzimi pH 9 ve 25°C'de saniyede 105 molekülün hidrasyonunu sağlayarak en yüksek turnover sayılarından birine sahiptir. Kofaktör olan çinko, üç histidin kalıntısının (His94, His96 ve His119) koordinasyonu ile tutulduğu bir katalitik cebin dibine derin bir şekilde gömülüdür [20].



Şekil 1.9. CA I katalitik aktif bölgesi (PDB ID: 2FW4) [21]

Çinko kofaktörü, üç histidin rezidüsü ve bir su molekülü ile koordine edilir.

Zn (II) iyonunun tetrahedral koordinasyon kabuğu, bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından tamamlanır. 3 adet His türevi içeren klasik CA'a göre CO_2 'nin hidrasyonu için aktif tür olarak işlev görür [15, 22, 23].

İnsan CA'ları (I, II, IV, VI, VII, IX, XII, XIII ve XIV) için son derece aktif izoformlarında katalitik açıdan ilgili dördüncü histidin kalıntısı (His64) vardır. His64 çinko bağlı su molekülünün deprotonasyonu için proton mekik görevi görür [19].

Ayrıca, CA I aktif bölgesi farklı moleküler süreçlerde rol oynayabilen üç özel histidin kalıntısı (His67, His200 ve His243) içerir. CA I'in inhibitörlere karşı katalitik aktivitesinin diğer izoformlara göre farklılık göstermesinin sebebi treonin yerine His200 kalıntısının varlığıdır [24, 25].

CA I eritrositlerde bol miktarda bulunur, fakat aynı zamanda vücudun böbrek, gastrointestinal sistem (özellikle kolon), akciğerler, beyin ve gözler gibi diğer birçok dokularda bulunur [26, 27].

CA I'in fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. CA II izoformundan daha az aktif olmasına rağmen, CA I asit/baz homeostazının solunum ve regülasyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik işlevde CA II'nin yerini alır [28].

Kırmızı kan hücrelerinde CA'nın tükenmesi, eritrositlerin normal işlevini etkilemese bile, normal insan eritroid (kanda bulunan eritrositlerin yetersizliği) farklılaşmasının erken bir spesifik belirleyicisi olduğu bulunmuştur [29, 30].

CA izoenzimlerinin, çeşitli hastalıklar için cazip ve doğrulanmış ilaç hedefleri olduğu bulunmuştur, çünkü birçok semptom bu enzimlerin anormal aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Tıbbi kimya açısından bakıldığında, CA'lar yoğun bir şekilde kullanılmıştır.

Yaygın olarak kullanılmasının sebepleri:

- Orta ölçekli tek zincirli protein olması,
- Standart laboratuvar koşulları altında kararlılık göstermesi,
- Uygun maliyet ile geniş bir kullanım alanı olması,
- İlaç keşfi için uygun bir hedef olarak kullanılması,
- Bilinen tüm izozimlerin birincil yapısı hakkında bilgilerin bulunması,
- Hemen hemen tüm hCA izozimlerinin üç boyutlu yapısının aydınlatılmış olması,
- Katalitik mekanizmanın açığa çıkarılması,
- Metal kofaktörlere bağlanan bileşiklerin inhibisyon mekanizmasının anlaşılmasıdır [31].

CA I'e odaklanıldığında, yaygın olarak kırmızı kan hücrelerinde ve kolonda ifade edilmesine rağmen, bu izoformun kaynağı henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, bazı kanıtlar CA I'in farklı patolojik süreçlerde rol oynadığını göstermiştir.

Örneğin, eritrositlerde CA I aktivitesinde bir azalma, bazı anemi ve kronik asidoz tipleriyle bağlantılıdır [29].

Göz hastalıklarını destekleyen bir durum olan aşırı retinal vasküler geçirgenliğin, ekstraselüler ortamda yüksek düzeyde CA I ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Dahası, hem kan-retinal hem de kan-beyin bariyerlerindeki yüksek düzeydeki hücre dışı CA I, vazojenik ödem oluşturabilmektedir [5, 32].

Gastrointestinal sistem ile ilgili olarak, kolonik epitelyal hücrelerde CA I düzeylerinin düşük olması kolorektal kanserlerin öngörülmesi için belirleyicidir [22].

Öte yandan, daha düşük CA I seviyelerinin de patolojik süreçlerle ilişkili olduğu görülmektedir. Örneğin, tip II diyabet hastalarının eritrositlerinde CA I seviyesinin düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir. Bu durum metal bağlı su molekülü ve ortam arasındaki proton transferini hızlandırarak katalizi hızlandıracaktır. Bundan dolayı güçlü ve seçici CA I inhibitör ve aktivatörlerin geliştirilmesi gerekmektedir [29].

1.2.1.1. CA I inhibitörleri

Etkili CA inhibitörlerinin gelişimini engelleyen başlıca sebep, özellikle izoform I ile ilgili olan seçicilik eksikliğidir. CA I tüm izoformlar arasında, CA inhibitörlerinin çoğuna karşı en az duyarlı olanıdır. Böylece, CA I'e özgü inhibitörler/aktivatörlerin geliştirilmesi hem yeni potansiyel ilaçların geliştirilmesini destekleyecek hem de CA I fizyolojisi ve fizyopatolojisine ışık tutmaya yardımcı olacaktır [33].

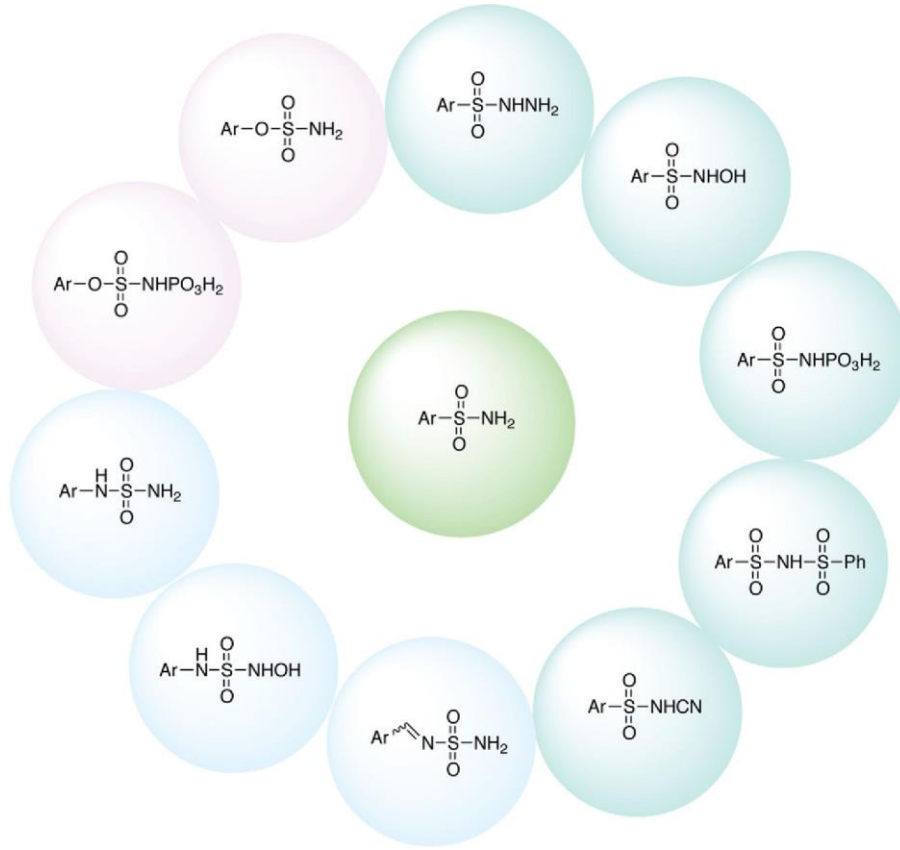
CA inhibitörleri olan anyonlar ve aril sülfonamidlerin iki ana sınıfı, genel olarak CA I'e karşı CA II'den daha seçici davranış sergiler. CAI ve II izoenzimleri için anyon inhibitörler: F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CNO^- , SCN^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-} , CH_3COO^- , ClO_4^- ve NO_3^- 'tür [34].

Keşfedilen CA inhibitörlerinin birinci sınıfı olan basit anyonlar, CA'yı iki şekilde inhibe edebilir:

- i. CA, dehidrataz işlemini gerçekleştirdiğinde iyonize bikarbonat açısından yarışmalı inhibisyona uğrayabilir.
- ii. CA, nötr substratlar tarafından yarışmasız şekilde inhibisyona uğrar [35].

CA I'in seçiciliğinden dolayı anyonlar çoğunlukla yeni inhibitörlerin gelişimi için faydalı olmamıştır. Çünkü yapıları çok basit olduğu için optimize edilememektedir, inhibisyon gücü kabul edilebilir derecede değildir ve diğer biyolojik makromoleküller ile etkileşimleri nedeniyle toksisiteye sebep olurlar [35].

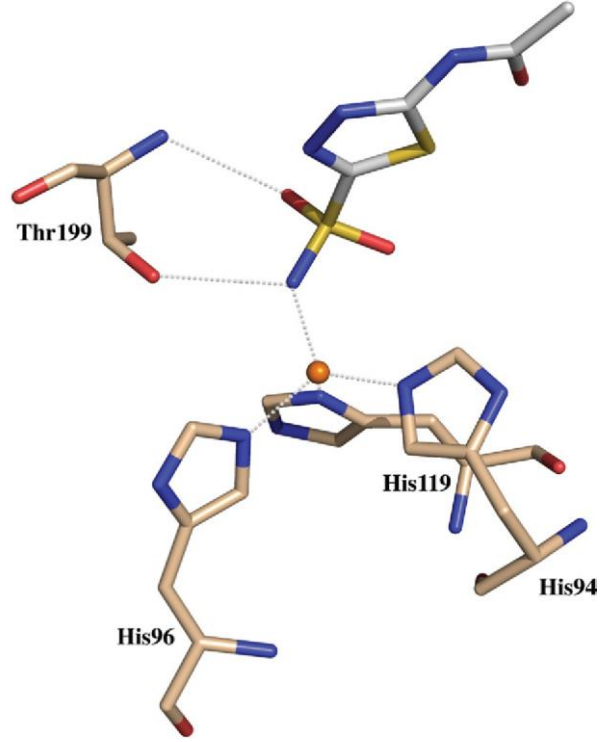
CA izoformları arasında yapısal farklılıklar olmasına rağmen, sülfonamid bazlı türevlerin CA I'in aktif bölgesine yerleştirilmesi, X-ışınıyla çözülmüş yapılarda bulunan inhibisyon mekanizmasında benzer bir davranışı destekler. Bu nedenle, CA için daha yüksek afinite ve seçicilik ile sülfonamid inhibitörlerinin elde edilmesi oldukça zordur [33].



Şekil 1.10. Sülfonamid türevleri [33]

Aslında, güçlü ve seçici CA I inhibitörleri bulmaya yönelik girişimler, iki ana unsur tarafından engellenmiştir:

- (1) CA I, diğer izozimlere kıyasla sülfonamid inhibitörlerine daha az duyarlıdır,
- (2) CA I'in fizyopatolojik rolleri halen tartışılmaktadır [28].



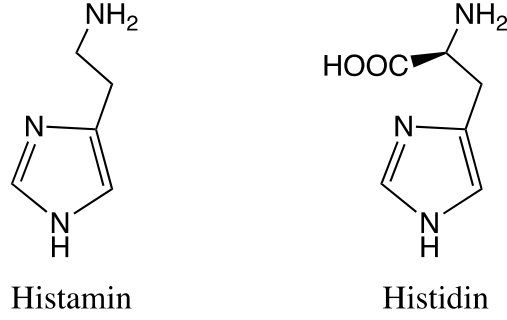
Şekil 1.11. Sülfonamidlerin CA I aktif bölgesine bağlanma şekli [33]

Zn^{2+} ve Thr199'a bağlanan Asetazolamid'in X-ışını kristalografisi (PDB: 1AZM). $NH-$, Zn^{2+} iyonuna koordine edilir ve ayrıca Thr199 rezidüsü ile bir hidrojen bağı oluşturur. İkinci bir hidrojen bağı da Thr199'daki NH ile sülfonamid grubunun oksijenlerinden biri arasında oluşur [33].

Birçok yapısal ve fizikokimyasal özellik, sülfonamidleri ilaç tasarımı ve optimizasyonu için uygun hale getirmiştir. Özellikle çok güçlü CA inhibitörleridir, onaylanmış bir farmakoforik motife sahiptirler, sentezlenmesi kolaydır ve iyi bilinen bir ortak inhibisyon mekanizmasını paylaşırlar [31].

1.2.1.2. CA I aktivatörleri

Yetersiz bir CA I aktivitesinin patolojik durumlara yol açtığı ve katalitik aktivitenin yukarı doğru bir modülasyonunun istenebileceği durumlar vardır. Bu doğrultuda, CA aktivatörleri ile CO_2 hidrasyonunu hızlandırmak mümkündür [19].



Şekil 1.12. CA I aktivatörleri (histamin ve histidin)

İlk keşfedilen CA aktivatörlerinden biri, güçlü bir CA I aktive edici özellikler sergileyen histamindir. Aynı zamanda histidinin de CA I aktivatörü olarak etki ettiği bulunmuştur. CA I ve bu endojen amin arasındaki kompleksin X-ışını kristalografik çalışmaları, enzim aktif bölgesi içinde ilginç bir bağlanma modu göstermektedir. Histidinin His64, Asn67 ve Gln92 kalıntıları ile etkileştiği gösterilmiştir [19, 21].

1.2.2. CA II

Dominant fizyolojik fonksiyonlara sahip CA II izoformu ilk olarak 80 yıl önce kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiştir. Daha sonra CA II'nin tüm omurgalılarda çok sayıda hücre, doku ve organda bulunan sitozolik izoformlarının olduğu gösterilmiştir [4-6].

Bunlar arasında insan CA II'si (hCA II), eritrositlerde bol miktarda bulunduğu ve CO₂'nin bikarbonat ve protonlara dönüştürülmesinde yüksek bir katalitik aktiviteye sahip olduğundan, karbon dioksit/bikarbonatın üretildiği dokulardan akciğerlere taşınmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [4-7].

Bununla birlikte, hCA I'in katalitik aktivitesi, hCA II'ninkine kıyasla çok daha düşüktür. hCA I, plazmada bulunan klorür ve bikarbonat tarafından da inhibe edilir. Bu durum izoformun fizyolojik fonksiyonu ile ilgili birçok soruya neden olur [34].

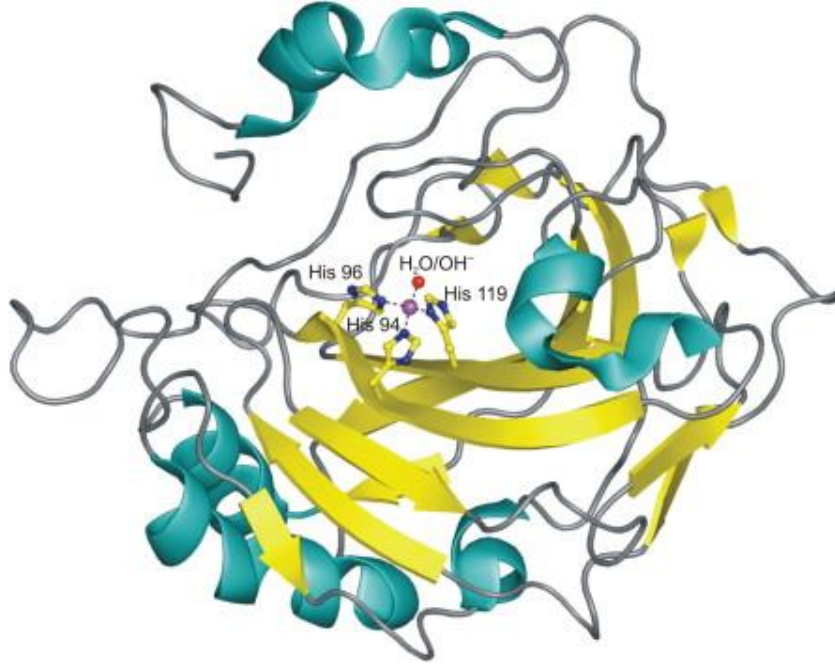
Diğer işlevleri arasında, idrar oluşumu ve böbrek tübüllerindeki bikarbonat reabsorpsiyonu, glukoneogenez, lipogenez ve üregenez, kemik rezorpsiyonu ve kalsifikasyon gibi biyosentetik reaksiyonlar ve muhtemelen diğer pek çok fizyolojik/patolojik süreçlerde yer alır [36, 37].

Gerçekten de bu izoformun aktivitesinin bir veya daha fazla dokuda deregölasyonunun önemli patolojik sonuçları vardır. Örneğın;

- Glokom (göz tansiyonu olarak da bilinir. Glokom, göz içine aşırı sıvının salgılanmasıyla göz içi basıncının artışı ile görme sinirinin zarar görmesidir) [38].
- Ödem (idrarda yeterince sıvı salgılanmadığı zaman vücutta sıvı birikmesine yol açar. CA II, CA IV, XII ve XIV gibi izoformlarla birlikte bu süreçlerde böbreklerde yer alır) [39].
- Epilepsi (CA II ve diğer beyin CA izoformlarının bu hastalıkta rol oynadığı düşünülmektedir) [40].
- Bazı kanser türlerinde CA II'nin tek başına veya CA IX ve XII gibi diğer izoformlarla birlikte aşırı eksprese olduğu gözlenmiştir [6, 41].

CA II aynı zamanda akut dağ hastalığı (AMS), ateroskleroz ve osteoporoz gibi diğer patolojilerde de rol oynar. CA II inhibitörleri AMS'yi tedavi etmek için kullanılırken, son iki patoloji etkinliklerine ilişkin çok az sayıda literatür raporu ve oldukça az sayıda çalışma vardır [42, 43].

CA II, yukarıda adı geçen birçok hastalık için belirlenmiş bir ilaç hedefidir. Bununla birlikte, CA II aynı zamanda enzimin bulunduğu organlarda, örneğın; beyin ve omurilik sıvısı veya gastrointestinal kanalda oluşabilecek çeşitli patolojik durumları görüntülemek için bir hedefdir [44]. hCA II, 259 amino asit kalıntısı içerir ve 29.3 kDa'luk bir molekül kütlesine sahiptir [45].



Şekil 1.13. X-ışını kristalografisi ile belirlenen hCA II'nin üç boyutlu yapısı (PDB: 1CA2)[45]

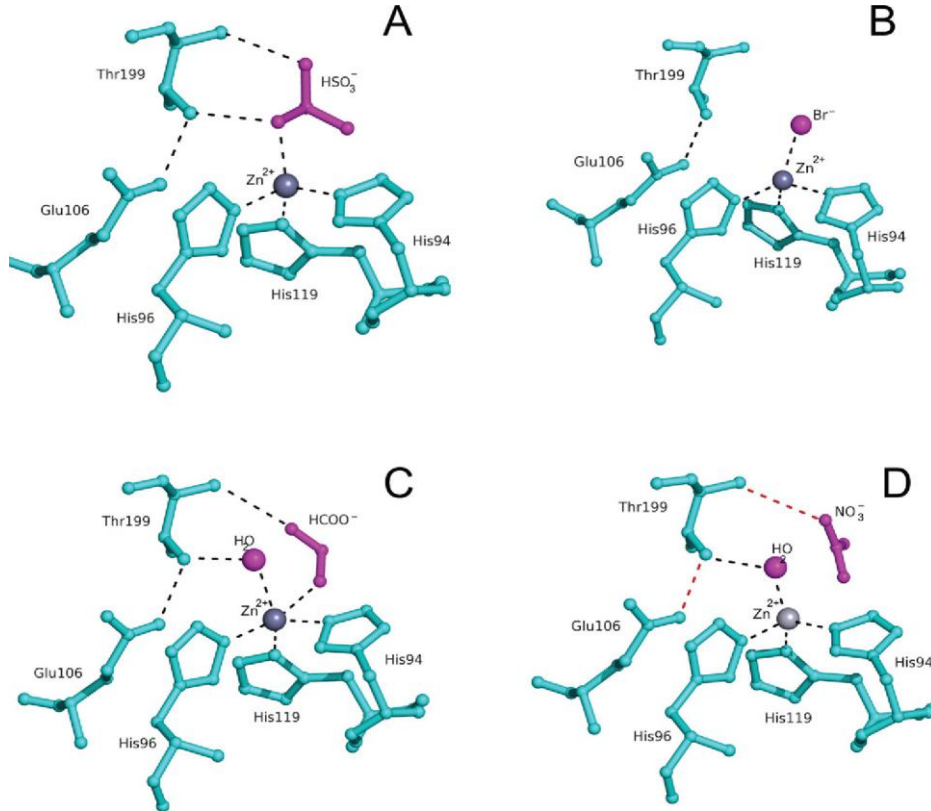
Aktif bölge, molekülün merkezine ulaşan geniş koni şeklinde bir boşluktur. Üç His rezidüsü ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edilen bu boşluğun tabanında katalitik Zn^{2+} iyonu yer alır. Zn^{2+} bağlı molekül, başka bir su molekülü ve Thr rezidüsünün (Thr199) hidroksil kısmı ile hidrojen bağı etkileşimlerine girer, bu da bir Glu kalıntısının (Glu106) karboksilat kısmına köprülenir [5]. Bu etkileşimler Zn^{2+} bağlı su molekülünün nükleofilikliğini artırır ve CO_2 substratını nükleofilik saldırı için uygun bir yere yönlendirir [4]. hCA II aktif bölgesinin önemli bir özelliği, biri hidrofobik ve diğeri hidrofilik amino asit rezidüleri ile kaplı iki farklı ortam içermesidir [46].

Substratın çok farklı kimyasal yapısı ve hidrasyon reaksiyonu ürünleri nedeniyle aktif bölgenin hidrofobik kısmı CO_2 molekülünü tutmak için kullanılır. CO_2 bağlama bölgesi, Val121, Val143, Leu198 ve Trp209 rezidüleri ile sınırlanan, boşluğun hidrofobik kısmında bulunur [47].

Aksine, aktif bölgenin hidrofilik kısmı CO_2 hidrasyon reaksiyonundan üretilen polar bileşenlerin bağlanmasını ve bunların boşluktan çevreye salınımını kolaylaştırır. Öte yandan His64, hCAII aktif bölgesinde yüksek bir esnekliğe sahip olan çok az sayıda amino asit kalıntısından biridir [25].

1.2.2.1. CA II inhibitörleri

hCA II'nin inhibitörlerle etkileşimi için en çok araştırılan izoform olduğu ve şu ana kadar bildirilen çoğu kinetik, spektroskopik ve kristalografik çalışmaların hCA II ile yapıldığı bilinmektedir. Ayrıca, şimdiye kadar bildirilen tüm yeni CA I inhibitörleri ilk olarak bu izoform ile çalışılırken keşfedilmiştir [4-7].



Şekil 1.14. (A) bisülfıt, (B) bromür, (C) format ve (D) nitrat ile kompleks haline getirilmiş hCA II'nin yapısı [48]

Üç protein çinko ligandının (His94, His96 ve His119) yanı sıra katalitik mekanizmaya katılan diğer iki amino asit rezidüsü ve inhibitörlerin Glu106 ve Thr199 bağlandığı kanıtlanmıştır [48, 49]. Şekil 1.13 basit inhibitörler için bile bağlanma modlarının çok yönlü olduğunu göstermektedir.

Bisülfıt ile Zn^{2+} iyonunun tetrahedral geometrisi, Şekil 1.13 A;

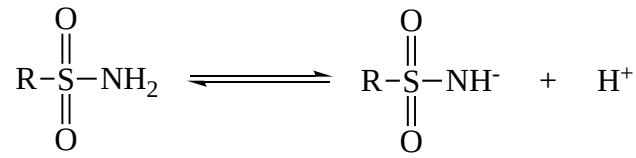
Bromür ile Zn^{2+} iyonunun çarpık tetrahedral geometrisi, Şekil 1.13 B;

Format ile Zn^{2+} iyonunun bipiramidal geometrisi, Şekil 1.13 C;

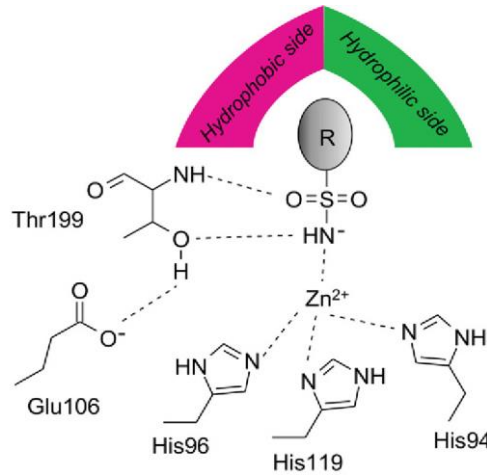
Nitrat, Zn^{2+} iyonuna koordine edilmeyen bir inhibitördür, Şekil 1.13 D [48, 49].

Normalde anyonlar hCA II için zayıf inhibitörlerdir, ancak yeni CA I inhibitörlerinin keşfedilmesi için bunların araştırılması önemlidir [50]. Örneğin trithiokarbonat (CS_3^{2-}) zayıf bir hCA II inhibitörü olarak bildirilmiştir, ancak daha sonra güçlü bir inhibitörler sınıfı olan ditiyokarbamatların (DTC'ler) keşfine yol açmıştır [51]. Şimdiye kadar bildirilen diğer hCA II inhibitör sınıfları; fenoller, poliaminleri, sülfokumarinleri, kumarinleri ve türevlerini içermektedir [52].

Primer sülfonamidler, en çok incelenen hCA II inhibitörleri sınıfını temsil eder. Genel olarak $\text{R-SO}_2\text{-NH}_2$ yapısına sahiptirler, yapılarındaki R grubu aromatik veya heteroaromatik halkayı ifade eder ve kolaylıkla iyonlaşabilmektedir.

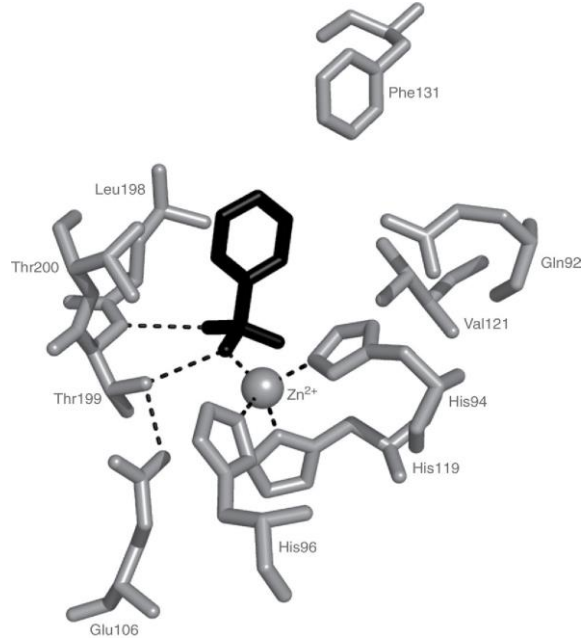


Çok sayıda çalışma sülfonamid grubunun, deprotonlanmış nitrojenin negatif yükünü pozitif yüklü çinko iyonuyla birleştirdiğinden dolayı CA aktif bölgesi için ideal bir ligant olduğunu vurgulamıştır. Koordine nitrojen atomu üzerindeki bir protonun varlığı, Thr199 atomunun hidrojen bağı akseptörü karakterine uyar, bununla kuvvetli bir hidrojen bağı yapar. Primer sülfonamidlerin çoğu düşük mikromolar aralığında güçlü hCA II inhibe edici özellik gösterirler [4, 5, 7].



Şekil 1.15. Örnek bir sülfonamid inhibitörü ve hCA II aktif bölgesi arasındaki anahtar etkileşimlerin şematik gösterimi [4]

Bununla birlikte, şekil 1.15'te R kısmı, aktif bölgenin hidrofilik veya hidrofobik bölgeleri ile ek etkileşimler gerçekleştirir ve farklı inhibisyon modellerine sahip bileşiklere yol açar [4].



Şekil 1.16. *Benzensülfonamid'in hCA II aktif bölgesine bağlanması [4, 5]*

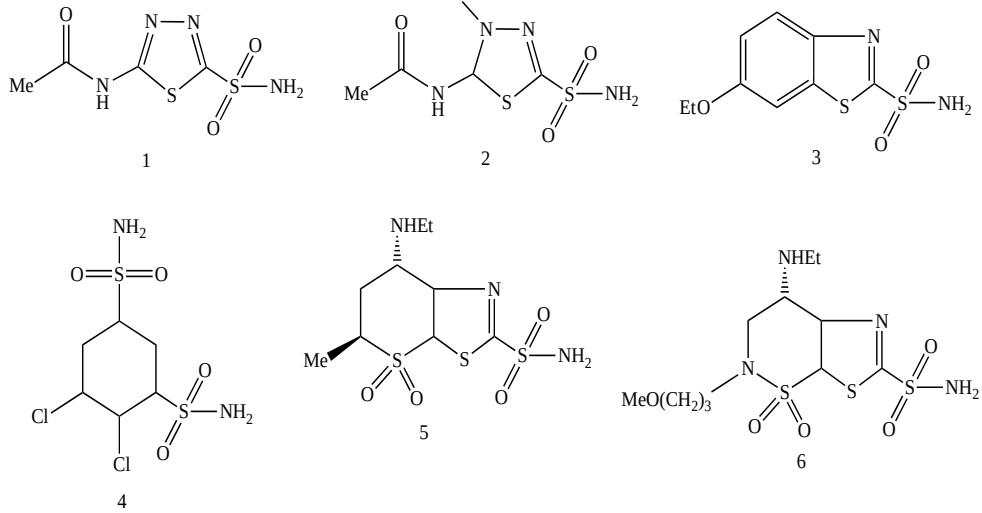
Şekil 1.16'da gösterildiği gibi sülfonamid veya çok basit bir aromatik olan benzensülfonamid hCAII'ye bağlanmıştır [5].

Sülfamatlar ve sülfamidler, sülfamoil kısmı ile izosterik çinko bağlama özelliği gösterirler ve sülfonamidlerle çok benzer bir şekilde hCA II'ye bağlanırlar [4].

1.2.2.2. Antiglukom ajanlar

Birinci nesil inhibitörler

Asetazolamid (1), metakzolamid (2) ve etokszolamid (3) gibi heterosiklik sülfonamidler ve ayrıca aromatik bileşik olan diklorofenamid (4), klinik olarak kullanılan CAT'lerin birinci nesil inhibitörleridir. Daha az klinik uygulamaya sahip olan etokszolamid haricinde, asetazolamid, methazolamid ve diklorofenamid, birtakım yan etkilere sahiptir. Bu antiglukom ilaçlar CA inhibitörleri olarak kullanılmaktadırlar. En belirgin yan etkileri: El ve ayaklarda uyuşma/karınalanma, halsizlik, kilo kaybı, gastrointestinal irritasyon, metabolik asidoz, böbrek taşı ve geçici miyopidir [38].



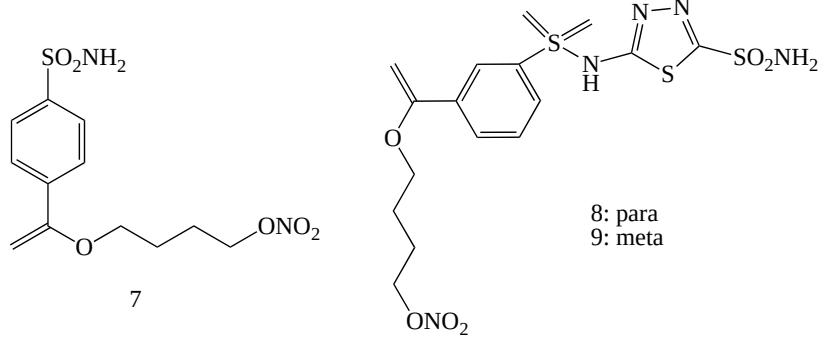
İkinci nesil inhibitörler: Lokal olarak etkili sülfonamidler

Sülfonamidleri, CA inhibisyonu için lokal olarak doğrudan göz içine uygulama fikri, 1950'lerde Becker tarafından ele alınmıştır. Klinik olarak kullanılan 1-4 bileşikleri deney hayvanlarının gözüne süspansiyon olarak verilmiştir, bu ve benzer çalışmalar negatif sonuç vermiştir. Sülfonamidler, CA inhibisyonunda sadece antiglokom ilaç olarak kullanıldığında etkili olmuştur [53].

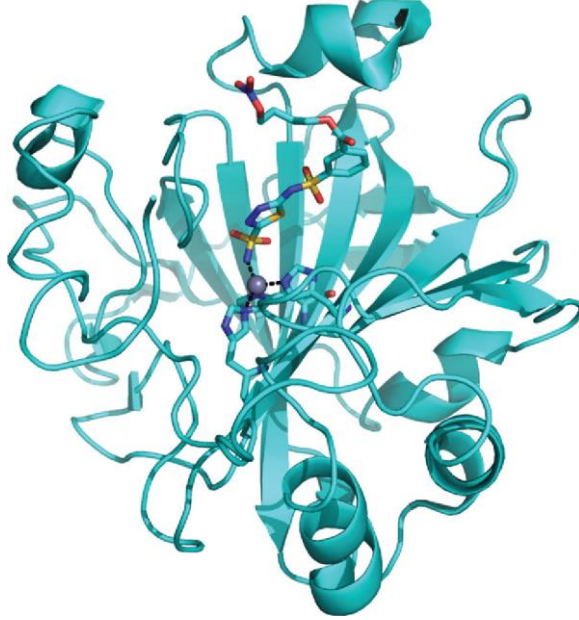
1983 yılında Maren ve ark. tarafından, nispeten dengeli bir lipit çözünürlüğüne (korneaya nüfuz edebilmek için) ve yeterince güçlü hCA II inhibisyon özelliklerine sahip olan suda çözünür bir sülfonamid olabileceği öne sürülmüştür. Fakat o anda, bu sınıftaki bileşiklerin biyoorganik kimyası henüz keşfedilmemiş olduğundan, bu özelliklere sahip hiçbir inhibitör mevcut değildi. Suda çözünür sülfonamidler, bundan kısa bir süre sonra geliştirilmeye başlandı ve 1995'te ilk farmakolojik ajan olan dorzolamid (5) göz damlası olarak piyasaya sürüldü [54]. Yapısal olarak ilişkili ikinci bir bileşik olan brinzolamid (6) Alcon Laboratories'de keşfedilmiştir ve 1999 yılında glokomun lokal tedavisi için onaylanmıştır [55]. Bu iki bileşik hala sadece lokal etkili CA inhibitörleri olarak kullanılmaktadır. Dorzolamid (5) ve brinzolamid (6), nanomolar hCA II inhibitörleridir, ancak diğer memeli izoformlarını da önemli ölçüde inhibe ederler [56]. Bunlar suda çözünürlüğe sahiptirler, korneaya nüfuz edebilirler ve lokal olarak doğrudan göz içine uygulanabilirler [54]. Gözlenen yaygın yan etkileri arasında gözün batması, yanması veya kızarması, bulanık görme, kaşıntı ve acı tadı sayılabilir [38].

Üçüncü nesil inhibitörler

Son birkaç yılda NO-bağlama özelliklerine sahip çok sayıda sülfonamid (7-9) bulunmuştur. Nitrat ester tipindeki NO-bağışlayıcı kısımları içeren bileşiklerin sentezlenmesi için birçok aromatik/heterosiklik sülfonamid iskelesi kullanılmıştır [4, 5].

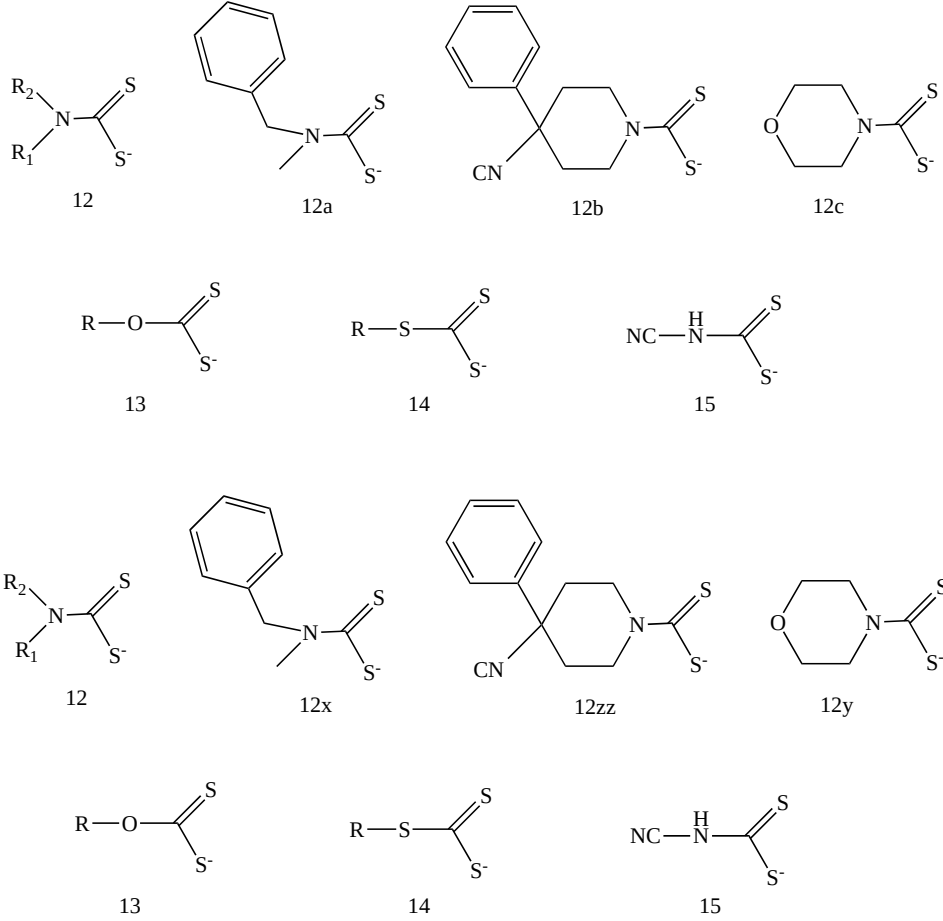


Yeni bileşiklerin bazıları, glokomda düşük nanomolar aralıkta hedef izoformların *in vitro* inhibisyonunda etki göstermiştir. Bunlardan birinin (9) X-ışını kristal yapısı, bu belirgin inhibe edici aktiviteyle ilişkili faktörleri ortaya çıkarmıştır [4, 5, 57].



Şekil 1.17. *hCA II'ye bir NO-bağlayan sülfonamid (9) eklenmesi [57]*

hCA II'yi hedefleyen lokal olarak etkili CA inhibitörleri (ditiyokarbamatlar ve ksantanlar): Son zamanlarda bu enzimlerle sülfonamidler gibi benzer veya farklı bir inhibisyon mekanizması ile etkileşime giren yeni kemotipler ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında ditiyokarbamatlar (DTC) ve ksantanlar (XTS) kuşkusuz en ilginç olanlardır [51].



hCA II için 12a, 12b ve 12c bileşikleri ile kompleks haline getirilmiş üç adet DTC'nin X-ışını kristal yapısı aydınlatılmış. Suda çözünür morfolin DTC (12c), glokomun yaygın olarak kullanılan bir hayvan modeli olan hipertansif tavşanların gözüne doğrudan uygulandığında, *in vivo* ortamda antiglokom ajan olarak çok etkili olmuştur [51]. Büyük bir ksantan serisi ve birkaç tiyoksanat (bileşik 13 ve 14'ün yanı sıra, DTC benzeri basit inorganik bir bileşik olan 15) hCA II inhibitörleri olarak rapor edilmiştir. DTC'ler için R kısmı, hCA II'yi inhibe edici özellikleri etkileyen ana faktör olmuştur [58]. Ditiyokarbamatlar ve ksantanlar kolayca temin edilebilen, sentezlenebilen ve suda çözünürlüğü iyi olan bileşikler olduğundan dolayı tercih sebebidir [51, 59].

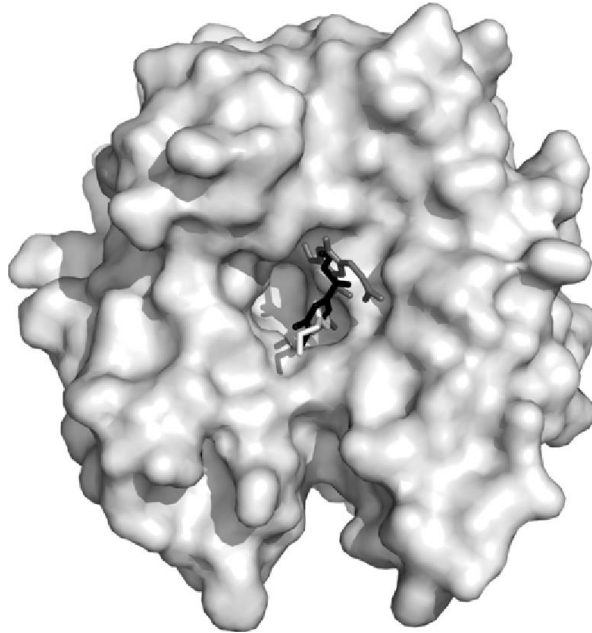
1.2.2.3. CA II aktivatörleri

İlk olarak tüm aktivatör çalışmaları hCA II (sığır izoformu, bCA) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Günümüzde, memelilerden alınan bütün CA izoformları, çoğu amin, amino asit ve oligopeptid olmak üzere çeşitli aktivatör sınıflarıyla aktivasyonları araştırılmıştır [60].

CA aktivasyon mekanizması geniş X-ışını kristalografik ve kinetik çalışmalarından dolayı tam olarak anlaşılmaktadır [61]. CA'lar tarafından katalize edilen CO₂ hidrasyon reaksiyonu için hız belirleyici aşama, enzimin çinko hidroksit türünün üretilmesiyle, reaksiyon ortamına bağlanan sudan Zn²⁺ iyonuna proton transfer reaksiyonudur [4].

Bu tür proton transfer reaksiyonlarına, amin, amino asit ve oligopeptid tipine katılabilen bileşiklerin, verimli CA aktivatörleri olarak görev yaptıkları gösterilmiştir [25, 62]. CA'ya bağlanmış bir aktivatörün X ışını kristal yapısı, ilk defa hCA II'ye bağlanmış histaminle görüntülenmiştir.

Bazı çalışmalarda, aktivatör bağlanma bölgesinin katalitik metal iyonundan çok uzakta, enzim aktif alanının girişinde olduğu gösterilmiştir. Aktivatörler, enzimin nükleofilik türlerinin daha fazla üretilmesiyle birlikte ek proton salma yollarına katılabilir ve böylece daha verimli kataliz olabilir [25].



Şekil 1.18. CA inhibitörleri L-adrenalin (siyah) ve histamin (beyaz) ile üst üste hidrolize edilmiş kumarin (gri renkli) CA II aktif bölgesine bağlanması. Kumarin ve CA-Aktivatörlerinin bağlanma bölgeleri aynıdır [25]

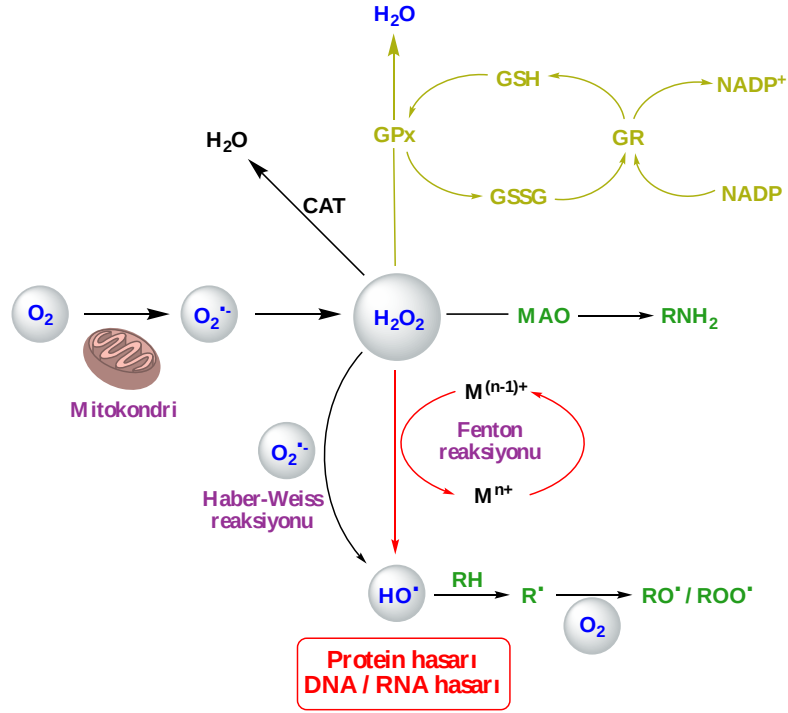
Amin/amino asit aktivatörlerinin bağlanması için kullanılan aktivatör bağlanma bölgesi, kumarin ve diğer inhibitörler tarafından da kullanılabilir [63]. Fenilalanin ve imidazol gibi bazı CA aktivatörleri, deney hayvanlarına uygulandığında sinaptik etkinlik, mekânsal öğrenme ve hafızanın gelişimini kanıtlamıştır. Bu çalışmalar, Alzheimer hastalığı veya yaşlanma gibi öğrenme ve hafızanın bozulmadığı koşullarda gerçekleşebilir [64]. Alzheimer hastalığından etkilenen hastaların beyinde CA II düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu bilgiler bilişsel fonksiyonlarda farklı CA izozimlerinin rolünü güçlü bir şekilde desteklemektedir [65].

CA II'nin en çok hedeflenen izoformlardan biri olmasıyla birlikte birçok CA aktivasyonu ilaç tasarımı için önemlidir. İlaç tasarımı kolaylaştıran durum, aktivatör bağlanma bölgesinin, kumarin (inhibitör) bağlanma bölgesi ile aynı olmasıdır. Bunun önemini *in vivo* olarak anlamak için CA aktivatörleri alanında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir [66].

1.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

İnsan için ve yaşayan birçok canlı tür için gerekli olan oksijen molekülü aynı zamanda havaya maruz kalan organik moleküllerin bozulmasından da sorumludur. Oksidatif stres, “oksidanlar ve antioksidanlar arasında, potansiyel olarak hasara yol açan dengesizlik” olarak tanımlanır. Birçok hastalıkta mevcut olan önemli bir biyokimyasal durumdur ve en çok iskemik inme ve romatoid artrit gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda belirgindir [67-69].

Ek olarak, kanserde, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve diabetes mellitus gibi nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin büyük rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif stres, başlıca reaktif azot türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), reaktif nitrojen oksijen türleri (RNOS) ve bağlanmamış adventif metal iyonlarından oluşan, olağan dışı yüksek konsantrasyonlarda toksik reaktif türlerin varlığı ile karakterizedir. Oksidatif stresin, merkezi sinir sisteminin çeşitli dejeneratif hastalıklarında ve hem mitokondriyal DNA'ya hem de diğer mekanizmalara zarar vererek normal yaşlanma sürecindeki birincil faktör olduğuna inanılmaktadır. Normal metabolik süreçler sırasında oluşan ROS, lipid peroksidlerin birikmesine yol açarak kolayca membran lipidlerin peroksidasyonunu başlatabilir. Böylece proteinler, lipitler ve DNA'daki lipoproteinleri içeren çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğünü tehdit edebilir [68].



Şekil 1.19. ROS oluşumu ve kaybı ile ilgili reaksiyonların gösterimi [70]

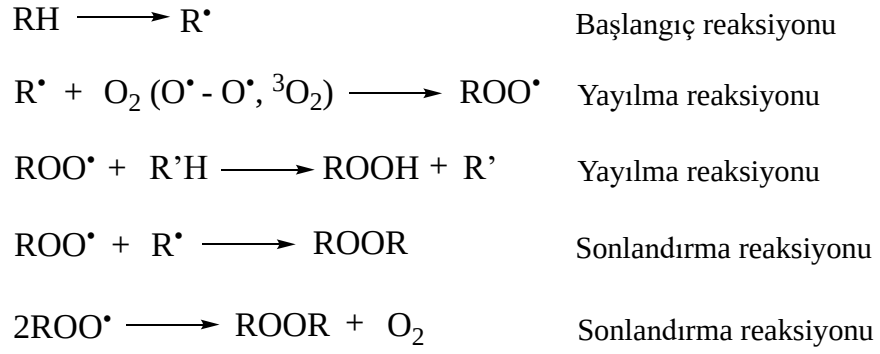
Moleküler oksijenden süperoksidin ($O_2^{\cdot-}$) oluşumu ya NADPH oksidaz kompleksi ya mitokondri sitokrom c peroksidaz ya da ksantin oksidaz tarafından gerçekleştirilir. GPx: Glutasyon peroksidaz, GR: glutasyon redüktaz, GSH: indirgenmiş glutasyon; GSSG: glutasyon disülfid veya oksitlenmiş glutasyon, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, MAO: monoamin oksidaz, RH: lipid. ROS'u oluşturan mekanizma ne olursa olsun, lipid ve DNA oksidasyonu gibi zararlı radikal reaksiyonlar meydana gelebilir ve biyolojik işlev bozuklukları meydana gelebilir [70].

Tablo 1.2. *Reaktif oksijen ve azot türleri [11, 71]*

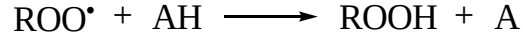
Reaktif Oksijen ve Azot Türleri			
Radikal olanlar	Molekül formülü	Nonradikaller	Molekül formülü
Peroksi	ROO [•]	Ozon	O ₃
Hidroksil	OH [•]	Hipoklorik asit	HOCl
Alkoksi	RO [•]	Hipobromik asit	HOBr
Hidroperoksi	HO ₂ [•]	Singlet oksijen	¹ O ₂
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Nitrik Oksit	NO [•]	Nitröz asit	NO ₂
Azot dioksit	NO ₂ [•]	Nitroksi anyonu	NO ⁻
Nitrozil katyonu	NO ⁺	Dinitrojen trioksit	N ₂ O ₃
Nitronyum katyonu	NO ₂ ⁺	Nitröz oksit	NO ₂
Lipid alkoksi	LO [•]	Peroksinitrit	ONOO ⁻
Tiyol radikali	RS [•]	Peroksinitröz asit	ONOOH
Lipid radikali	L [•]	Nitronyum katyonu	NO ₂ ⁺
Protein radikali	P [•]	Alkilperoksi nitritler	ROONO

1.3.1. Serbest radikaller ve ROS oluşumu

Bitkilerde genellikle moleküler oksijenin serbest radikallerle etkileşimini içeren fotokimyasal olmayan yollar, oksijen veya ROS içeren ve potansiyel olarak zararlı serbest radikal türlerinin üretilmesini sağlar [72, 73]. Bu tip reaksiyonlar doğrudan meydana gelebilir ya da bitki hücresinde normal olarak bulunan enzim katalizörleri (lipoksijenaz) ile desteklenebilir. Radikal olmayan ürünlerden organik serbest radikallerin oluşumu (genellikle karbon merkezli), otooksidasyonun başlangıç aşaması olarak adlandırılır. Genellikle yavaş olan bu süreç, bir radikal zincir reaksiyonunun karakteristik “gecikme periyodu” ile sonuçlanır. Reaksiyonun yayılma aşamasında, peroksi radikalleri, ROO birikmesi ve daha sonraki peroksi radikallerinin sağladığı hidrojen atomlarına sahip olan bileşikler (R'H) ile tepkimesi gerçekleşir. Yeni radikaller sonrasında moleküler oksijenle daha fazla reaksiyon için kullanılabilir. Son olarak, tüm oksijen veya aktif hidrojen türleri tükendiğinde, sonlandırma aşaması başlar. Bu aşamada, radikaller inaktif, radikal olmayan ürünler üretmek için birbirleriyle birleşir:



Hidrojen veren antioksidanlar, bir sonlandırma reaksiyonunda lipid peroksil radikalleri ile reaksiyona girebilir ve bu da yeni radikallerin oluşum döngüsünü kırar:



A, bir antioksidanı temsil eder. Bu durumda ortaya çıkan radikal, lipid peroksil radikalinden daha uzun bir yarı ömre sahiptir ve bu yüzden çok daha karardır. Bu da gerçek bir sonlandırma reaksiyonunun oluşma şansını artırır. Örneğin; flavonoidlerde bulunan hidroksil grupları hidrojen vermek için en önemlisidir [68].

1.3.2. Bazı reaktif oksijen türleri ve özellikleri

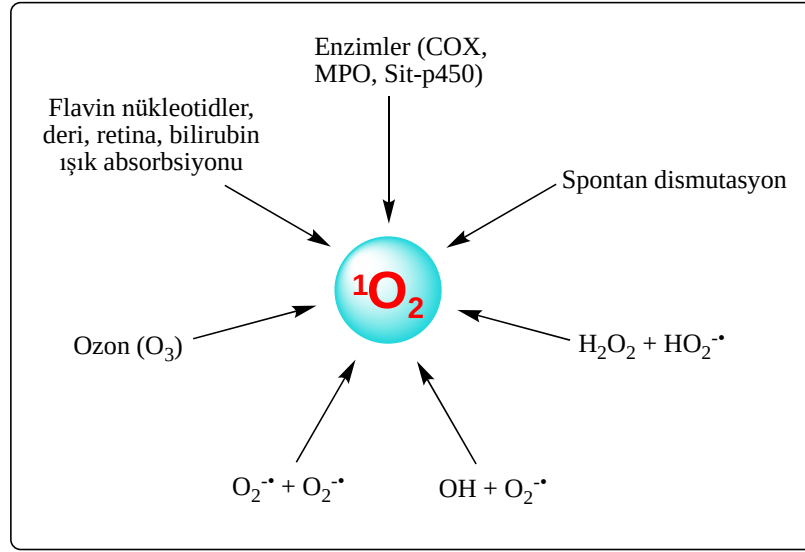
ROS, oksijenden türetilen kimyasal olarak reaktif bir dizi molekülleri içerir. Bu moleküllerin bazıları hidroksil radikali gibi son derece reaktifken, bazıları daha az reaktiftir (süperoksit ve hidrojen peroksit gibi) [74].

Tablo.1.3. Major ROS molekülleri ve metabolizması [74]

ROS molekülü	Ana kaynaklar	Enzim savunma sistemleri
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Elektron taşıma zincirinden elektronların sızması Aktif fagositler Ksantin oksidaz Flavoenzimler	Süperoksit dismutaz (SOD) Süperoksit redüktaz (bazı bakterilerde)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Süperoksit dismutaz (SOD) NADPH-oksidadaz (nötrofiller) Glukoz oksidaz Ksantin oksidaz	Glutasyon peroksidaz Katalazlar
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	H_2O_2 ile geçiş metalleri	Glutasyon
Nitrik oksit (NO)	Nitrik oksit sentaz	Peroksiredoksinler

Singlet oksijen (1O_2): Singlet oksijen (1O_2), enzimler dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan üretilir. Biyolojik sistemlerdeki ana oluşum mekanizması ise fotolanmış bileşiklerden gelen enerji transferidir. Singlet oksijenin yarılanma ömrü 10^{-6} s'dir ve normal triplet oksijen daha kararsızdır [75].

Biyolojik moleküllerin birkaç sınıfı ve enzim inaktivasyonunun olası sonuçlarına sahip birkaç amino asit, 1O_2 tarafından saldırıya yatkındır. Membran bozulması, 1O_2 'nin doymamış yağ asitleri ile reaksiyonundan hidroperoksitlerin oluşumuyla başlatılan lipid peroksidasyonuna bağlıdır. Nükleik asitler, özellikle DNA'daki guanin 1O_2 'ye karşı çok hassastır [76].



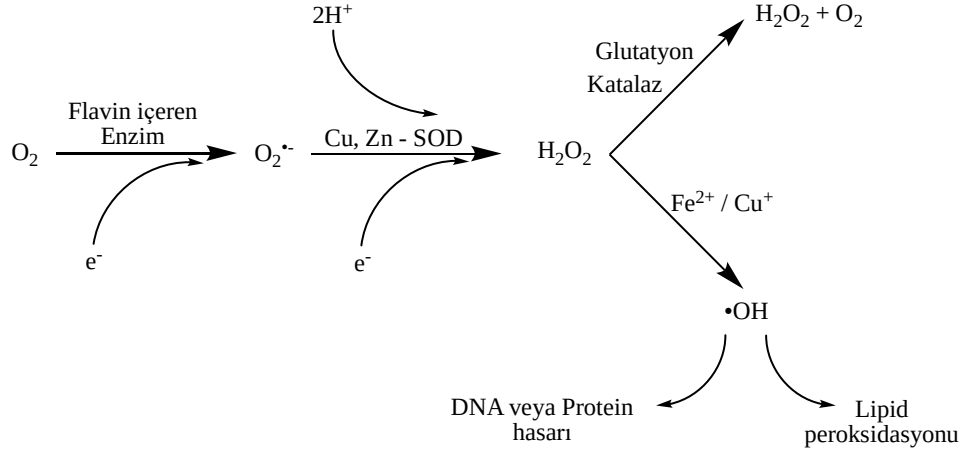
Şekil 1.20. Singlet oksijen oluşumu yolları [70]

Singlet oksijen radikal olmayan bir türdür, çünkü singlet oksijenin orbitallerinin içindeki elektronlar eşlenir. Bu nedenle, diğer reaktif oksijen türleri ile karşılaştırıldığında singlet oksijen toksik değildir. Dahası, insan organizmasında singlet oksijen mikroplar, virüsler ve kanser hücreleri gibi çeşitli patojenlere karşı terapötik potansiyele sahiptir [70].

Ozon (O₃): 3 oksijen atomundan oluşan molekül trioksijen olarak da tanımlanır. Canlılar tarafından üretilemez ve kuvvetli bir oksitleyicidir. Ozon UV ışını kullanılan yerlerde oluşabilir ve hava kirliliğine sebep olmaktadır. Biyomolekülerin oksidasyonu ve peroksidasyonuna doğrudan sebep olabilir. Ozonun akciğer işlevine zarar verebileceğini ve solunum sistemini tahriş edebileceğini gösteren çok sayıda kanıt vardır. Düşük ozon seviyeleri bile özellikle akciğer hastalığı olan çocuklarda ve yaşlılarda sağlık sorunlarına sebep olabilir. Ozona uzun süreli maruziyetin solunum yolu hastalığına yol açtığı ve ölüm riskini artırdığı gösterilmiştir [77].

Süperoksit anyon radikali (O₂^{•-}): Bir elektronun eklenmesiyle moleküler oksijenden oluşan süperoksit anyonu radikali, serbest radikal olmasına rağmen, yüksek oranda reaktif değildir. Lipit zarlarına nüfuz etme kabiliyetinden yoksundur ve bu nedenle üretildiği bölge içine kapatılmıştır. Süperoksit oluşumu, özellikle, solunum zinciri ile iç

mitokondriyal membranın çevresinde elektron bakımından zengin aerobik ortamda spontan olarak gerçekleşir [68].



Şekil 1.21. ROS oluşumu ve hücre içi düzeyde metabolizma için basitleştirilmiş şeması [68]

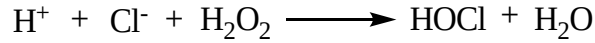
Süperoksit endojen olarak, flavoenzimler örneğin ksantin oksidaz tarafından üretilir. Diğer süperoksit üretim enzimleri lipooksijenaz ve siklooksijenazdır. İki süperoksit molekülü hızla hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşür ve bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) ile daha da hızlandırılır [68].

Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$): Nitrik oksit de serbest radikal ailesinin bir üyesini temsil eder ve birçok yönden süperoksit anyon radikale benzerdir, çünkü eşlenmemiş elektronu olmasına rağmen çoğu biyomolekülle reaksiyona girmez. Aynı zamanda $NO^{\bullet}$, diğer serbest radikallerle (örn. peroksi ve alkil radikalleri) kolayca reaksiyona girerek, esasen daha az reaktif moleküller meydana getirir. Dolayısıyla bir serbest radikal süpürücü olarak da işlev görür. Örneğin; $NO^{\bullet}$ 'in hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [68].

Her ne kadar az reaktif olsalar da paralel olarak büyük miktarlarda üretilen $NO^{\bullet}$ ve süperoksit birbiriyle reaksiyona girerek yüksek oranda sitotoksik olan $OONO^{\bullet}$ (peroksinitrit) oluşturur. Peroksinitrit çeşitli biyomoleküller ile doğrudan reaksiyona girebilir. Peroksinitrit, doğrudan veya reaksiyon ürünleri yoluyla düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) okside edebilir. Seruloplazmin'i yok ederek bakır iyonlarını serbest bırakır ve genellikle birçok enflamatuar hastalıkta gözlemlendiği gibi farklı proteinlerdeki tirozin kalıntılarına saldırır. ROS yüksek reaktiviteleri nedeniyle hasara neden olmaya

eğilimlidir ve dolayısıyla potansiyel olarak toksik, mutajenik veya kanserojendirler. ROS'nin hasar verici hedefleri DNA, lipitler ve proteinler gibi tüm önemli biyomolekül gruplarıdır [78].

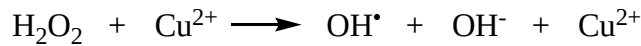
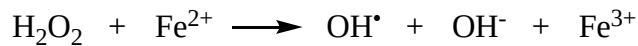
Hidrojen peroksit (H₂O₂): Hidrojen peroksit serbest radikal değildir, ancak biyolojik zarlara nüfuz edebilme yeteneğinden dolayı çok önemlidir. Kendi başına her ne kadar reaktif olmasa da bakır ve demir gibi metallerle reaksiyona girerek daha reaktif olan hidroksil (OH•) ve hipoklorik asit radikallerinin oluşumunda ara madde olarak görev alır [70].



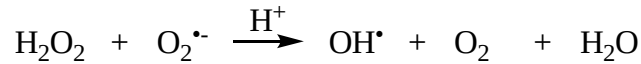
H₂O₂'nin bir başka önemli rolü de hücre içi sinyalleşme molekülü olmasıdır [68].

Hidroksil radikali (OH•): Biyomoleküller ile kuvvetli reaktivitesi nedeniyle, hidroksil radikali biyolojik sistemlere diğer ROS'lardan daha fazla ve kalıcı zararlar verebilir. Hidroksil radikali, Fenton ve Haber-Weiss diye isimlendirilen reaksiyonlarda H₂O₂'in indirgemesi sonucu oluşur [79].

Fenton reaksiyonları:



Haber-Weiss Reaksiyonları:



H₂O₂ aynı zamanda UV ışınlarına maruz kaldığında da hidroksil radikaline dönüşebilmektedir.



Peroksi ve Alkoksi radikalleri (ROO[•] ve RO[•]): Peroksi ve alkoksi radikalleri, moleküler oksijenin lipit radikalleri ile reaksiyona girmesiyle, hidroperoksitlerin (ROOH) ayrışmasıyla, ısı veya radyasyondan, ROOH'un metal iyonları ve H atomlarını ayırabilen diğer oksidanlarla reaksiyona sokulmasıyla oluşturulabilir [80].

En basit peroksil radikali, protonlanmış süperoksit formu olan hidroperoksi (HOO[•]) radikalidir. Peroksil ve alkoksil radikalleri orta derecede oksidasyon/indirgeme potansiyeli olan iyi oksitleyici ajanlardır. ROO ve RO'nin biyomoleküller ile reaksiyonları genellikle H-atomunun ayrılmasını içerir ve *in vivo* olarak lipit peroksidasyonunun başlatılması mekanizmaları ile ilgilidir. Elektron alan gruplar reaktiviteyi artırır (örneğin kloroperoksil radikali), oysa elektron veren gruplar reaktiviteyi azaltır (örneğin, fenoksil radikalleri). Aromatik ROO ve RO eşlenmemiş elektron delokalizasyonu nedeniyle daha az reaktif olma eğilimindedir [81].

1.4. Antioksidanlar

Organik moleküllerin bozulmasına sebep olan oksijen molekülünün meydana getirebileceği hasara engel olmak için vücudumuz tarafından bazı savunma sistemleri geliştirilir. Düşük oksidasyona sahip bir substrata kıyasla daha düşük konsantrasyonda bulunduğu bile bu maddenin oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden maddeler antioksidan olarak tanımlanır [82].

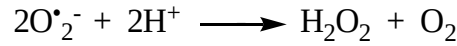
Antioksidan terimi çok kullanılan bir terimdir. Bir tahlil sisteminde etkili olan bir antioksidan, diğer tahlil sistemlerinde etkili bir antioksidan olmayabilir. Bu nedenle, bir antioksidanın toplam etkinliğini belirleyen tek bir analiz yoktur. Bir antioksidanın değerlendirilmesinde, etki mekanizmasına konsantre olması önemlidir. Serbest radikal üretmenin birçok yolu olduğu gibi, bir serbest radikalın bir antioksidan tarafından söndürülmesinin pek çok yolu vardır. Bu reaksiyonu etkileyebilen birçok faktör olduğu gibi, serbest radikallerin de neredeyse sonsuz muhtemel hedefleri olabilir. Antioksidan etki, aşağıdakileri içeren birkaç farklı kimyasal olayın bir kombinasyonundan kaynaklanabilir. Ayrıca, varsayılan bir antioksidanın sağlıkla ilgili etkileri, vücut tarafından ne kadar iyi emildiğine ve metabolize edildiğine bağlıdır [68].

1.4.1. Hücresel antioksidan enzim sistemleri

Antioksidan aktivite yaşamakta olduğumuz güçlü oksitleyici ortama karşı koymak için hayati önem taşır. Mutajenez, karsinogenez ve yaşlanma gibi birçok biyolojik fonksiyon antioksidatif etkilere bağlıdır. Birçok bitki materyalinin antioksidan aktiviteleri yakın zamanda tanımlanmıştır. Çeşitli kronik rahatsızlıklarda etkili bir rol oynadığı düşünüldüğü için biyolojik sistemlerde oksijen içeren serbest radikallere olan ilgi artmıştır. Buna göre, bunları içeren organizmaların hücrelerinde ve etki mekanizmalarında doğal olarak oluşan antioksidanların, koruyucu biyokimyasal fonksiyonları üzerinde durulmaktadır [68].

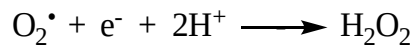
Hücreleri ve organizmaları aşırı ROS oluşumunun ölümcül etkilerinden korumak için çalışan antioksidan enzim sistemlerinin bazıları şunlardır:

SOD, keşfedilen ilk gerçek ROS’u metabolize edici enzimdir. SOD, süperoksidin ($O_2^{\cdot -}$) hidrojen peroksit’e ve oksijene dönüşümünü katalize eder. SOD ile katalize edilen reaksiyonda iki süperoksit molekülü, H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluşturur ve dolayısıyla bir hücresel hidrojen peroksit kaynağıdır.



Süperoksit, mitokondride solunum zincirinden elektron sızıntısına bağlı olarak nispeten yüksek konsantrasyonlarda oluşur. Hem SOD hem de katalaz aktivitesinin bütün bitkilerinin yapraklarında azaldığı ve bunun da membran hasarı belirtileri gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu iki enzimin aktivitesi ile yapraklardaki lipid peroksidasyon derecesi arasında bir ilişki vardır. Her iki enzim de, yaprakların lipid tahribatının zararlı etkilerinden korunması için önemli maddelerdir [83].

Süperoksit Redüktaz (SOR): Son yıllarda, süperoksitin doğrudan indirgenmesini katalize eden yeni bir süperoksit süpürücü enzim türü keşfedilmiştir:

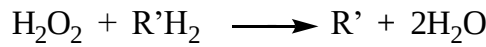


Bu enzimler demir içerir ve bugüne kadar sadece anaerobik sülfat indirgeyen bakterilerde bulunmuştur [84].

Katalaz: Birçok organizmanın katalazları, esas olarak hem (demir içeren prostetik grup) içeren enzimlerdir. Katalaz hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ettiği peroksizomlarda bulunur:



Ayrıca katalaz, hidrojen peroksidin indirgenmesi yoluyla farklı substratları, fenoller ve alkoller detoksifiye etme işlevlerine sahiptir:



Katalazın bir başka antioksidatif rolü, Cu veya Fe iyonları tarafından katalize edilen fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksitten hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) oluşumu riskini azaltmaktır. Katalaz, enzimi inaktivasyondan koruyan ve etkinliğini artıran NADPH'yi bağlar [74].

Peroksiredoksin: Peroksiredoksinler (tioredoksin peroksidazlar) peroksitleri, örneğin hidrojen peroksit ve farklı alkil hipoksitleri doğrudan inhibe edebilmektedirler [85].

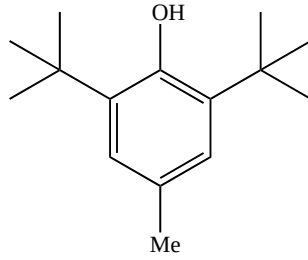
Glutasyon peroksidaz: Bir tiyol grubunu taşıyan tripeptit olan glutasyon (GSH), birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Okside edilmiş form olan glutasyon disülfid, GSSG olarak bilinen bir disülfidi oluşturmak için; H_2O_2 ve diğer peroksitler (örn: hücre zarındaki lipid peroksitler) gibi birçok oksidan ile reaksiyona girer:



Yukarıdaki reaksiyon, memeli hücrelerinde önemli bir enzim olan ve selenyum içeren glutasyon peroksidaz tarafından katalize edilir. Bazı veriler, glutasyon peroksidazların fizyolojik koşullar altında yüksek antioksidan öneme sahip olduğunu, diğer enzimlerin ise yalnızca oksidatif stres olaylarında önemli olduğunu göstermiştir [68].

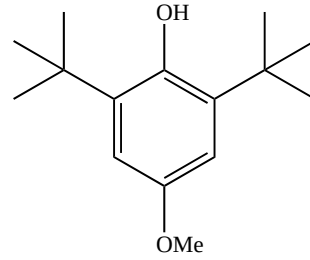
1.4.2. Bitkilerin doğal antioksidanları

Butillenmiş hidroksitoluen (BHT 1) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA 2) gibi sentetik antioksidanlar gıdalarda kısıtlı kullanımlara sahiptir ve kanserojen olduğu şüphesi vardır [86].



2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol, BHT

1



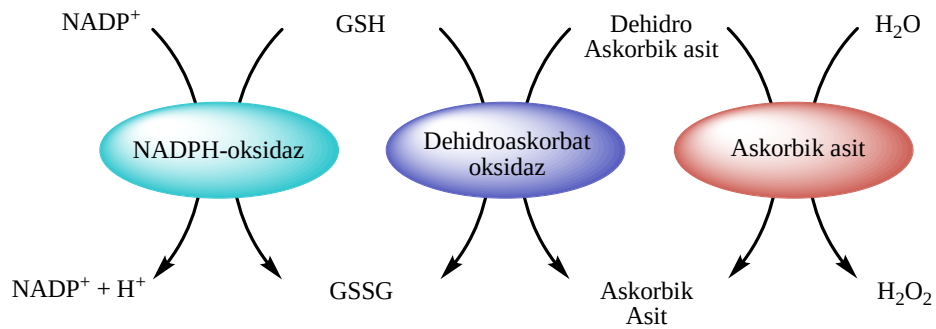
2,6-di-tert-butyl-4-methoxy phenol, BHA

2

Bu nedenle, özellikle son yıllarda bitki kaynaklı doğal antioksidanların araştırılması büyük ölçüde artmıştır.

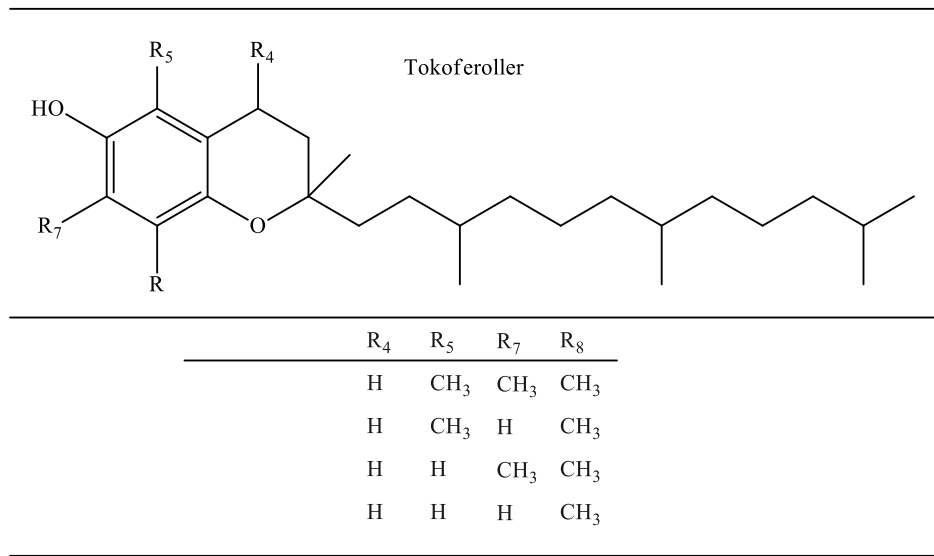
Yaygın olarak kullanılan doğal antioksidan bileşikler şunlardır:

Askorbik asit (Vitamin C): Askorbik asit, uzun bir süre biyolojik bir antioksidan olarak önerilmiştir. Kloroplastların stroması gibi birçok hücresel ortamda oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Askorbat suda çözünürdür ve insan plazmasında olduğu gibi hücre zarlarında da önemli bir antioksidandır. Askorbat ayrıca hücre zarlarındaki lipidleri de bu mekanizma ile korur. Hücre içinde sulu fazda askorbat ve glutatyon, hücreyi oksidatif hasara karşı korumak üzere hareket ederler [68].



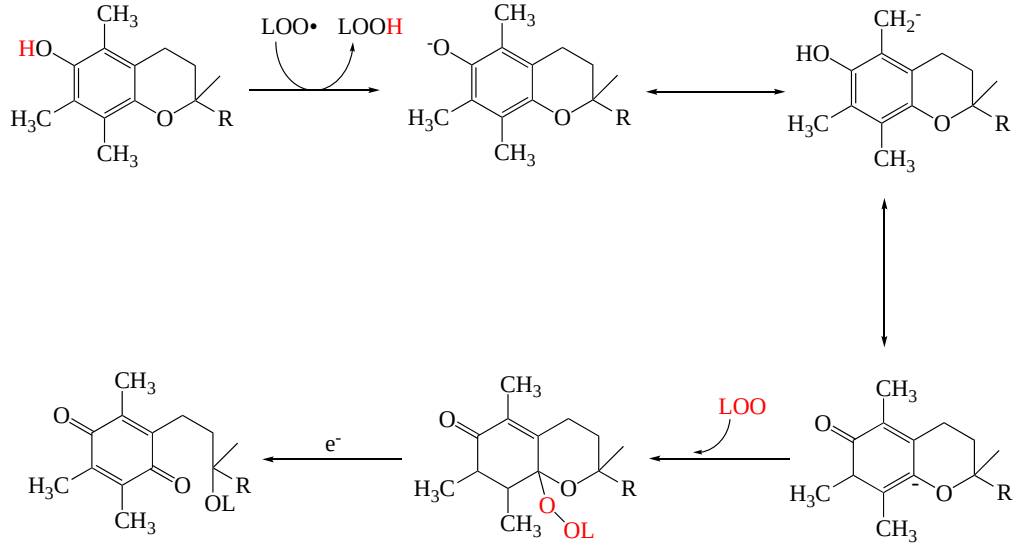
Şekil 1.22. Askorbik asitin dehidroaskorbata dönüşüm mekanizması [75]

Vitamin E: E Vitamini, süperoksit gibi peroksitleri ve ROS'u azaltır. Vitamin E, lipit peroksi radikalleri ile tepkimeye sokulduktan sonra oluşturulan α -tokoferol radikallerini azaltarak, plazma lipoproteinlerinde (LDL) lipid hidroperoksit oluşumunu önlemeye hizmet eder. Bu, aterosklerotik plak oluşumunun önlenmesinde önemli bir işlevdir. Bu bileşikler sadece bitkilerde değil, aynı zamanda memeli dokularında da meydana gelir. Dört majör tokoferolün en biyolojik olarak aktif olanı α -TOH'dur. α -TOH, biyolojik membranlarda bulunan lipitte çözünür bir vitamindir. Eşlenmemiş elektronlarla reaksiyona girdiği ve peroksil radikallerini azaltabildiği bir hidroksil grubu içerir [68].



Şekil 1.23. Tokoferollerin sınıflandırılması [75]

α -TOH, bağırsakta emilir ve şilomikronlarda karaciğere nakledilir. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) partiküllerinde, lipoprotein lipazın LDL'ye indirgenmiş olduğu kanın içine geri döndürülür. Oksitlenebilir lipit moleküllerinin bolluğunun aksine, her LDL'de sadece 5-10 α -TOH molekülü vardır [68].



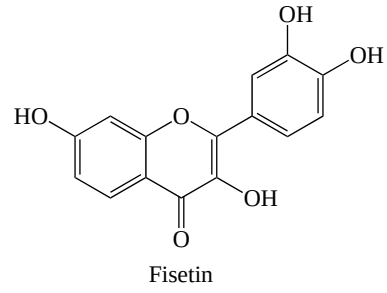
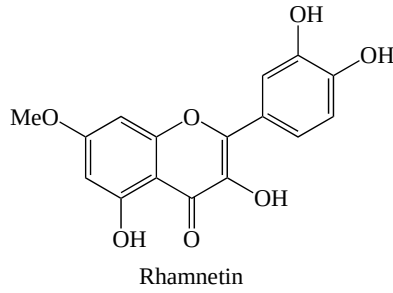
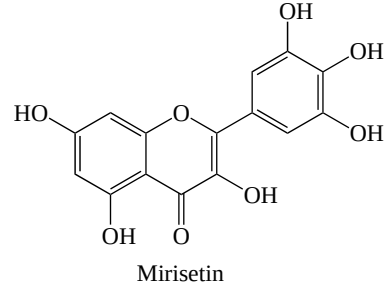
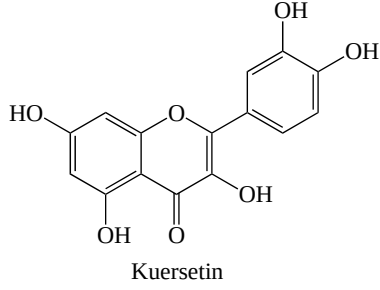
Şekil 1.24. α -Tokoferolün radikal giderme mekanizması [75]

Flavonoidler: Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak görülen (4000'den fazla flavonoid izole edilmiş) ve sıklıkla insan diyeti bileşikleri olan difenil propanlardır. Flavonoidlerin yakın aile üyeleri; flavonları, izoflavonları ve 2,3-dihidro türevlerini içerir. LDL'nin oksidatif modifikasyonunun insan aterosklerozunun gelişiminde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür. Böylece LDL'nin flavonoidler gibi bileşikler ile oksidasyondan korunması, hastalığın ilerlemesini geciktirmek veya önlemek için etkili olabilir. Biyolojik aktiviteye sahip bazı flavonoidlerin anti-iskemik, anti-trombosit, anti-enflamatuar ve anti-lipoperoksidant aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Flavonoidlerin ayrıca 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz, monooksijenaz veya ksantin oksidaz gibi oksidasyon sistemlerinde yer alan çok çeşitli enzimleri inhibe ettiği bulunmuştur [68].

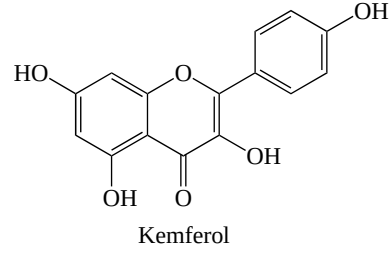
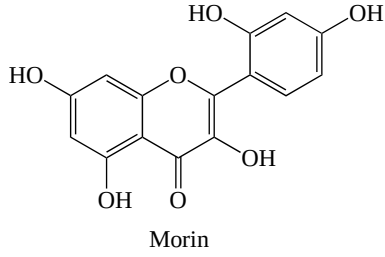
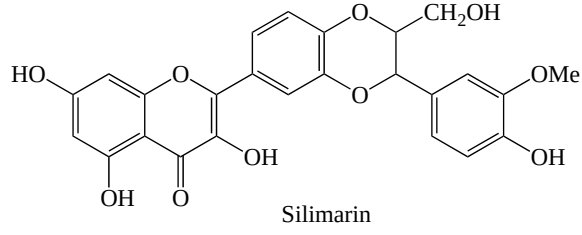
Flavonoidler, antioksidan aktivitelerini; örneğin radikalleri temizleyerek, metal iyonlarını bağlayarak ve serbest radikal oluşumundan sorumlu enzimatik sistemleri inhibe ederek çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirebilirler. Faydalı etkilerin aksine, bazı flavonoidlerin (örneğin, kuersetin) mutajenik ve karsinojenik olduğu görülmüştür. Bu zararlı etkiler, metal iyonlarının varlığında belirli koşullar altında serbest radikaller üreten flavonoidlerin peroksidan aktivitesine dayandırılabilir [87].

Flavonoidler, bitki aleminde özellikle yapraklarda, çiçekli dokularda ve polenlerde yaygındırlar. Ayrıca saplar ve kabuklar gibi odunsu kısımlarda bol miktarda bulunurlar. Çeşitli flavonoid sınıfları, kolayca oksitlenebilen birtakım bileşiklere karşı antioksidan aktivite gösterir. Flavonoidin antioksidan etkinliği kolayca oksitlenebilen lipit-linolenik

asit ve β -karoten içeren bir test sisteminde ölçülür. En yüksek aktivitenin üç hidroksil grubuna sahip serbest flavonoller olan mirisetin ve robinetin'de olduğu görülmüştür. Daha düşük de olsa aktivite gösteren diğer bileşikler; kuersetin, dihidrokuersetin, rhamnetin ve fisetin'dir [68].

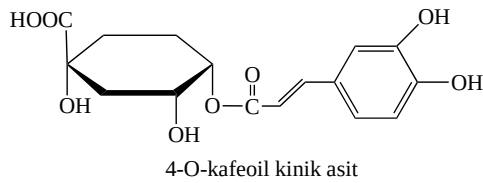
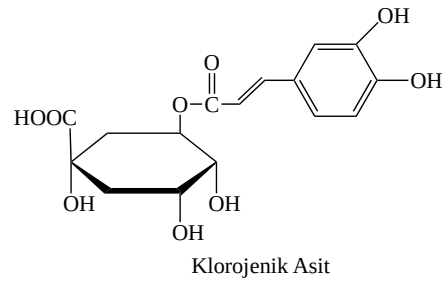
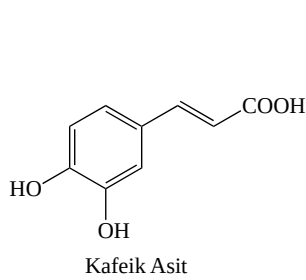


Silimarin, mikrozomal ve mitokondriyal lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesinde eşit derecede etkili olmuştur. Bir dizi flavonoid, oda sıcaklığında karanlıkta emülsiyon haline getirilmiş linolenik asit ve metil linoleatın oto-oksidasyonu için inhibitörler olarak test edildiğinde, en yüksek aktiviteye sahip iki bileşiğin morin ve kemferol olduğu bulunmuştur. Flavonoidlerin aktivitesi, yağ asidi türevinden türetilen peroksi radikaline bir hidrojen atomu verme yeteneğine bağlıdır.

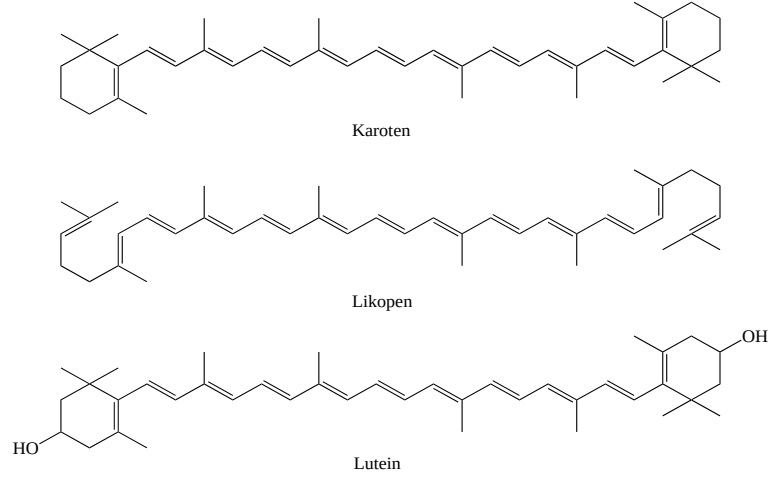


Flavonoidlerin lipooksijenaz ve prostaglandin sentetaz enzimlerinin güçlü inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda çoklu doymamış yağ asitlerini oksijen içeren türevlere dönüştürür. Her iki enzime karşı en yüksek aktiviteyi luteolin (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon) ve 3',4'-dihidroksiflavon göstermiştir [68].

Fenolik asit: Fenolik grupları içeren asidik bileşikler, aktif antioksidanlar olarak gösterilmiştir. Kafeik asit, klorojenik asit ve 4-O-kafeoil kinik asit içeren izomerler ilk olarak patateslerden izole edilmiştir. Klorojenik asit, bitki ekstraktında en fazla bulunan fenolik asit ve aynı zamanda en aktif antioksidandır. Steroller ve triterpen alkolleri ile kafeik asit esterleri ise *Phalaris canariensis* çimi tohumundan izole edilmiştir [68, 87].

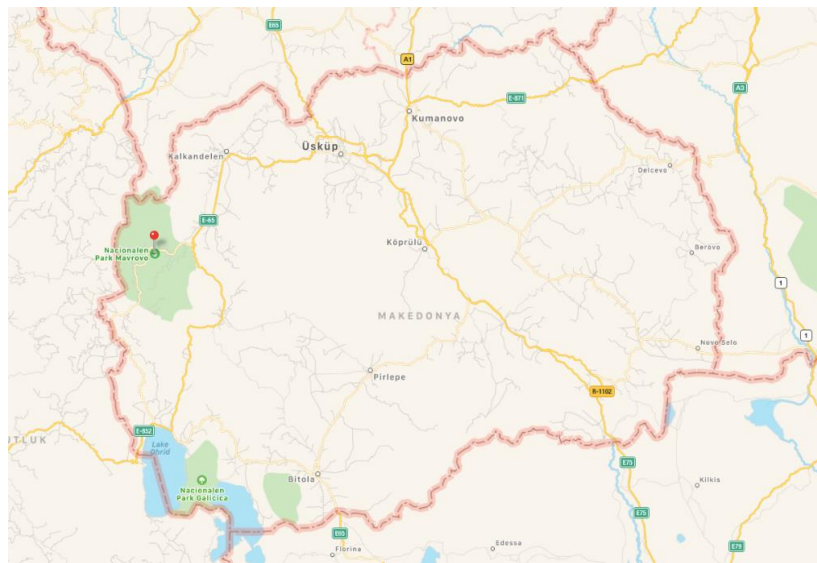


Karotenoidler: Karotenoidler, patates, havuç, ıspanak, kırmızı biber, domates ve brokoli gibi bitkilerde yaygın olarak bulunan sarı veya turuncu pigmentlerdir. Karotenoidlerin, β -karoten, likopen ve lutein dahil olmak üzere çeşit formu mevcuttur [68, 88].



1.5. Bitkiler

Makedonyanın farklı bölgelerinden toplanan bitkiler, ekstraları hazırlanmadan önce Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalında teşhis edildi. Teşhis edilen bitkiler için sırasıyla, *E. arvense* 15423, *O. vulgare* 15427, *A. millefolium* 15426, *A. absinthium* 15424 ve *H. perforatum* için 15425 Esse numaraları verildi.



Şekil 1.25. Bitkilerin toplandığı bölge

1.5.1. Tarla atkuyruğu (*Equisetum arvense*)

1.5.1.1. Bilimsel sınıflandırma

Tablo 1.4. *Equisetum arvense* bilimsel sınıflandırma

Alem	Bitkiler
Bölüm	Pteridophyta
Sınıf	Equisetopsida
Takım	Equisetales
Familya	Equisetaceae
Cins	Equisetum
Tür	<i>E. Arvense</i>



Şekil 1.26. *Equisetum arvense* bitkisinin görünüşü [89]

1.5.1.2. Genel özellikleri

Tarla atkuyruğu (*Equisetum arvense*), atkuyruğugiller familyasında yer alan, kuzey yarımkürede yetişen bir bitkidir. Güneydoğu Avrupa ve Asya güneyi, Türkiye, İran, Çin genelinde, Kore ve Japonya hariç olmak üzere Kanada, ABD genelinde *Equisetum* türleri yaygın olarak bulunur [89]. *Equisetum* familyası 30 farklı türden oluşur ve çok yıllık bitki türü olarak bilinir. Boyları 10-30 cm arasında olup ilkbahar mevsiminde yetişir, nisan ve

mayıs ayından itibaren yeşil rengini alırlar. *Equisetum arvense* tüberküloz, böbrek ve mesane bölgesi iltihabı gibi durumların tedavisinde folklorik ilaç olarak uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Ayrıca romatizmal hastalıklar ve zor iyileşen yaralar için de faydalı olduğu görülmüştür. Ancak uzun süreli kullanımda sindirim problemi ve toksik etki oluşturabileceği görülmüştür [90].

1.5.1.3. Toplanması ve kurutulması

Atkuyruğu otu mayıs ayında bitki yaprakları tam olarak yeşillendiğinde kökü toprakta kalacak şekilde sap kısmından kesilir. Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Tez kapsamında kullanılacak olan atkuyruğu bitkisi Makedonya'nın Mavrovo bölgesinden (koordinatı; enlem: 41°40'21,9", boylam: 20°45'40,1") toplanmıştır.

1.5.2. Keklik otu (*Origanum vulgare*)

1.5.2.1. Bilimsel sınıflandırma

Tablo 1.5. *Origanum vulgare* bilimsel sınıflandırma

Alem	Bitkiler
Bölüm	Angiosperms
Sınıf	Asterids
Takım	Lamiales
Familya	Lamiaceae
Cins	Origanum
Tür	<i>O. Vulgare</i>



Şekil 1.27. *Origanum vulgare* bitkisinin görünüşü [91]

1.5.2.2. Genel özellikleri

Keklik otu (*Origanum vulgare*), *Lamiaceae* ailesine ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Bu bitki ailesi Akdeniz, Avrupa, Sibiry, Kuzey Afrika ve ılıman iklimdeki birçok Asya ülkesinde yetişmektedir. Keklik otu keskin kokulu yapraklara ve mor renkli çiçeklere sahip aromatik bir bitkidir [91]. Çiçek açma dönemi nisan mayıs aylarıdır. Keklik otu 20-80 cm aralığında bir uzunluğa sahip olup çiçekleri yaklaşık 4 cm uzunluğundadır [92]. Keklik otu doğal antioksidanların üretimi için en çok tercih edilen bitki türüdür [93]. Soğuk algınlığı, öksürük, deri hastalıkları ve sindirim bozuklukları gibi durumlarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır [94].

1.5.2.3. Toplanması ve kurutulması

Keklik otu mayıs ayında çiçek açtığında kökü toprakta kalacak şekilde sap kısmından kesilir. Çiçek ve sap kısımları ayrılmaksızın kullanılır. Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Tez kapsamında kullanılacak olan Keklik otu Makedonya'nın Mavrovo bölgesinden (koordinatı; enlem: 40°39'30,9", boylam: 20°43'38,5") toplanmıştır.

1.5.3. Civanperçemi (*Achillea millefolium*)

1.5.3.1. Bilimsel sınıflandırma

Tablo 1.6. *Achillea millefolium* bilimsel sınıflandırma

Alem	Bitkiler
Bölüm	Angiosperms
Sınıf	Asterids
Takım	Asterales
Familiya	Asteraceae
Cins	Achillea
Tür	<i>A. Millefolium</i>



Şekil 1.28. *Achillea millefolium* bitkisinin görünüşü [95]

1.5.3.2. Genel özellikleri

Civanperçemi genel olarak Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika’da yetişen çok yıllık bir bitkidir. Sindirim, diyaforetik, balgam söktürücü, hemostatik, spazmotik hastalıklar ve hazımsızlık gibi hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılır. Civanperçemi beyaz renkli çiçeklere ve tüylü yapraklara sahip, papatyagiller ailesine ait kendine özgü kokusu olan bir bitkidir. Boyu 20 cm ile 1 metre aralığında değişen bitkinin aynı zamanda en eski tıbbi bitkilerden biri olduğu varsayılır [95].

1.5.3.3. Toplanması ve kurutulması

Civanperçemi, temmuz ayında bitkinin çiçekleri tam olarak açılmadan kökü toprakta kalacak şekilde sap kısmından kesilir. Çiçek ve sap kısımları ayrılmaksızın kullanılır. Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Tez kapsamında kullanılacak olan civanperçemi Makedonya'nın Mavrovo bölgesinden (koordinatı; enlem: 41°40'32,3", boylam: 20°47'08,0") toplanmıştır.

1.5.4. Pelin otu (*Artemisia absinthium*)

1.5.4.1. Bilimsel sınıflandırma

Tablo 1.7. *Artemisia absinthium* bilimsel sınıflandırma

Alem	Bitkiler
Bölüm	Angiosperms
Sınıf	Asterids
Takım	Asterales
Familiya	Asteraceae
Cins	Artemisia
Tür	<i>A. Absinthium</i>



Şekil 1.29. *Artemisia absinthium* bitkisinin görünüşü

1.5.4.2. Genel özellikleri

Pelin otu, *Asteraceae* ailesine ait Anadolu'nun her bölgesinde yetişebilen çok yıllık bir bitkidir. Bitkinin boyu 120 cm uzunluğuna ulaşırken temmuz ve ağustos aylarında küçük sarımsı çiçek açarlar. Kullanımı sonucu bitkinin iştah açıcı, kuvvet verici ve ateş düşürücü gibi etkilerinin yanı sıra cilt kazalarında ve böcek ısırıklarında yara iyileştirici etkisi olduğu da gözlenmiştir. Tadı oldukça acı olan bitki ilaç yapımında kullanılırken, aşırı dozda kullanımı da mental durum değişikliğine, nöbetlere ve böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlara neden olabileceği gözlemlenmiştir [96].

1.5.4.3. Toplanması ve kurutulması

Pelin otu, haziran ayında bitkinin çiçekleri tam olarak açılmadan kökü toprakta kalacak şekilde sap kısmından kesilir. Çiçek ve sap kısımları ayrılmaksızın kullanılır. Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Tez kapsamında kullanılacak olan pelin otu Makedonya'nın Mavrovo bölgesinden (koordinatı; enlem: 41°40'32,3", boylam: 20°47'08,0") toplanmıştır.

1.5.5. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*)

1.5.5.1. Bilimsel sınıflandırma

Tablo 1.8. *Hypericum perforatum* bilimsel sınıflandırma

Alem	Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Malpighiales
Familya	Hypericaceae
Cins	Hypericum
Tür	<i>H. Perforatum</i>



Şekil 1.30. *Hypericum perforatum* bitkisinin görünüşü [97]

1.5.5.2. Genel özellikleri

Sarı kantaron, *Hypericaceae* ailesine ait dünyanın birçok yerinde yetişen ve yaygın olarak kullanılan çok yıllık bir bitkidir. Bitki haziran ile eylül ayları arasında yetişir ve özellikle çiçek ve tomurcuk kısımları yaygın olarak kullanılır. Özellikle geçmiş yıllarda çiçek kısımları zeytinyağında bekletildikten sonra yara ve yanık iyileştirici olarak kullanılmıştır. Avrupa ve Amerika'da ruhsal bozukluklarda tedavi edici antidepresan ilaç olarak kullanılmaktadır. Bitkinin klinik deneylerde de antidepresan etkisi olduğu ispatlanmıştır. Düzenli kullanımında melatonin salınımını arttırdığı ve dolayısıyla uyku sorununu giderdiği gözlemlenmiştir. Alkol ve sigara bağımlılığı tedavisinde de etkisi olduğu görülmüştür [97]. Antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı kullanımı yaygındır [98]. Bitkiyi kullanan bazı kişilerde sindirim bozukluğuna ve alerjik reaksiyona rastlanmıştır. Ayrıca aşırı kullanımı saç kaybına sebep olabilir [99].

1.5.5.3. Toplanması ve kurutulması

Sarı kantaron, eylül ayında bitki tam olgunluğa ulaşınca kökü toprakta kalacak şekilde sap kısmından kesilir. Güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Tez kapsamında kullanılacak olan sarı kantaron Makedonya'nın Mavrovo bölgesinden (koordinatı; enlem: 41°40'32,3", boylam: 20°47'08,0") toplanmıştır.

1.6. Çalışmanın Amacı

Oksidanlar ve antioksidanlar arasında potansiyel olarak zarara yol açan aralarındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, birçok hastalıkta mevcut olan önemli bir biyokimyasal durumdur ve en çok iskemik inme ve romatoid artrit gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda belirgindir [67, 68]. Ek olarak, kanserde ve ailesel amiyotropik yanal skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve diabetes mellitus gibi nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin rol oynadığı düşünülmektedir. Oksidatif stres, başlıca reaktif azot türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), reaktif nitrojen oksijen türleri (RNOS) ve bağlanmamış adventif metal iyonlarından oluşan, olağan dışı yüksek konsantrasyonlarda toksik reaktif türlerin varlığı ile karakterizedir. Oksidatif stresin, merkezi sinir sisteminin çeşitli dejeneratif hastalıklarında ve hem mitokondriyal DNA'ya hem de diğer mekanizmalara zarar vererek normal yaşlanma sürecindeki birincil faktör olduğuna inanılmaktadır [69].

"Antioksidan" terimi, biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyen veya inhibe eden enzimatik ve enzimatik olmayan kompleksleri ifade eder. Enzimatik olmayan ana antioksidanlar, esas olarak sebze ve meyvelerde bulunan biyolojik bileşiklerdir. Bu konuda yapılan çalışmalar, kardiyovasküler hastalık ortamında yüksek oranda meyve ve sebze alımını desteklemektedir ve bunların oksidatif strese ve iltihapta modüle edici bir etkiye sahip olduklarına işaret etmektedir [68].

Antioksidanlar vücuttaki güçlü serbest radikal toplayıcılarıdır, serbest radikaller ise vücutta dolaşan ve vücut hücrelerine zarar veren süperoksit, hidroksil radikali veya singlet oksijen gibi oldukça reaktif kimyasal maddelerdir. Beslenmede antioksidan içerik olarak zengin gıdaların tercih edilmesi serbest radikallerin giderilmesini sağlar. Çoğu meyve sebze de bulunan antioksidanlar insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. BHA, BHT, α -Tokoferol ve Trolox gibi doğal olmayan antioksidanların kullanımının gün geçtikçe azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni de çeşitli yan etkilerinin (karsinojenik ve mutajenik etkiler gibi) olduğu bilinmesidir [100].

Oksidatif stresin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ciddi bir sorun haline gelmiştir. Soruna bir çözüm olarak, doğal bitki kaynaklarında bulunan antioksidan bileşiklerle besin takviye edilmesidir. Fenolik bileşikler, kolayca oksitlenebilen birtakım bileşiklere karşı antioksidan aktivite gösterir. Meyve ve sebze de, çayda, tahıl tanelerinde doğal olarak bulunan ve sağlık üzerinde olumlu etkiye sahip olan antioksidan bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitki aleminde özellikle yapraklarda, çiçekli dokularda

ve polenlerde yaygındırlar. Ayrıca saplar ve kabuklar gibi odunsu kısımlarda bol miktarda bulunurlar.

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda tarla atkuyruğu, keklik otu, civanperçemi, pelin otu ve sarı kantaron bitkilerinin fenolik içeriğinin aydınlatılması, antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan eritrositlerinden saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1), karbon dioksitin bikarbonat haline geri döndürülebilir hidrasyonu için etkili katalizörler olarak işlev gören ve aktif bölgesinde çinko iyonu bağlı enzimlerdir. Şimdiye kadar memelilerde 16 farklı α -CA izoformu izole edilmiş ve bunların önemli fizyolojik rolünün olduğu ortaya konmuştur. Bu izoformlardan CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII sitosolik, CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV membrana bağlı, CA VA ve CA VB mitokondriyaldir. CA ile ilgili proteinlerin (CARP) üç nonkatalitik formu da bilinmektedir; bunlar CARP VIII, CARP X ve CARP XI. α -CA'ların katalitik mekanizması ayrıntılı olarak anlaşılmıştır ve literatürde aktif bölgenin, üç histidin kalıntısı ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edilen bir Zn (II) iyonundan oluştuğu ifade edilmektedir. CA'lar metal kompleks anyonları ve sülfonamidler/sülfamatlar/sülfamitler olmak üzere esas olarak iki bileşik sınıfı tarafından inhibe edilirler. Organizmaların dokularında bulunan CA'lar tarafından metabolize dokular ve akciğerler arasında CO₂/bikarbonatın solunum ve taşınması, pH ve CO₂ homeostazı, çeşitli dokularda/organlarda elektrolit sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar (örn: glukoneojenez ve ürejenez) ve CO₂ fiksasyonu gibi önemli fizyolojik ve fizyopatolojik fonksiyonlar gerçekleştirilir. Enzimin bu kadar çok dokudaki ve farklı izoformlardaki varlığı, biyomedikal uygulamalarla inhibitörlerin tasarımı için ilgi çekici bir hedeftir [28].

Karbonik anhidrazlar, karbondioksitin bikarbonat haline dönüşümünü katalizleyen bir grup izoenzimdir. Bu izoenzimler, solunum, kemik metabolizması, idrar, safra, pankreas suyu, mide salgısı, tükürük, aköz mizah, beyin-omurilik sıvısı ve ter dahil olmak üzere vücut sıvılarının oluşumundaki fizyolojik süreçlere katılırlar. İnsanlarda çeşitli karbonik anhidraz izoformları tanımlanmıştır, ancak bunların tam fizyolojik rolü ve işlev bozukluğunun sonuçları çoğunluğunda bilinmemektedir. Karbonik anhidraz, romatizmal hastalıklarda kemik ve yumuşak doku kalsifikasyonu dahil olmak üzere insan dokularının kalsifikasyonunda rol oynar. Bunun yanı sıra enzimin, safra ve böbrek taşı oluşumu ve karsinoma ile ilişkili mikrokalsifikasyonlarda da rol oynadığı düşünülmektedir [101].

Antioksidan bileşikler, işleme ve depolama sırasında gıda, ilaç ve eczacılık ürünlerinin bozulmasının başlıca nedenlerinden biri olan lipid peroksidasyon sürecini geciktirerek serbest radikalleri bertaraf edebilir ve raf ömrünü uzatabilirler. Düşük oksidasyona sahip bir substrata kıyasla daha düşük konsantrasyonda bulunduğu bile bu maddenin oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden maddeler

antioksidan olarak tanımlanır. Başlıca antioksidan bileşikler, sağlık yararlarından sorumlu olan fenolik ve flavonoidlerdir. Fenolün fenil kısmının, CA'nın aktif bölgesine hidrofobik bölümün bağlandığı belirlenmiştir. Burada CA'ların fizyolojik substratı olan CO₂'in ön katalitik kompleks için bağlandığı ve böylece fenolün CO₂ ile yarışmalı inhibitör olarak davrandığı görülmüştür. Bu yönüyle fenolik bileşikler ve asitler özellikle CA I ve II izoenzimleri için etkili inhibitörler geliştirilmek üzere potansiyel olarak kullanılabilirler [11].

Karbonik anhidraz I, keşfedilen ilk CA izoformlarından biri olmasına rağmen, fizyolojik ve patolojik işlevleri hala tam olarak anlaşılamamıştır. CA I, birincil transkriptinin 261 rezidü içerdiği 260 rezidüden oluşan bir tek zincirdir. hCA I izoenzimi 30 kDa büyüklüğünde bir proteindir. CA I eritrositlerde bol miktarda bulunur, fakat aynı zamanda vücudun böbrek, gastrointestinal sistem (özellikle kolon), akciğerler, beyin ve gözler gibi diğer kısımlarında da bulunmaktadır. CA I, CA II izoformundan daha az aktiftir, ancak dokularda daha yaygın olarak bulunur. Ayrıca CA I, solunum ve asit/baz homeostazının düzenlenmesi de dahil olmak üzere farklı biyolojik işlevlerde de görev almaktadır [102].

Baskın fizyolojik fonksiyonlara sahip CA II izoformu ilk olarak 80 yıl önce kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiştir. Daha sonra CA II'nin tüm omurgalılarda çok sayıda hücre, doku ve organda bulunan sitozolik izoformlarının olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında insan CA II'si (hCA II), kanda çok bol miktarda bulunduğu ve CO₂'nin bikarbonat ve protonlara dönüştürülmesi için çok yüksek bir katalitik aktiviteye sahip olduğu için, karbon dioksit/bikarbonatın üretildiği dokulardan akciğerlere taşınmasında rol oynar. Diğer işlevleri arasında, idrar oluşumu ve böbrek tübüllerindeki bikarbonat reabsorpsiyonu, glukoneogenez, lipogenez ve üregenez, kemik rezorpsiyonu ve kalsifikasyon gibi biyosentetik reaksiyonlar ve muhtemelen diğer pek çok fizyolojik/patolojik süreçlerde yer alır [103].

Oksidatif stres vücutta meydana gelen normal bir olgudur. Normal koşullar altında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) fizyolojik olarak önemli hücre içi seviyeleri, *in vivo* redoks homeostazına katılan çeşitli enzim sistemleri tarafından düşük seviyelerde tutulur. Bu nedenle oksidatif stres, vücuttaki oksidan ve antioksidanlar arasında bir dengesizlik olarak da görülebilir. Son yirmi yıldır, oksidatif stres tüm dünyada araştırmacılar arasında en çok araştırılan konulardan biri olmuştur. Reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimi ve metabolizması hakkında bilgi sahibi olmak için birkaç neden öne sürülebilir, bunlar:

oksidatif hasar için biyomarker tanımlanması, kronik ve bazı akut sağlık problemlerinin oksidatif stres ile bağlantısına ilişkin kanıtlar ve bitkisel gıdalarda bulunan çeşitli diyet antioksidanlarının biyoaktif moleküller olarak tanımlanması olarak sıralanabilir [104].

Potansiyel biyolojik hasara neden olan serbest ROS ve RNS radikallerinin zararlı etkisi, sırasıyla oksidatif stres ve nitroztatif stres olarak adlandırılır. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların eksikliği olduğunda aşırı ROS ve RNS üretimi biyolojik sistemlerde belirgindir. Organizma üzerindeki etkisi, oksidanın türüne, üretim yeri ve yoğunluğuna, çeşitli antioksidanların faaliyetlerine ve onarım sistemlerinin yeterliliğine bağlıdır. ROS terimi O_2 benzeri, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nonradikal moleküller gibi daha yüksek reaktiviteye sahip olan moleküler oksijenin tüm stabil olmayan metabolitlerini içerir [105]. Mitokondri, ROS üretiminden sorumlu başlıca hücre organelidir ve bir dizi oksidatif fosforilasyon süreci ile ATP üretir. Bu işlem sırasında, O_2 'nin dört elektron indirgemesi yerine bir veya iki elektron indirgemesi meydana gelebilir ve H_2O_2 oluşumuna neden olur. Oluşan H_2O_2 diğer ROS'lara dönüştürülebilir. Diğer ROS kaynakları peroksizomal oksidazlar, sitokrom P-450 enzimleri, NAD(P)H oksidazlar veya ksantin oksidaz içeren reaksiyonlar olabilir [106].

Serbest radikaller, ökaryotik hücrelerde sürekli olarak üretilmektedir ve redoks homeostazını korumak için antioksidan savunma ile dengelenmelidir. Zararlı reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik oksidatif strese neden olur, bu da oksidatif hasara neden olur. Beyinde, redoks dengesi kaybolduğunda, oksidatif stres nörodejeneratif hastalıklarla uyumlu olarak nöron kaybına yol açan ciddi hasara neden olur. Örneğin ROS, nükleik asit kırılmasına, enzim inaktivasyonuna, polisakkarit depolimerizasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve diğer yıkıcı süreçlere neden olabilir. Genel olarak, ROS aşırı miktarda olduğunda tüm biyomoleküllere zarar verir, bunun sonucunda ise hücre ölümüne yol açar [107]. Hücrede ROS oluşturabilen tüm organeller ve enzimler arasında, mitokondri ROS üretiminin %90'ından fazlasından sorumlu olan başlıca organelidir. Elektronlar, elektron taşıma zincirinden (ETC) dışarı sızar ve O_2 ile reaksiyona girdiğinde ROS üretimi gerçekleşir. ETC'nin I ve III komplekslerinde kullanılan tüm O_2 'nin %1-5'i süperoksit oluşturur. Buna karşılık mitokondri ve sitosol içindeki süperoksit dismutazlar, reaksiyona giren süperoksitin diatomik oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşmesini katalize eder. Glutatyon peroksidazlar ve katalaz, hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ek olarak antioksidan savunma görevi görür [108].

Serbest radikallerin fazlalığı, vücutta oksidatif strese ve doku hasarına neden olur. Antioksidan bileşikler, serbest radikal aracılı süreçleri geciktirme veya inhibe etme yeteneğine sahiptir. Böylece, antioksidanlar indirgenme potansiyeli, metal iyonu şelasyonu ve radikal süpürücü aktivitesi nedeniyle hastalık riskini azaltırlar. Bazı gıda bileşenlerinin biyolojik sistemlerde antioksidanlar olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Bunlar, glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan aktiviteleri olan endojen enzim sistemlerini güçlendirir. Gıda bileşenlerinin antioksidan potansiyelini değerlendirmek için kolorimetri, spektrofotometri, kromatografi, fluorimetri ve fotometriye dayalı teknikler kullanılır. Güncel çalışmalar gıda antioksidanlarının, kanser, kardiyovasküler hastalık ve nörodejenerasyon gibi oksidatif stresle ilişkili hastalıklardaki rolü üzerinde odaklanmıştır. Endojen antioksidatif sistemler başarısız olduğunda ilave antioksidan kaynağı gereklidir. Bu bağlamda, antioksidan bileşiklerden oluşan besin takviyeleri/farmasötik ürünler, optimal sağlığı korumada hayati bir rol oynamaktadır ve birçok kuruluş tarafından tavsiye edilmektedir [109].

Bitki besinleri, etkinliği doğrudan fenolik bileşiklerin varlığına bağlı olan doğal antioksidanların ana kaynağı olarak kabul edilir. Bitkilerin antioksidan içeriği, tür, cins, çiftçilik yönetimi koşulları, işleme ve depolama gibi faktörlere bağlı olduğu için büyük ölçüde değişir. Doğal bileşiklerin gıda sistemlerinde uygulanması ve etkinliği, bileşenlerinin yapı ve kimyasal reaktivitesine bağlıdır. Gıda ürünleri reaktif türlerin eylemlerinden dolayı sürekli değişimlere uğrar. Doğal antioksidanlar sadece bu reaktif türlerin gıda ürünlerinde oluşumunu geciktirmek veya önlemekle kalmaz, aynı zamanda bu doğal antioksidanların tüketimini artırır. Oksidatif süreçleri *in vivo* olarak azaltabilir, böylece vücudu çeşitli hastalıklara karşı koruyabilir. Sentetik antioksidanların mutajenik ve karsinogenik etkileri olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, reaktif türler tarafından oksidasyona yatkın olan gıdalar (örn: et ürünleri) üzerine çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Antioksidanlar doğrudan veya dolaylı olarak gıda ürünlerine eklenebilir. Doğrudan eklendiğinde, fonksiyonel amaçlarını gerçekleştirmek için yeterli bir konsantrasyonda kullanılmaları gerekir. Esas olarak amaç son üründe lipit ve katı yağların oksidasyonuna karşı koruma sağlamaktır [110].

Sebzeler, birçoğu antioksidatif özelliklere sahip olan çok farklı fito besin içerirler. Araştırmalar, sebzelerin iyi bilinen C ve E vitaminlerine ve ayrıca toplam antioksidan kapasitelerine önemli ölçüde katkıda bulunan karotenoidlerin yanı sıra diğer antioksidan

besinleri içerdığını göstermiştir. Örneğin, flavonoidler, flavonlar, izoflavonlar, flavononlar, antosiyaninler ve kateşinler gibi bileşikler dahil olmak üzere, sebzelerin bileşenleri güçlü antioksidan kapasiteye sahiptir. Sebzelerin sağlığa faydalı olduğuna ve dejeneratif süreçlerin önlenmesine katkıda bulunduğuna dair ikna edici kanıtlar vardır. Gıdalarda bulunan yararlı besin maddelerini ve bu etkilerden sorumlu mekanizmaları araştırmak oldukça önem teşkil eder. Hastalıklara karşı sağlanan koruma, gıdalardaki çeşitli antioksidanlara bağlanmıştır. Serbest radikallerin lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere karşı oksidatif hasara neden olduğunu gösteren çok fazla kanıt vardır. Serbest radikaller; kanser, kalp, damar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi hastalığın başlıca sebebidir. Bu nedenle, serbest radikalleri nötralize edebilen antioksidanlar, bu hastalık durumlarının önlenmesinde etkilidir. Tarla atkuyruğu bol miktarda salisik asit ve saponin içerdiği için, çayının diüretik, antipiretik, öksürük önleyici ve anti-enflamasyon ajanları olarak etkili olduğu düşünülmektedir [111].

Origanum vulgare antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip fenolik bileşikler açısından zengin olan önemli bir akdeniz bitkisidir. Yüksek fenolik antioksidan içeriklerinden dolayı *Lamiaceae* familyasından elde edilen ekstraktların kullanımı antioksidan uygulamalar için uygundur. Bu aromatik uzun ömürlü bitkinin yaprakları, kuru otları ve uçucu yağları yüzyıllar boyunca tıbbi olarak kullanılmıştır. Kekiğin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri, artık hem uçucu yağ hem de çözünebilir fenolik fraksiyonlarda antioksidan aktivitesine bağlanmıştır [112].

Achillea millefolium L. “civanperçemi” olarak adlandırılan Asteraceae ailesinin bir üyesidir. *Achillea millefolium*, deri iltihapları, spazmodik ve gastrointestinal bozukluklar ve hepatobilier şikayetleri gibi çeşitli rahatsızlıklara karşı kullanılmıştır. *Achillea millefolium* ile yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucu uçucu yağlar, flavonoidler ve fenolkarbonik asitler gibi fenolik bileşikler de dahil olmak üzere birçok bileşeni tanımlamıştır. Ayrıca seskiterpen laktonlar, azulen, apigenin, luteolin ve rutin gibi flavonoidlerin varlığı, *Achillea millefolium*'un farmakolojik aktivitesini sürdürmektedir. *Achillea millefolium* ekstreleri, anti-enflamatuar, antitümör, antimikrobiyal, karaciğer koruyucu ve antioksidan özellikleri göstermiştir [113].

Antimikrobiyal ajanlar olarak aromatik bitkiler sıklıkla geleneksel tıpta kullanılır ve bunların uçucu yağları, buhar damıtma ile izole edilen doğal uçucu bileşiklerin karışımları, antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip olduğu için antik çağlardan beri bilinmektedir. Bazı esansiyel yağların, bakterilere, mayalara, dermatofitlere ve

Aspergillus soylarına karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve esas olarak solunum yolu enfeksiyonlarını içeren hastalıklarda tedavi edici potansiyele sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bu yağların çoğunun ana bileşenleri, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin iyi olduğu bilinen timol, karvakrol ve öjenol gibi fenolik bileşiklerdir. Bununla birlikte bazı *Artemisia* türleri gibi, fenolik olmayan esansiyel yağlar üreten aromatik bitkiler de baharat ve halk ilaçları olarak antiseptikler olarak kullanılır. *A. Absinthium* yaprakları, yaraları ve göğüs enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmıştır [114].

İnsan vücudundaki biyolojik moleküllerin oksidatif hasarı, yaşlanma, koroner kalp hastalığı, kanser, arteroskleroz ve romatizma gibi dejeneratif veya patolojik süreçlerde rol oynar. Geçtiğimiz on yıl içinde, birçok epidemiyolojik çalışma, eksojen antioksidanların alınmasının bu tür hastalıkları önlemede ya da bastırmakta etkili olduğunu göstermiştir. Doğal olarak oluşan antioksidanların kullanımı büyük ilgi çekmiştir ve doğal antioksidanlara, özellikle de fenolik bileşiklere olan ilginin artması, oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olabileceğini düşündürmüştür. *Hypericum* cinsinin bitki türleri terapötik etkinlikleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanımları ile iyi bilinmektedir. Cinsin en önemli ve en tanınmış türlerinden biri *Hypericum perforatum*'dur. Bitkisel ilaçlarda, harici olarak cilt yaraları, egzama ve yanıkların tedavisi için ve dahili olarak merkezi sinir sistemi bozuklukları için kullanılmıştır. Birkaç çalışma, *H. Perforatum* çiçeklerinin çeşitli ekstrelerinin antidepresan, antiviral, yara iyileşmesi, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini ortaya çıkarmıştır [99].

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

2-merkaptoetanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
ABTS	: Sigma-Aldrich, Almanya
Akrilamid-Bisakrilamid	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum persülfat (PER)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Amonyum tiyosiyanat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetik asit	: VWR Chemicals, Amerika
Bakır-II-klorür (CuCl_2)	: Alfa Aesar, Amerika
BHA	: Sigma-Aldrich, Almanya
BHT	: Sigma-Aldrich, Almanya
Bipiridil	: Sigma-Aldrich, Almanya
Bromtimol mavisi	: Sigma-Aldrich, Almanya
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-L-tirozin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Coomassie brilliant blue G250	: Sigma-Aldrich, Almanya
Coomassie brilliant blue R250	: Sigma-Aldrich, Almanya
Demir-III-klorür (FeCl_3)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Demir-II-klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Demir-II-sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum karbonat (Na_2CO_3)	: Sigma-Aldrich, Almanya

DMPD	: Sigma-Aldrich, Almanya
DPPH	: Sigma-Aldrich, Almanya
Etanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Folin-Coicalteu	: Sigma-Aldrich, Almanya
Fosforik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Gallik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Gliserin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Glisin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
İzopropanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Linoleik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metiyonin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Monosodyum fosfat (NaH_2PO_4)	: Acros Organics, Amerika
NaOH	: Sigma-Aldrich, Almanya
Neokuprin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Nitroblue tetrazolium	: Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	: Honeywell Fluka, Amerika
Potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Riboflavin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum asetat (NaCH_3COO)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum azit (NaN_3)	: Sigma-Aldrich, Almanya

Sodyum barbital ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NaO}_3$)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	: Acros Organics, Amerika
Sodyum hidroksit (NaOH)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum klorür (NaCl)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum perklorat (NaClO_4)	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	: Honeywell Fluka, Amerika
Sülfanilamid	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sülfürik asit (H_2SO_4)	: Sigma-Aldrich, Almanya
TCA	: Sigma-Aldrich, Almanya
TEMED	: Sigma-Aldrich, Almanya
Tirozin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Tris	: Sigma-Aldrich, Almanya
Tris piridil triazin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Trolox	: Sigma-Aldrich, Almanya
Tween 20	: Sigma-Aldrich, Almanya
α -Tokoferol	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buz makinesi	: Genbiotek H-IMS-50, Türkiye
Çalkalayıcı	: Shaker Jeitech OS-3000, Kore
Elektroforez	: Thermo Scientific Owl* p82, Amerika
Görüntüleme cihazı	: SYNGENE G. Box Chemi XRQ, İngiltere
Hassas terazi	: Precisa XB 220A, İsviçre
LC-MS/MS cihazı	: Shimadzu LCMS-8040, Japonya
Liyofilizatör	: Labconco Freezone 2.5, Amerika
Magnetik karıştırıcı	: DLAB MS-H-Pro+, Amerika
Peristaltik pompa	: Ismatec REGLO ICC, Amerika
pH metre	: METTLER TOLEDO S220-K, Amerika
Rotary evoparatörü	: IKA RV 3 V ROTARY EVAPORATÖR, Almanya
Saf su cihazı	: Miliporte TANK-PE-030, Amerika
SEM cihazı	: Hitachi TM3030Plus Tabletop Microscope, Japonya
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 326 K, Almanya
Su banyosu	: JSR JSEB-22T, Japonya
UV-VİS spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208, Japonya
Vakum pompası	: Millipore WP6222050, Amerika
Vorteks	: Vortex-Genie 2, Amerika

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

3.3.1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve aktivite tayin yöntemlerinde kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler

- Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon;

Karbonat tamponu (0,2 M, pH 8,8): 5,04 g NaHCO_3 alındı ve yaklaşık 250 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik NaOH ilavesi ile çözeltinin pH'sı 8,8'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 300 mL'ye tamamlandı.

- Afinite kolonunun dengelenmesi için kullanılan dengeleme tamponu;

Tris-HCl sodyum sülfat tamponu (25 mM Tris HCl / 0,1 M Na_2SO_4 pH 8,7): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 tartıldı ve yaklaşık 950 mL distile suda çözüldü. Sonra 1N'lik HCl ilavesi ile PH 8,7'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- Hemolizatin tatbikinden sonra kolona tutunmuş safsızlıkların yıkanmasında kullanılan yıkama tamponu;

Tris-HCl sodyum sülfat tamponu (25 mM Tris HCl / 25 mM Na_2SO_4 , pH 8,7): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 alındı ve 950 mL distile suda çözüldü. Sonra 1N'lik HCl çözeltisi ile pH 8,7'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- Kolona tutunmuş hCA I izoenzimlerinin elüsyonunda kullanılan tampon;

Fosfat tamponu (25 mM Na_2HPO_4 /1 M NaCl, pH 6,3): 4,4 g Na_2HPO_4 ve 29,26 g NaCl alındı ve 450 mL distile suda çözüldü. Sonra 1N'lik HCl çözeltisi ile pH 6,3'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

- Kolona tutunmuş hCA II izoenzimlerinin elüsyonunda kullanılan tampon;

Asetat tamponu (0,1M NaCH_3COO /0,5M NaClO_4 , pH 5,6): 15,325 g NaClO_4 ve 3,4 g NaCH_3COO alındı ve 200 mL distile suda çözüldü. Sonra 1N'lik HCl çözeltisi ile pH 5,6'ya ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

- Alınan elüatların diyaliz edilmesinde kullanılan tampon;

Tris-sülfat tamponu (0,05 M, pH 7,4): 3,03 g Tris alındı ve 450 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik H_2SO_4 ile pH 7,4'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

- Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti;

Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi: 50 mg coomassie brilliant blue G-250 alındı ve 25 mL %95'lik etanolde çözüldü. Sonra bu çözeltiye 50 mL %86'lık fosforik asit ilave edildi. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

- CO_2 -hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılmak üzere;

Bikarbonat tamponu (0,15 M Na_2CO_3 / 0,1 M $NaHCO_3$): 7,95 g Na_2CO_3 ve 4,2 g $NaHCO_3$ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Veronal Tamponu (0,025 M): 2,575 g sodyum barbital ($C_8H_{11}NaO_3$) alındı ve 450 mL distile suda çözüldü. Sonra 1N'lik HCl çözeltisi ile pH 8,2'ye ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

İndikatör çözelti (%0,04'lük): 0,1 g brom timol mavisi alındı ve 0,01 N'lik 16 mL NaOH çözeltisi içinde çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
CO₂ çözeltisi: CO₂ tüpü kullanılarak soğuk suyun içinden 1 dakika boyunca CO₂ gazı geçirildi.

- Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti:

%0,02'lik NaN_3 çözeltisi: 20 mg NaN_3 alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılmak üzere;

Tris tamponu (1 M, pH 8,8): 6,05 g Tris ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tris tamponu (1 M, pH 6,8): 6,055 g Tris alınarak 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 6,8'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Akrilamid-Bisakriamid çözeltisi: 15 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (%10'luk): 5 g SDS alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

TEMED çözeltisi: %5'lik olacak şekilde hazırlandı.

PER çözeltisi: %15'lik olacak şekilde hazırlandı.

Yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin alındı. 450 mL distile suda çözüldü. Üzerine 5 mL %10'luk SDS çözeltisi ilave edildi. Son olarak, toplam hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Numune tamponu: pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponundan 650 µL, %10'luk SDS çözeltisinden 1 mL, gliserinden 1 mL ve %0,1'lik brom timol mavisinden 1 mL alındı. Distile su ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon kullanılmadan hemen önce 950:50µL oranında β-merkaptoetonal eklendi.

Fiksasyon çözeltisi: Sırasıyla 50:10:40 oranında olacak şekilde izopropanol, TCA ve distile su eklenerek hazırlandı.

Jelin boyanması için kullanılan çözelti: %0,1'lik coomassie brilliant blue R-250 çözeltisinden 145 µL, %50'lik metanolden 50 mL, %10 asetik asit çözeltisinden 10 mL ve toplam hacmin %40'ı oranında distile su eklendi.

Boyalı jeli yıkama tamponu: %50'lik metanolden 125 mL, %10'luk asetik asitten 25 mL ve toplam hacmin %40'ı oranında distile su eklendi.

- Antioksidan ve inhibitör olarak kullanılan bitkilerin stok çözeltilerinin hazırlanması

Antioksidan ve inhibitör olarak kullanılan bitki ekstraktları 1 mg/mL olacak şekilde su ve etanol'de çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Sonraki çalışmalarda çeşitli konsantrasyonları bu stok çözeltilerden alınarak devam edildi.

3.3.2. Antioksidan aktivite tayinleri için çalışılan yöntemlerde kullanılmak üzere hazırlanan çözeltiler

- FRAP METODU tayini için;

Asetat tamponu (0,3M pH 3,6): 1,2 g NaCH_3COO alındı ve 40 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 3,6'ya ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

HCl çözeltisi (40 mM): %37'lik HCl'den 0,167 mL alındı ve bir miktar distile suya ilave edildi. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

TPTZ çözeltisi (10 mM): Tris piridil triazin'den 0,156 g alındı ve 40 mM'lık 50 mL HCl çözeltisi eklenerek çözüldü.

Demir-III-klorür çözeltisi (20 mM): 0,27 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

FRAP Reaktifi: Sırasıyla 10:1:1 oranında 0,3 M asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM demir-III-klorür çözeltisi eklenerek hazırlandı.

- Demir indirgeme metodu ($\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$) için;

Fosfat Tamponu (0,2 M, pH 6,6): NaH_2PO_4 'dan 1,2 g alındı ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik NaOH çözeltisi ile pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Potasyum Ferrisiyanür Çözeltisi (%1'lik): 0,5 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'den alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Triklor asetik asit çözeltisi (%10'luk): 5 g TCA alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Demir-III-klorür çözeltisi (%0,1'lik): 0,085 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

- ABTS radikali giderme aktivitesi (radikal katyon renksizleştirme) tayini için;

Fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,4): 0,71 g Na_2HPO_4 alındı ve yaklaşık 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 7,4'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

ABTS çözeltisi (0,2 mM): 5,5 mg ABTS alındı ve pH'sı 7,4 olan 0,1 M'luk fosfat tamponuna ilave edildi. Toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Bir gece boyunca karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda tamamen çözülünceye kadar yavaşça karıştırıldı.

Potasyum persülfat çözeltisi (2,5 mM): 0,331 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ alındı ve pH'sı 7,4 olan 0,1 M'luk bir miktar fosfat tamponuna ilave edildi. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

- Bakır indirgeme metodu (CUPRAC) tayini için;

Bakır-II-klorür (0,01 M): 0,067 g CuCl_2 alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Neokuprin ($7,5 \cdot 10^{-5}$ M): 0,078 g Neokuprin alındı ve bir miktar etil alkolde çözüldü. Son olarak, toplam hacim etil alkol ile 50 mL'ye tamamlandı.

Amonyum asetat tamponu (1 M): 3,85 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ alındı ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH'sı 6,5'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

- DMPD radikali giderme aktivitesi tayini için;

DMPD çözeltisi (0,1 M): 0,21 g DMPD alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

Sodyum asetat tamponu (0,1 M, pH 5,25): 0,41 g NaCH_3COO alındı ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH'sı 5,25'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Demir-III-klorür çözeltisi (0,05 M): 0,41 g FeCl_3 alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

N-N'-Dimetil-p-fenilendiamin radikalinin (DMPD^{++}) hazırlanması (0,001 M): 0,1 M'lık DMPD çözeltisinden 1 mL alındı ve 1 M'lık pH'sı 5,25 olan 100 mL'lik asetat tamponuna ilave edildi. Bunun üzerine 0,2 mL 0,05 M'lık FeCl_3 çözeltisi eklendi.

- Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini için;

Tris-HCl tamponu (0,1 M, pH 7,4): 0,61 g Tris alındı ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 7,4'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Demir-II-sülfat çözeltisi (2 mM): 27,8 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ alındı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Hidroklorik asit (%2'lik): 0,8 mL %37'lik HCl'den alındı ve bir miktar distile suya ilave edildi. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Bipiridil Çözeltisi (%0,2'lik): 0,1 g Bipiridil alındı ve 50 mL %2'lik HCl çözeltisinden ilave edilerek hazırlandı.

- Süperoksit anyon radikali (O_2^-) giderme aktivitesi tayini için;

Fosfat tamponu (0,05 M, pH 7,8): 0,35 g Na_2HPO_4 alındı ve 45 mL distile suda çözüldü. Sonra 1 N'lik HCl çözeltisi ile pH 7,8'e ayarlandı. Son olarak, toplam hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Riboflavin çözeltisi ($1,33 \cdot 10^{-5}$ M): 6 mg riboflavin alındı ve 0,05 M'lık pH'sı 7,8 olan fosfat tamponuna ilave edilerek çözüldü.

Metiyonin çözeltisi ($4,46 \cdot 10^{-5}$ M): 0,332 mg metiyonin alındı ve pH'sı 7,8 olan 0,05 M'lık bir miktar fosfat tamponuna ilave edilerek çözöldü. Son olarak, toplam hacim fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlandı.

Nitroblue tetrazolium çözeltisi ($8,15 \cdot 10^{-8}$): 6,1 g NBT alındı ve pH'ı 7,8 olan 0,05 M'lık bir miktar fosfat tamponuna ilave edilerek çözöldü. Son olarak, toplam hacim fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlandı.

- DPPH serbest radikal (DPPH') giderme aktivitesi tayini için;

DPPH çözeltisi (10^{-3} M): 20 mg DPPH alındı ve bir miktar saf etanolde çözöldü. Son olarak, toplam hacim etanol ile 50 mL'ye tamamlandı.

- Total fenol miktarı tayini için;

Na_2CO_3 : 20 gr Sodyum karbonat tartılıp 100 mL suda çözöldü.

Gallik asit: Maddenin 1 mg/mL lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltildi.

- Total antioksidan aktivite tayini için;

Fosfat tamponu (0,01 M, pH 7,4): 0,48 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 90 mL saf suda çözöldü. 1 N'lik NaOH ilavesi ve pH metre yardımıyla pH'sı 7,4'ayarlandı. Çözeltinin son hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi (%3,5'lik): %37'lik HCl'den 9,46 mL alındı ve bir miktar saf suya ilave edildikten sonra saf suyla son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Demir-II-klorür çözeltisi (20 mM): 281 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 3/4\text{H}_2\text{O}$ tartıldı ve bir miktar %3,5'lik HCl içinde çözöldükten sonra aynı asit çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı.

Amonyum tiyosiyanat çözeltisi (%30'luk): 30 g NH_4SCN alındı ve bir miktar saf suda çözöldükten sonra son hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Linoleik asit emülsiyonu (0,017 M): 265 µL linoleik asit 0,01 M ve pH'sı 7,4 olan 50 mL fosfat tamponuna karıştırma işlemi ile birlikte çok yavaşça damla damla ilave edildi. Emülgatör olarak da 0,01 M ve pH'sı 7,4 olan 140 mL fosfat tamponuna 90 mL tween 20 aynı şekilde karıştırılarak ilave edildi. Son olarak da hazırlanan bu iki çözelti birbirine eklendi.

4. YÖNTEMLER

4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Su ekstrelerinin hazırlanması:

Taze toplanıp gölgede kurutulan bitkiler budama makası ile küçük parçalara ayrıldı. Su ekstreleri hazırlanmak üzere her bitkiden 10'ar gram alınarak ağırlığının 10 katı distile su ile 24 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakıldı. Bu işlem 3 gün boyunca tekrarlanıp süzme işlemi gerçekleştirildi. Toplanan süzüntü liyofilize işlemine tabi tutuldu.

Etanol ekstrelerinin hazırlanması:

Toplanıp gölgede kurutulan bitkiler budama makası ile küçük parçalara ayrıldı. Etanol ekstreleri hazırlanmak üzere her bitkiden 10'ar gram alınarak ağırlığının 10 katı etanol ile 48 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalanmaya bırakıldı ve süzme işlemi gerçekleştirildi. Toplanan süzüntü liyofilize işlemine tabi tutuldu.

4.2. Bitki Ekstrelerinin İçeriğinin LC-MS/MS Yöntemi ile Belirlenmesi

LC-MS/MS yöntemi, UPLC cihazı yardımı ve moleküler kütle dedektörü ile numunelerin fizikokimyasal özelliklerine göre ayrıldığı bir analitik tekniktir. Kütle spektrometresi kimyasal türleri iyonize ederek yüklü iyonlar haline getirir. İlk aşamada kütle/yük oranını esas alarak ayrılan moleküller özel bir gaz (collision) yardımıyla parçalanırlar. İkinci aşamada ise kütle/yük oranına göre parçalanan bu iyonlar sayesinde kimyasal türlerin yapısı, molekül kütleleri ve miktar tayini gibi veriler elde edilir. Bu yöntem sayesinde küçük bileşiklerin yanı sıra proteinlerin tayini, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin de analizleri yapılabilmektedir. Cihazdaki dedektör sistemi yüksek hassasiyete sahip pozitif (E+) ve negatif (E-) iyon modunda çalışmaktadır [115].

4.3. Moleküler Modelleme (Docking) Çalışmaları

LC-MS/MS sonuçlarına göre belirlediğimiz bileşikler Schrödinger's Maestro moleküler docking programının "ligand hazırlama" modülünde Optimize Potansiyel Sıvı Simülasyonları (OPLS_2005) aracılığıyla fizyolojik pH'da (pH 7,4) enerji minimizasyonu ile hazırlanmıştır. CA I'in 5-asetamido-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid (asetazolamid) ile birlikte ve CA II'nin ariloksi-2-hidroksipropilamin sülfonamid ile

birlikte kompleks X-ray kristal yapıları, Protein Data Bank (PDB) sunucusundan alınmıştır (PDB kodlar: CA I: 1AZM; CA II: 5WLX). Bu enzimler docking analizleri için Schrödinger yazılımının “protein hazırlama” modülünde optimize edilmiştir. Moleküler docking çalışmalarında, ligandların topolojilerinin tahmini için bu enzimlerin substrat bağlanma bölgesinde Glide/XP docking protokolleri uygulanmıştır [116].

4.4. İnsan Kanı Temini ve Hemolizatının Hazırlanması

Eskişehir Yunus Emre Devlet hastanesinde kan merkezinde, gönüllü ve kronik rahatsızlığı olmayan 10 gönüllüden kan alındı. Alınan kan kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı. Çalışma yapılmadan önce Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik kurulundan izin alındı (Ek 1).

Antikoagülan içeren tüplere alınan taze kan santrifüj tüplerine aktararak 15 dakika boyunca 2500 x g’de santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası atıldı ve tüplerin altında kalan eritrosit pelleti %9’luk izotonik NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Yıkama yavaş bir şekilde alt üst edilerek yapıldı. Her defasında 2500 x g’de 15 dakika santrifüj edildi ve eritrosit kısmı alındı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile yarım saat boyunca manyetik karıştırıcıda hızlı bir şekilde karıştırılarak hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C’de 13.000 x g’de 60 dakika santrifüj yapıldı. Burada hücre zarı çöker, sonraki çalışmalarda kullanmak üzere üst kısımda bulunan hemolizat alındı ve +4°C’de saklandı [117].

4.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına Yönelik Çalışmalar

Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanması:

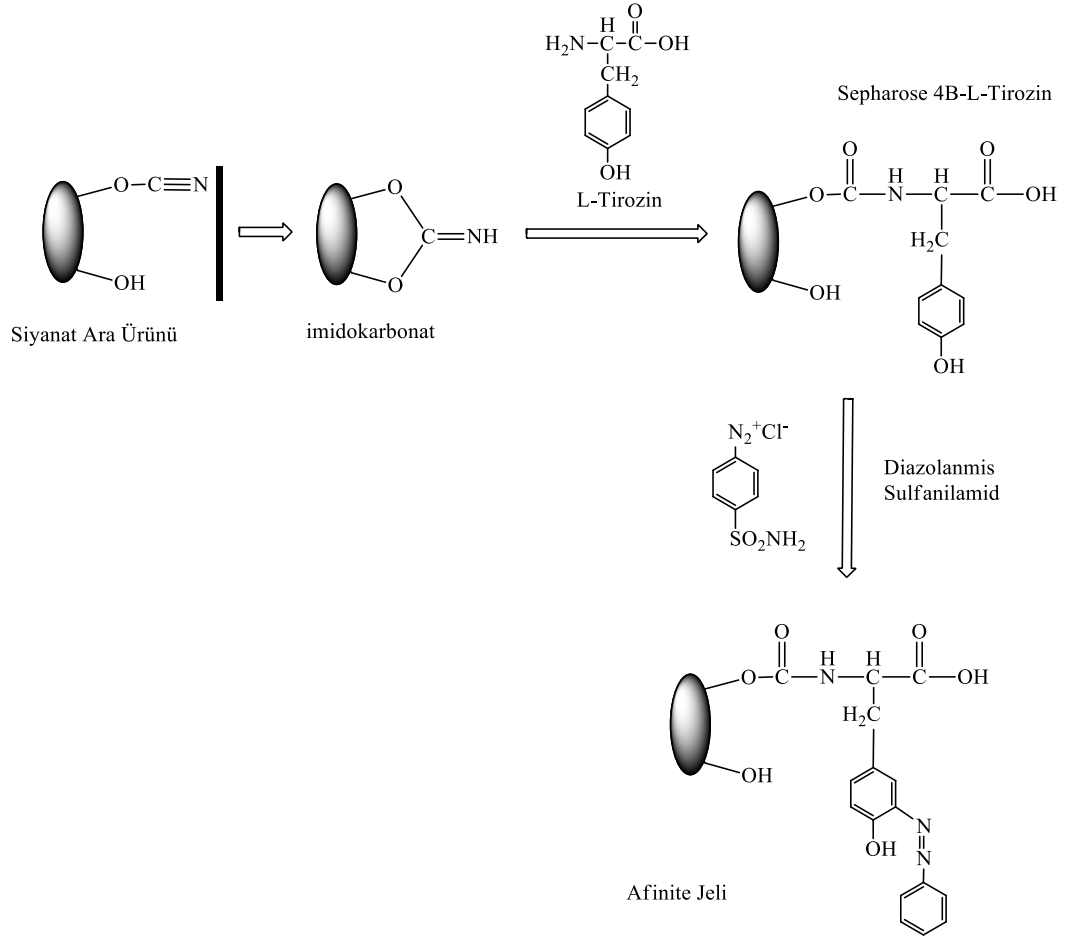
Afinite jelini hazırlamak için CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B’den 3 g kullanıldı ve bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Karbonik Anhidraz enziminin spesifik inhibitörü olan ve yüksek oranda saflaştırmak için kullanılan sülfanilamid, afinite jelinde enzimi bağlayan kısmı oluşturur. Tirozin ise afinite jelinde uzantı kolunu temsil eder [20].

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması:

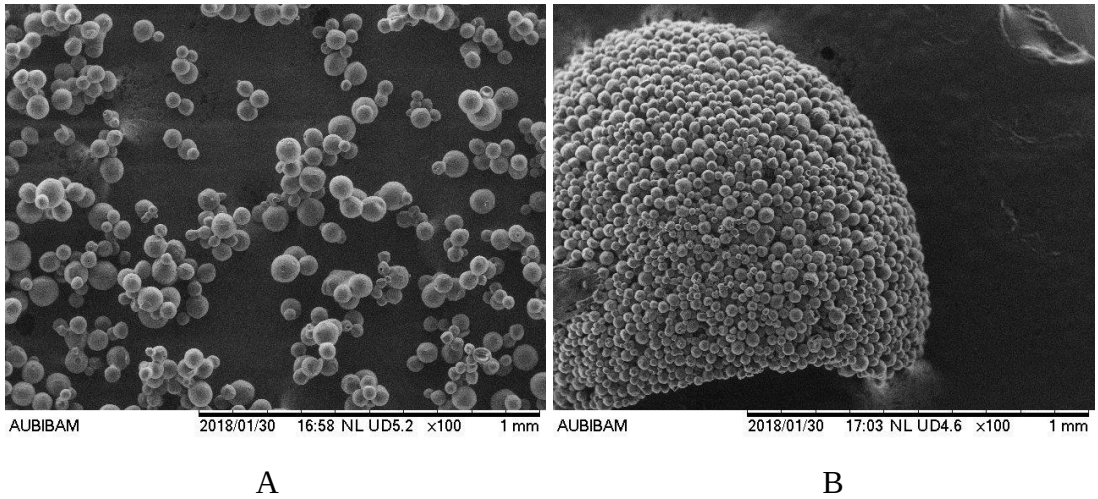
CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk tampon (0,1 M NaHCO₃, pH 10) ile yıkanarak vakum altında süzme işlemi yapıldı. Süzgeç kağıdında kalan süzüntü bir spatül yardımıyla bir behere alındı. 0,1 M NaHCO₃, pH 10 tamponunun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözöldü. Hazırlanan tirozin çözöltisi, behere alınan süzüntüye ilave edildi. Karışım öncelikle 4°C'de 2 saat manyetik karıştırmacıda karıştırdı. Daha sonra karışım 4°C'de 16 saat boyunca sabit bir şekilde bekletildi. 16 saatin sonunda nüçe erleninde vakum altında 1 litre distile su ile 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar yıkama yapıldı. Reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Ardından 1 litre NaHCO₃ tamponu (0,2 M, pH 8,8) ile tekrar yıkama yapıldı ve jel 40 mL'lik NaHCO₃ tamponu içine aktarıldı [20].

Sülfanilamid kenetlendirilmesi:

25 mg sülfanilamid, 0°C'de 10 mL, 1 M'lık HCl içerisinde çözöldü. 75 mg NaNO₂ 5 mL distile suda çözöldü. NaNO₂ çözöltisi sülfanilamid çözöltisinin içine yavaş yavaş ilave edildi. 10 dakikalık reaksiyonda diazolama gerçekleşmiş oldu. Diazolanmış sülfanilamid, süspansiyon halde bulunan Sepharose-4B-L-tirozin'in üzerine ilave edildi. 1 M NaOH çözöltisi ile pH 9,5'e ayarlandı ve 3 saat boyunca manyetik karıştırmacıda yavaşça karıştırdı. Bu esnada rengin kırmızı-turuncu arasında olduğu gözlendi. Bu sürenin bitiminde nüçe erleninde, vakum altında 500 mL distile su ve sonrasında 200 mL CA yıkama tamponu (0,05 M Tris-SO₄, pH 7,4) ile yıkandı. Yıkama sonrasında jelin üzerine bir miktar daha yıkama tamponundan eklenerek 4°C'de saklandı [20].



Şekil 4.1. Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonlar [11]



Şekil 4.2. A: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'nin SEM görüntüsü; B: Sülfanilamid kenetlendirilmesi sonrasında jelin SEM görüntüsü

Afinite kolonunun paketlenmesi:

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH 8,7) içine alınarak jel süspanse edildi ve vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik ve 8 mL yatak hacmine sahip olan kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla düşük hızda önce yıkama tamponu, ardından dengeleme tamponu geçirildi. Yıkama işlemine kolona verilen dengeleme tamponu ile alınan elüatın 280 nm'deki absorbansı ve pH'sı eşit oluncaya kadar devam edildi [11, 20].



Şekil 4.3. Afinite kolonunun paketlenmesi

Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu:

Hazırlanan hemolizat manyetik karıştırıcıda yavaş bir şekilde karıştırılarak katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlandı. Hemolizat kolona tatbik edilerek peristaltik pompa yardımıyla tamamen kolondan geçirildi ve ardından kolon 500 mL 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Bu işlem sonucunda safsızlıklar uzaklaştırdı ve CA izoenzimleri kolona tutunmuş oldu. İzoenzimleri ayırmak için de ilk olarak kolona 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,3) tamponu tatbik edildi ve hCA I elüsyonu toplandı. Sonrasında kolona 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO (pH 5,6) tamponu tatbik edildi ve hCA II elüsyonu toplandı. Elüsyonlar spektrofotometrede okutulmak üzere önceden

numaralandırılmış tüplere 1'er mL toplandı ve 280 nm'de absorbansları ölçüldü. İşlemler sırasında peristaltik pompanın hızı 40 ml/saat'e ayarlandı [20].

4.6. Protein Tayin Yöntemleri

Kalitatif Protein Tayini:

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır [20]. Bu metod kullanılarak afinite kromatografisi işleminde topladığımız bütün fraksiyonların kalitatif protein tayini yapıldı ve köre karşı absorbansları okutularak aktivite grafiği çizildi.

Kantitatif Protein Tayini:

Kullanılan hemolizatta ve saflaştırdığımız enzim çözeltisindeki protein miktarları ölçümünde bu metod kullanıldı. Bu metod, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin çok hızlı bir şekilde bağlanması esasına dayanır. Oluşan protein-boya kompleksi 595 nm'de maksimum absorbans gösterir ve bu kompleks uzun süre bozulmaz. Bu metotta hassasiyet 1–100 µg aralığındadır [118].

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Distile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı ve üzerlerine 5'er mL renklendirme reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 1 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak renklendirme reaktifi kullanıldı ve absorbans değerlerine göre belirlenen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak olan hemolizat ve enzim numuneleri için de bu yöntem uygulandı ve standart grafiğe göre miktar tayini yapıldı [20].

4.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi [119]. Elektrophorez plakaları kullanılmadan önce distile su ve alkol ile yıkandı. Aralık oluşturuca plaka ve düz plaka cihaza yerleştirilerek sabitlendi. Üst kısmında 1 cm boşluk kalana kadar ayırma jeli yavaşça plakaların arasına eklendi ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Ayırma jelinin üzerine %1'lik SDS eklenerek yüzeyin düzgün olması sağlandı. Jelin katılaşması

için yaklaşık iki saat beklendi ve üzerindeki %1'lik SDS alındı. Daha sonra üst kısımda kalan boşluğa yığma jeli yavaşça eklendi ve tarak düzgün bir şekilde yerleştirilerek numuneler için kuyucuk oluşturuldu.

Bekleme sırasında jelin kurumaması için üstü ıslak süzgeç kâğıdı ile kapatıldı. Jelin katılaştığı anlaşıldıktan sonra tarak alındı ve numune kuyucukları belirlendi. Oluşan kuyucuklar önce distile su sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankı yürütme tamponu ile dolduruldu. Numuneler 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı ve son hacim 40 µl olacak şekilde numune tamponu eklendi. Karışım kaynar su banyosunda 3 dakika boyunca tutularak denatüre edildi. Ardından soğutulan numuneler enjektör yardımıyla kuyucuklara tatbik edildi.

Elektroforez tankı kapatılarak kablolar ile akım cihazına bağlandı. Yürütme iki aşamada gerçekleşti. İlk aşamada numuneler yığma jelinin sonuna kadar getirilmek üzere 20 dakika boyunca 40 voltta yürütüldü. İkinci aşamada ise numune yürütme jelinin alt sınırına gelinceye kadar iki saat boyunca 80 voltta yürütme işlemi yapıldı. Yürütme işleminin ardından jel plakaların arasından alınıp sabitleştirme çözeltisi içerisine alındı ve 20 dakika bekletildi. Sonra jel boyama çözeltisine alındı ve burada 2 saat boyunca çalkalayıcıda yavaşça karıştırıldı. Bu sürenin sonunda boyanan jel yıkama çözeltisine alınarak çalkalayıcıda karıştırılmaya bırakıldı. Yıkama işlemine jelin rengi açılıp bantlar görününceye kadar devam edildi. Jel son olarak distile su ile yıkandı ve görüntüleme cihazına alınıp fotoğrafı çekildi.

4.8. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayini

CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır [120].

Kör, 1 mL veronal tamponu, 0,1 mL %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL distile su ve 2,5 mL CO₂ çözeltisi sırasıyla tüpe eklenerek hazırlandı. CO₂ çözeltisi tüpe eklendiği andan itibaren kronometre başlatılarak mavi renkteki indikatör sarımsı yeşile renge dönene kadar geçen süre ölçüldü (t₀). Numune tüpünde 0,01 mL azaltılan suyun yerine enzim eklendi ve sonrasında CO₂ çözeltisi tüpe eklendiği andan itibaren kronometre başlatılarak mavi renkteki indikatör sarımsı yeşile renge dönene kadar geçen süre ölçüldü (t_c). Bu metoda göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz

olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır.

$$E\ddot{U} = \frac{t_o - t_c}{t_c}$$

Formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı [36].

Tablo 4.1. *CA hidrataz aktivitesi prosedürü*

	Kör	Enzim
Tampon	1000 µL	1000 µL
Brom Timol Mavisi	100 µL	100 µL
Saf Su	600 µL	599 µL
Enzim	-	1 µL
CO₂'li su	2500 µL	2500 µL
Toplam hacim	4200 µL	4200 µL

4.9. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan CAI ve II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi

Tarla atkuyruğu (*Equisetum arvense*), keklik otu (*Origanum vulgare*), civanperçemi (*Achillea millefolium*), pelin otu (*Artemisia absinthium*) ve sarı kantaron (*Hypericum perforatum*) bitki ekstrelerinin, karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Kullanılan bitki ekstrelerinin stok çözeltileri 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Stok çözeltiden 10 farklı konsantrasyonda eklenerek CA izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi ölçüldü. Aktivite ölçümü yapıldıktan sonra inhibitör etkisi gösteren ekstreler belirlendi. Sonra bu ekstrelerden inhibisyon etkisi yüksek olanların Aktivite (%) – İnhibitör (I) grafikleri çizildi. Ortaya çıkan eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı.

4.10. Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstreleri İçin Antioksidan Kapasite Tayinleri

4.10.1. Demir indirgeme metodu (Fe³⁺ - Fe²⁺)

İndirgeme kuvveti tayini Oyaizu (1986) yöntemine göre yapıldı [121]. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 µg/mL alınarak tüplere aktarıldı ve hacmi distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Her bir tüpün üzerine 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu ve 2,5 mL %1'lik potasyumferrisiyanür K₃[Fe(CN)₆] ilave edildi. Su banyosunda 50°C'de 20 dakika

süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyona sonrası, her bir tüpe 2,5 mL %10'luk TCA ilave edildi ve çözeltinin üst kısmından 2,5 mL alındı. Alınan çözeltiye 2,5 mL distile su ve 0,5 mL %0,1'lik FeCl_3 eklendi. Distile su körüne karşı 700 nm'de absorbanları ölçüldü. Kontrol olarak da numune yerine su kullanıldı.

4.10.2. FRAP metodu

FRAP reaktifi ile indirgeme kuvveti tayini Oyaizu yönteminin küçük bir modifikasyonu işlemi ile yapıldı [121]. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ alınarak tüplere aktarıldı ve hacmi asetat tamponu ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Her bir tüpün üzerine 2,25 mL FRAP reaktifi ve 2,25 mL FeCl_3 eklendi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Asetat tamponu körüne karşı 593 nm'de absorbanları ölçüldü. Kontrol olarak da numune yerine asetat tamponu kullanıldı.

4.10.3. CUPRAC metodu

Bu metod ile fenolik yapıdaki moleküllerin Cu^{2+} indirgeme aktiviteleri ölçüldü [122]. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ alınarak tüplere aktarıldı. Her bir tüpün üzerine sırasıyla; 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisinden 125 μL , $7,5 \cdot 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisinden 125 μL ve 1 M'lık amonyum asetat tamponundan 125 μL sırasıyla eklendi. 30 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Distile su körüne karşı 450 nm'de absorbanları ölçüldü.

4.10.4. Süperoksit anyon radikali giderme

Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesini belirlemek için Zhishen ve ark kullandığı metodun küçük bir modifikasyonu uygulandı [123]. Fenolik bileşiklerin süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitesi nitroblue tetrazolium (NBT) maddesinin spektrofotometrik ölçümü ile belirlendi. Fosfat tamponu ile hazırlan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ alınarak tüplere aktarıldı. Her bir tüpün üzerine riboflavin $1,33 \cdot 10^{-5}$ M, metiyonin $4,46 \cdot 10^{-5}$ M ve NBT'den $8,15 \cdot 10^{-8}$ M konsantrasyonlarda eklendi. Reaksiyon karışımı 20 W'lık floresan ışığı altında ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ortamda giderilen süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Süperoksit giderme aktivitesi} = \left[\frac{\lambda_{560}(\text{kontrol}) - \lambda_{560}(\text{numune})}{\lambda_{560}(\text{kontrol})} \right] \times 100$$

4.10.5. DPPH metodu

DPPH serbes radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre yapıldı [124]. 1 mM’lık DPPH çözeltisi hazırlanıp serbest radikal olarak kullanıldı. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 µg/mL alınarak tüplere aktarıldı ve hacimleri etanol ile 2,5 mL’ye tamamlandı. Her bir tüpün üzerine daha önce hazırladığımız DPPH çözeltisinden 0,5 mL eklendi. 30 dakika boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Etanolden körüne karşı 517 nm’de absorbansları ölçüldü. 2 mL etanole 0,5 mL DPPH çözeltisi eklenerek hazırlanan çözelti kontrol olarak kullanıldı. Azalan absorbans değerleri çözeltide kalan DPPH miktarını göstermektedir. Böylece numunenin serbest radikal giderme aktivitesi belirlenir.

4.10.6. ABTS metodu

ABTS Radikali Giderme Aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre yapıldı [125]. İlk olarak 2 mM’lık ABTS çözeltisi, 1 M’lık fosfat tamponu ile hazırlandı. ABTS radikalleri üretebilmek için hazırlanan çözeltiye 2,45 nM’lık persülfat çözeltisi eklendi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce 734 nm’de absorbansı ölçüldü. Absorbansı $700 \pm 0,025$ nm aralığına gelinceye kadar 0,1 M fosfat tamponu ile seyreltildi. Hazırlanan stok çözeltiden ABTS radikal giderme aktivitesine bakılmak üzere sırasıyla 10, 20, 30 µg/mL alınarak tüplere aktarıldı. Tüplerden her birine 0,5 mL ABTS radikal çözeltisi eklendi. 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. 734 nm’deki absorbansları etanol körüne karşı okutuldu.

4.10.7. DMPD radikali giderme aktivitesi tayini

DMPD^{•+} radikal katyonunu elde etmek için 100 mL’lik asetat tamponuna 1 mL DMPD çözeltisi eklendi. Bunun üzerine 0,2 mL 0,05 M FeCl₃ çözeltisi ilave edildi. DMPD^{•+} radikal çözeltisinin absorbansı 505 nm’de ölçüldü. Absorbansı $0,900 \pm 0,100$ nm aralığına gelinceye kadar 0,1 M’lık fosfat tamponu ilave edildi. DMPD^{•+} radikal çözeltisi günlük taze hazırlanması gerekir [126]. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10,

20, 30 µg/mL alınarak tüplere aktarıldı ve hacimleri distile su ile 0,5 mL'ye tamamlandı. Her bir tüpün üzerine daha önce hazırladığımız DMPD^{•+} radikal çözeltisinden 1 mL eklendi. 50 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı ve absorbansları 505 nm'de tampon çözelti körüne karşı okutuldu.

4.10.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini

Bipiridil reaktifi ile metal şelatlama aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre yapıldı [125]. İlk olarak deney tüplerine 125 µL 2 mM'lık FeSO₄ çözeltisi alındı ve hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 µg/mL eklendi. Her bir tüpün üzerine daha önce hazırladığımız 0,1 M'lık Tris-HCl tamponundan 500 µL eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Üzerlerine sırasıyla bipiridil reaktifinden 500 µL, distile sudan 595 µL ve etanol eklenerek son hacimleri 3 mL'ye tamamlandı. 522 nm'deki absorbansları etanol körüne karşı okutuldu. Kontrol olarak da antioksidan madde yerine alkol kullanıldı.

4.10.9. Total fenol miktarı tayini

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarı mg gallik asit'e eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemiyle tayin edildi. 50 µL numune üzerine, 3,9 mL saf su ve 750 uL Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. 1-8 dakika beklendikten sonra 750 µL %20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip, 2 saat 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 760 nm'de absorbans ölçümleri alınarak gallik asit kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırıldı.

4.10.10. Total antioksidan aktivite tayini

Çalıştığımız bitki ekstralarının total antioksidan aktiviteleri tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. Hazırlanan stok çözeltiden sırasıyla 10, 20, 30 µg/mL alınarak tüplere aktarıldı ve hacimleri fosfat tamponu ile 2,5 mL'ye tamamlandı. Sonra herbir tüpe 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edilerek 37°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Inkübasyona bırakılan tüplerden her 12 saatte bir 100 µL numune alındı ve 4,7 mL etanol, 100 µL SCN⁻ çözeltisi ve %3,5'lik HCl içinde hazırlanmış 20 mM'lık 100 µL Fe²⁺ çözeltisi karışıma eklendi. 500 nm'de absorbansları köre karşı okundu. Kör olarak numune yerine alkol, kontrol olarak numune yerine tampon çözelti kullanıldı. Kontrol numunesinin maksimum absorbansına ulaşıncaya kadar inkübasyon ve absorbans ölçümü işlemlerine devam edildi.

4.11. MTT Sitotoksosite Testi

Çalışmada kullanılan bitki ekstralarının sitotoksiteleri Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT) ile belirlenmiştir. Fare (*Mus musculus*) adipoz sağlıklı fibroblast hücre hattı (L929), %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) besi yeri içerisinde hazırlanan media ile %5 CO₂ iç atmosfere sahip inkübatörde 37 °C de kültürde inkübasyona bırakılmıştır. Her 3 günde bir hücreler tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 oranda alt kültürle ayrılarak pasajlanmıştır. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) testi dolaylı olarak hücre büyümesini ve/veya hücre ölümünü belirlemeyi hedefleyen, hücre kültürüne dayalı bir ilaç duyarlılığı testidir [127].

Bir hücre topluluğunda yer alan canlı hücrelerin oranını kantitatif olarak saptayabilmek için kolorimetrik bir yöntem olan MTT kullanıldı. Yöntem, sağlam hücrelerin mitokondrisinin MTT boyasında yer alan tetrazolium halkasını parçalayabilmesi prensibine dayanmaktadır. Parçalanma reaksiyonunun gerçekleşmesi mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz (SDH) enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması neticesinde açık sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Gerçekleşen reaksiyon sonucunda mor renge boyanmış olan hücreler mitokondriyal fonksiyonu bozulmayan, herhangi bir renk değişikliğine uğramayan hücreler ise mitokondriyal fonksiyonu bozulan ya da ölen hücreleri temsil eder. MTT yöntemi üç aşamadan oluşur: MTT boyası ile hücrelerin inkübasyona bırakılması, çöktürülmüş reaksiyon ürününün çözünür duruma getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik ölçümünün yapılması [128].

Sitotoksitesine bakılacak olan bitki ekstralarının ana stokları 40 mg/mL olarak ayarlandı. 96 kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 50000 hücre ekilerek 24 saatlik proliferasyona bırakıldı. 24 saat sonunda plakadaki medium değiştirildi. İki kontrol grubu ve on çalışma grubu olmak üzere toplam 12 deney grubu oluşturuldu.

En yüksek konsantrasyon 500 µg/mL alınıp her seferinde 1:1 oranında konsantrasyonlar seyreltilti. Her madde için üç tekrar olmak üzere 8 farklı konsantrasyon uygulandı. Tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra ELİSA Reader ile 540 nm’de okuma yapıldı.

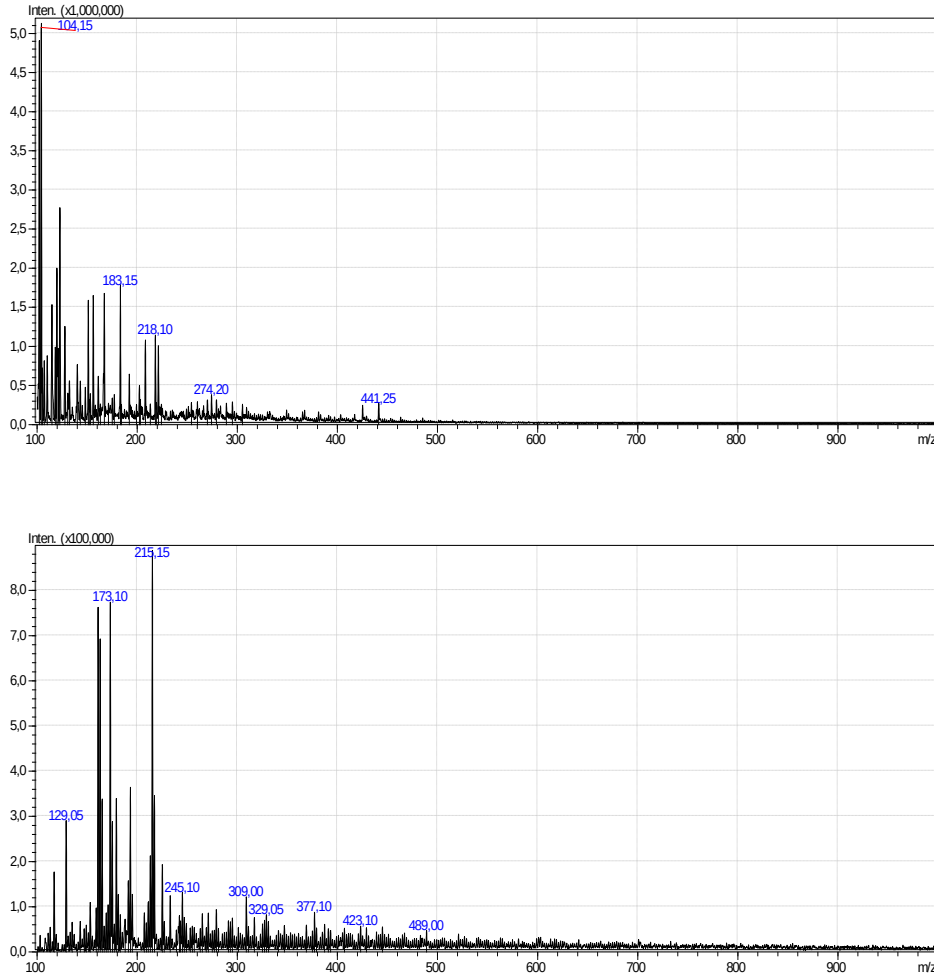
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

5.1. LC-MS/MS Yöntemi ile Bitki Ekstrelerinin İçerik Analizi

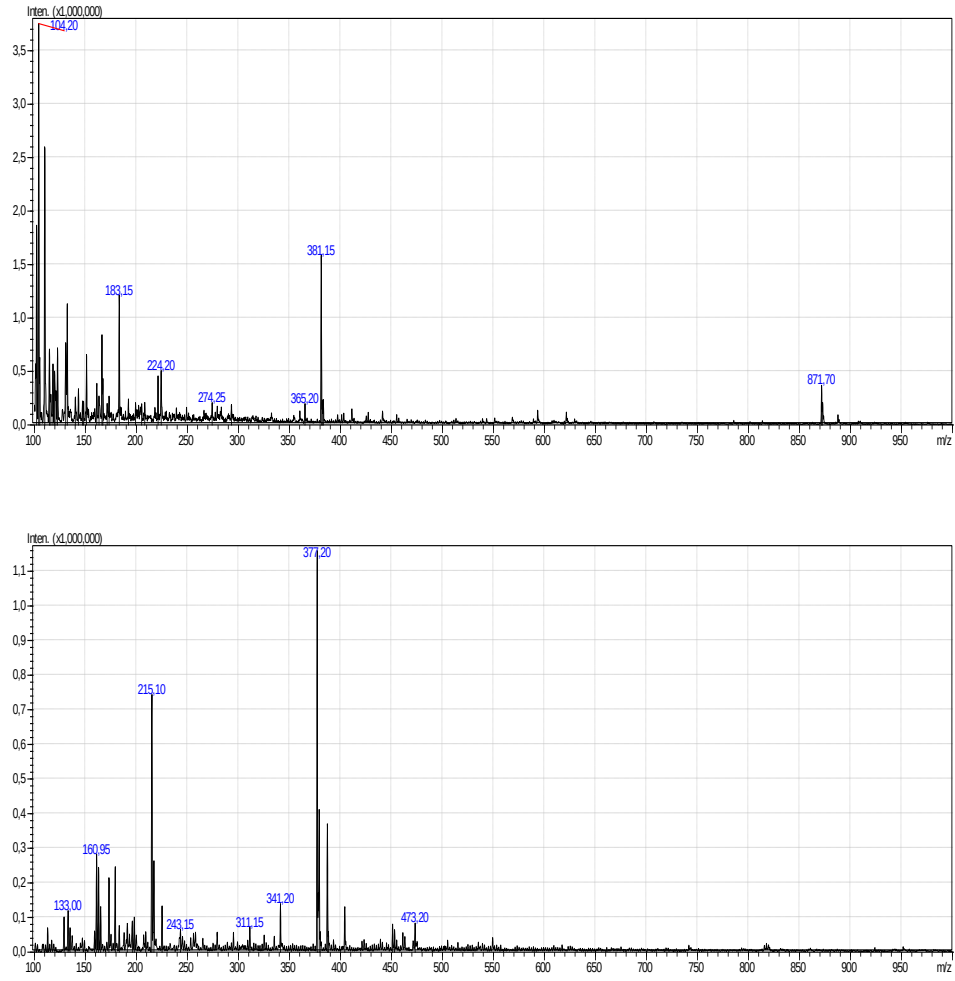
Hazırladığımız bitki ekstralarının içeriği UPLC cihazı yardımı ve moleküler kütle dedektörü ile fizikokimyasal özelliklerine göre tespit edildi.

Kütle spektrometresi kimyasal türleri iyonize ederek yüklü iyonlar haline getirir. İlk aşamada kütle/yük oranını esas alarak ayrılan moleküller özel bir gaz (collision) yardımıyla parçalanırlar. İkinci aşamada ise kütle/yük oranına göre parçalanmış bu iyonlar sayesinde kimyasal türlerin yapısı, molekül kütleleri ve miktar tayini gibi veriler elde edilir. Cihazdaki dedektör sistemi yüksek hassasiyete sahip pozitif (E+) ve negatif (E-) iyon modunda çalışmaktadır [115].

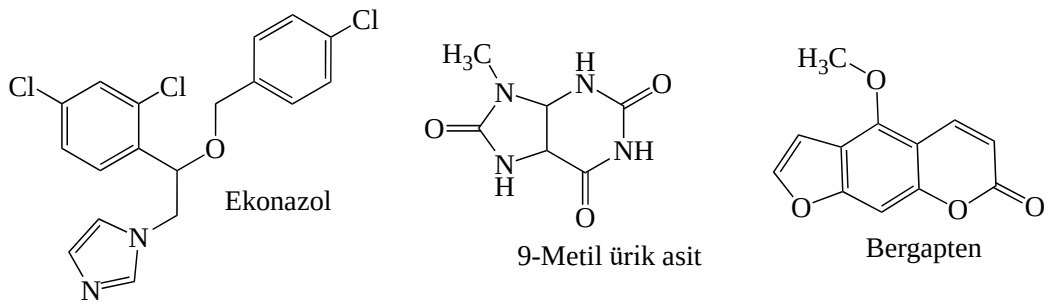
5.1.1. *Equisetum arvense* bitkisinin içerik analizi



Şekil 5.1. *E. arvense* sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

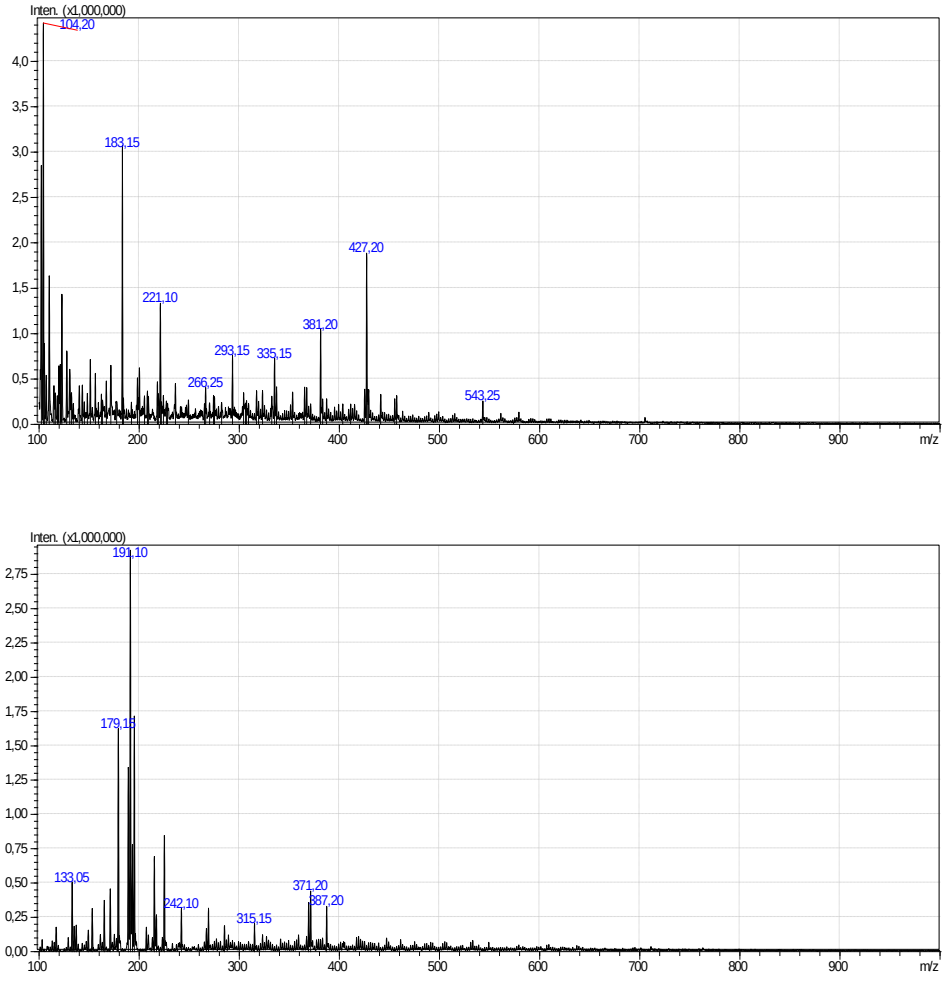


Şekil 5.2. *E. arvense* etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

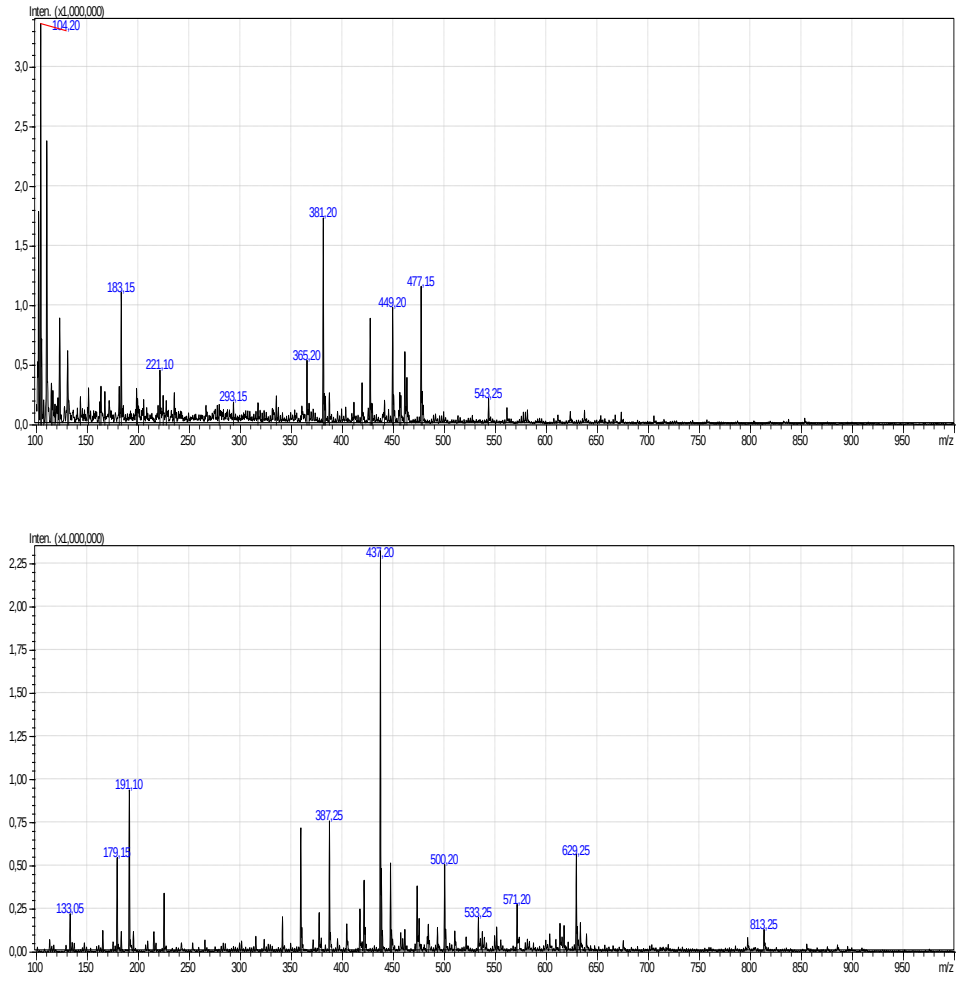


Şekil 5.3. LC-MS/MS analizi sonucu *Equisetum arvense* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

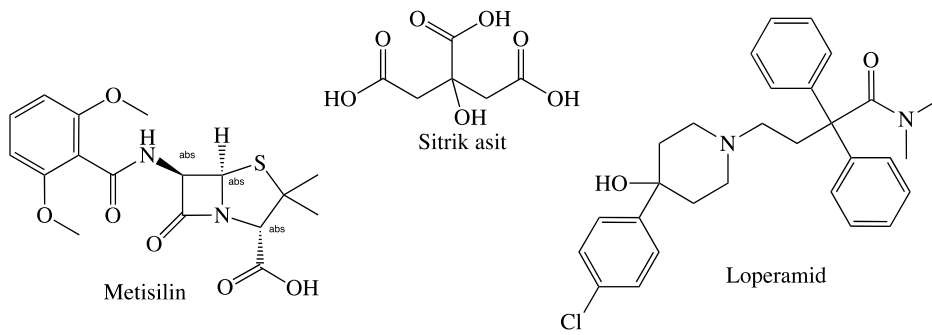
5.1.2. *Origanum vulgare* bitkisinin içerik analizi



Şekil 5.4. *O. vulgare* sulu ekstrlerinin E+ ve E- tarama sonuçları

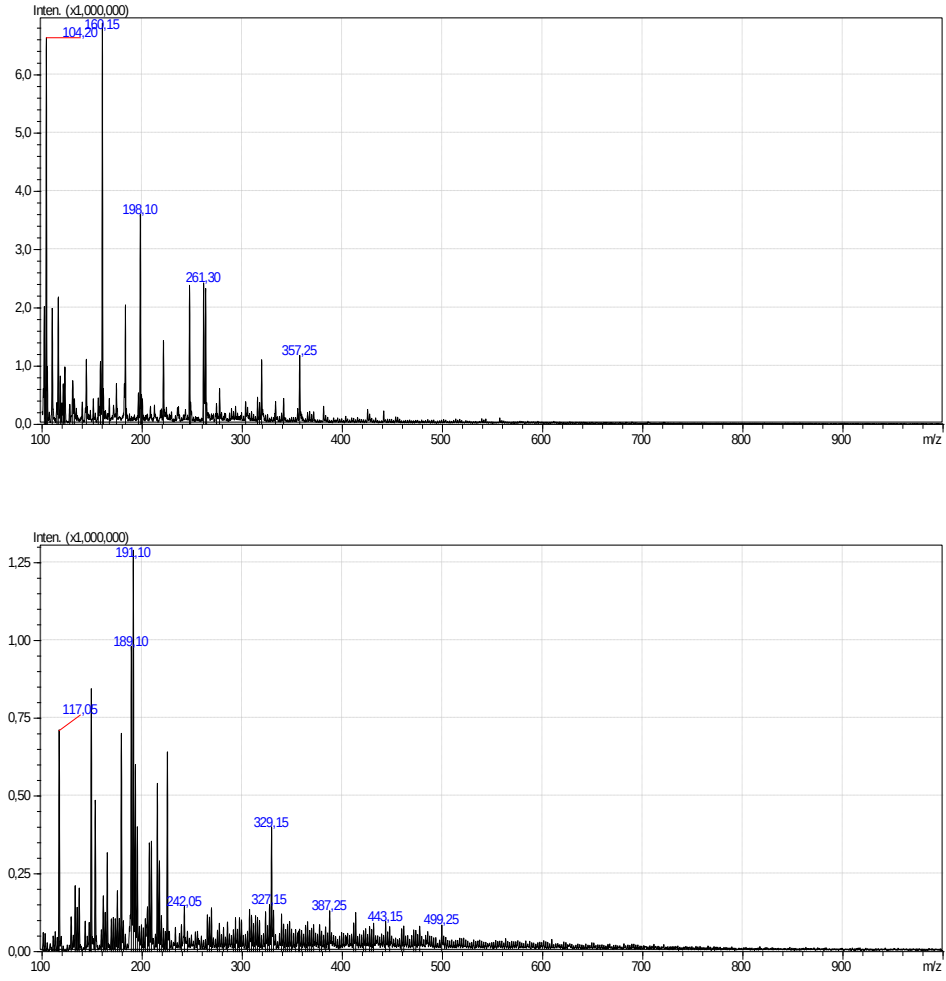


Şekil 5.5. *O. vulgare* etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

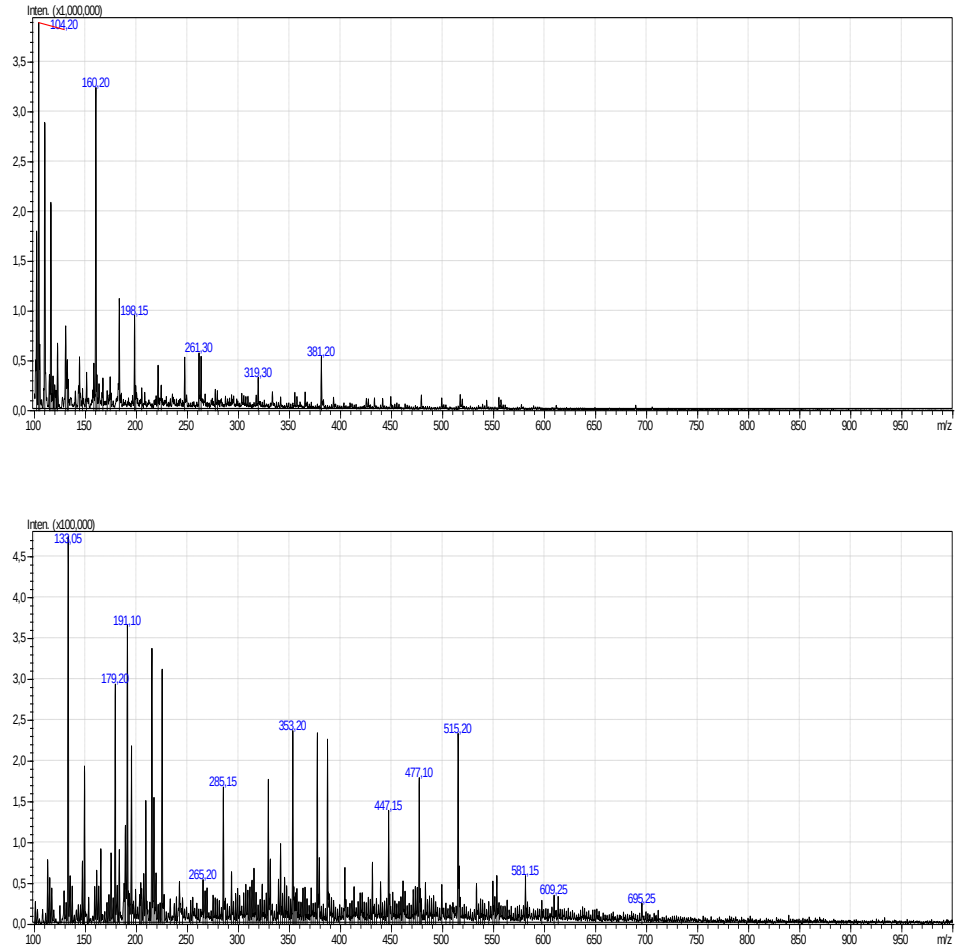


Şekil 5.6. LC-MS/MS analizi sonucu *Origanum vulgare* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

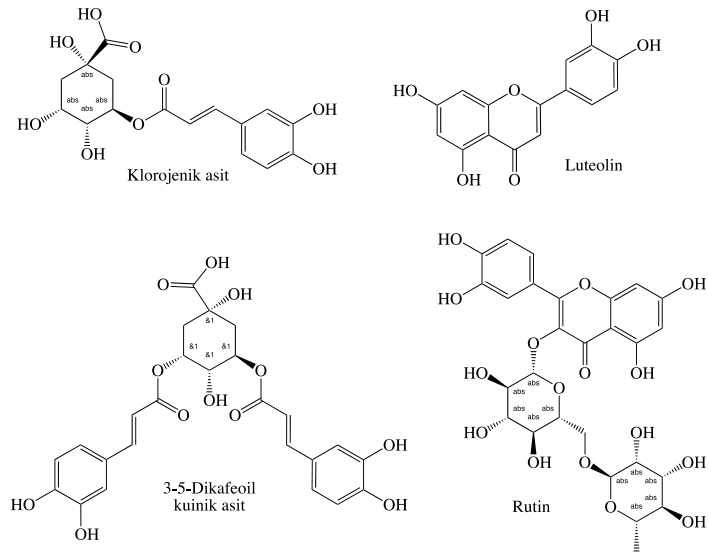
5.1.3. *Achillea millefolium* bitkisinin içerik analizi



Şekil 5.7. *A. millefolium* sulu ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

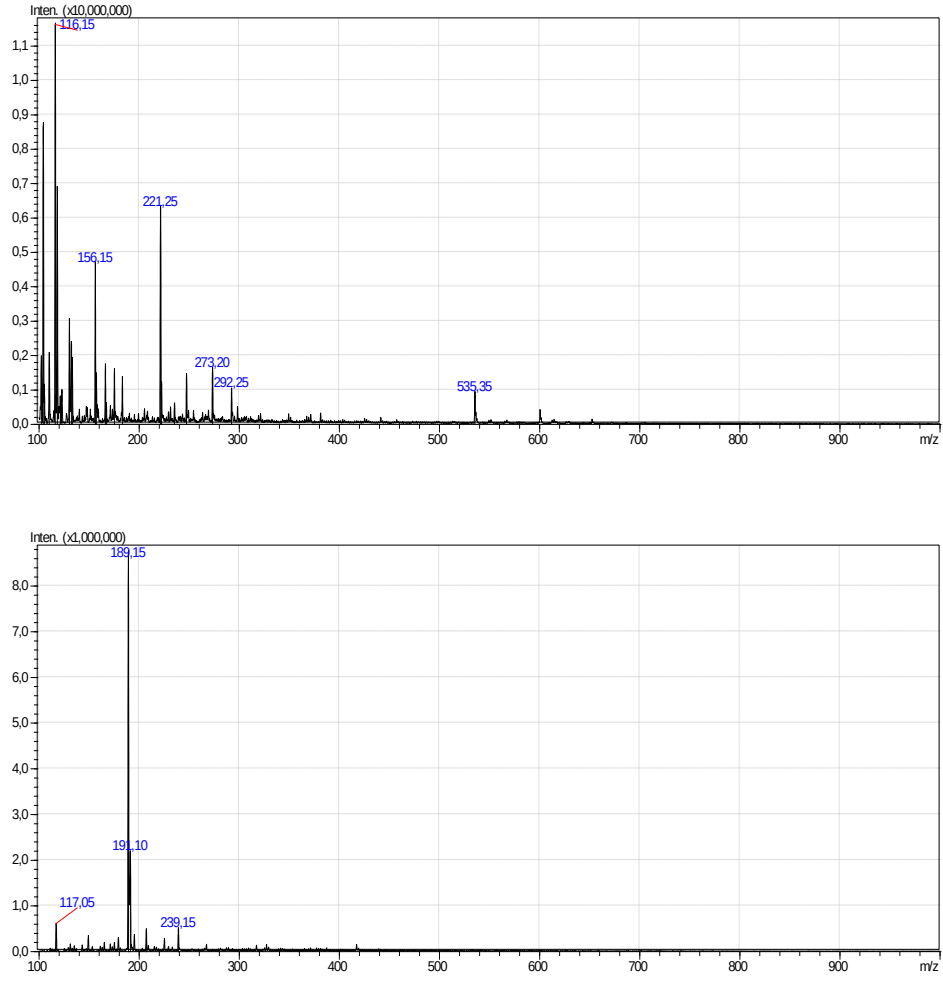


Şekil 5.8. *A. millefolium* etanol ekstralarının E⁺ ve E⁻ tarama sonuçları

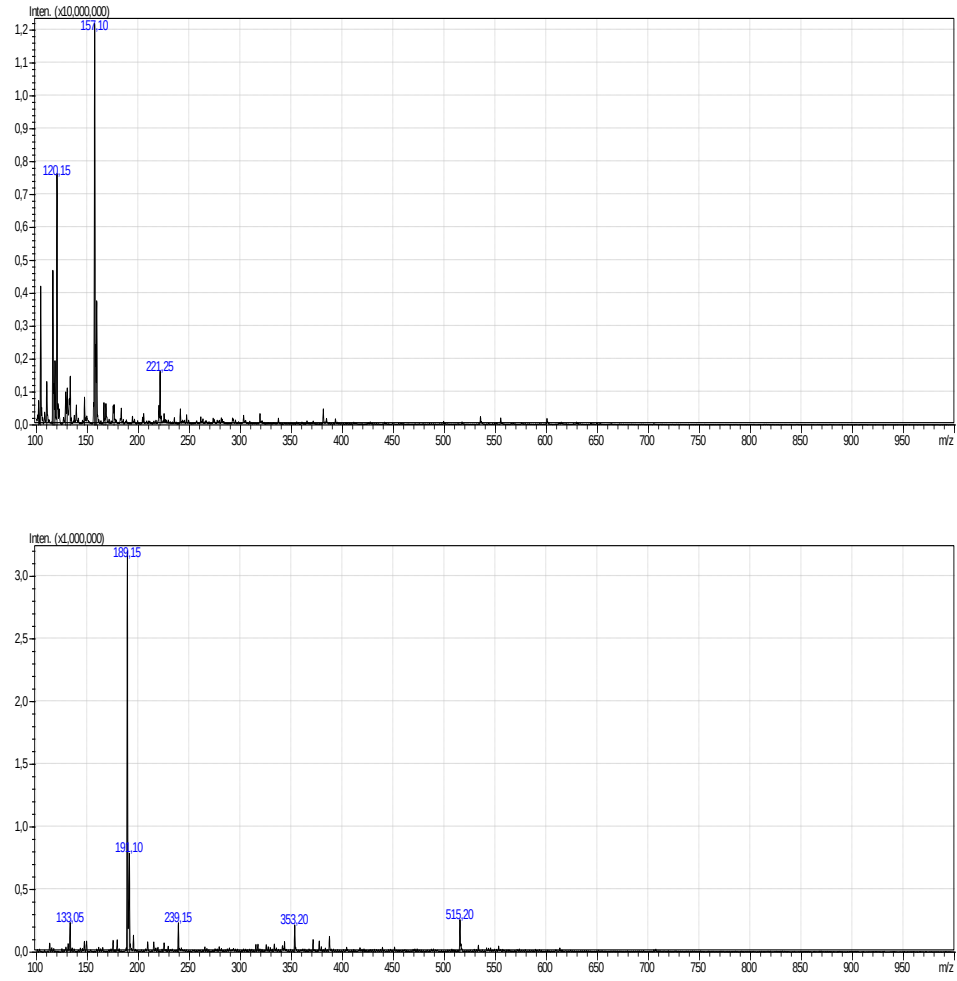


Şekil 5.9. LC-MS/MS analizi sonucu *Achillea millefolium* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

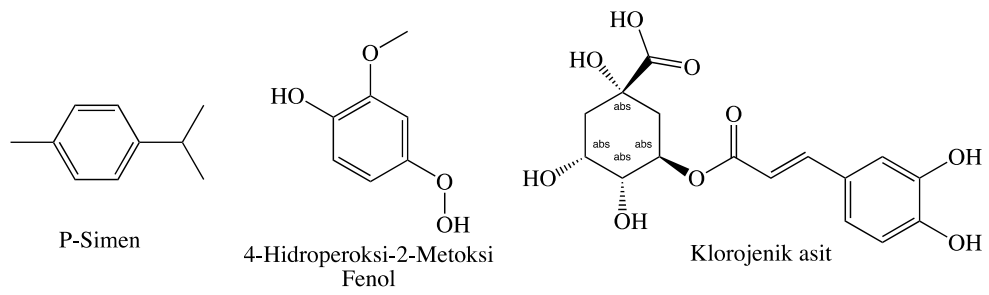
5.1.4. *Artemisia absinthium* bitkisinin içerik analizi



Şekil 5.10. *A. absinthium* sulu ekstraktlarının E+ ve E- tarama sonuçları

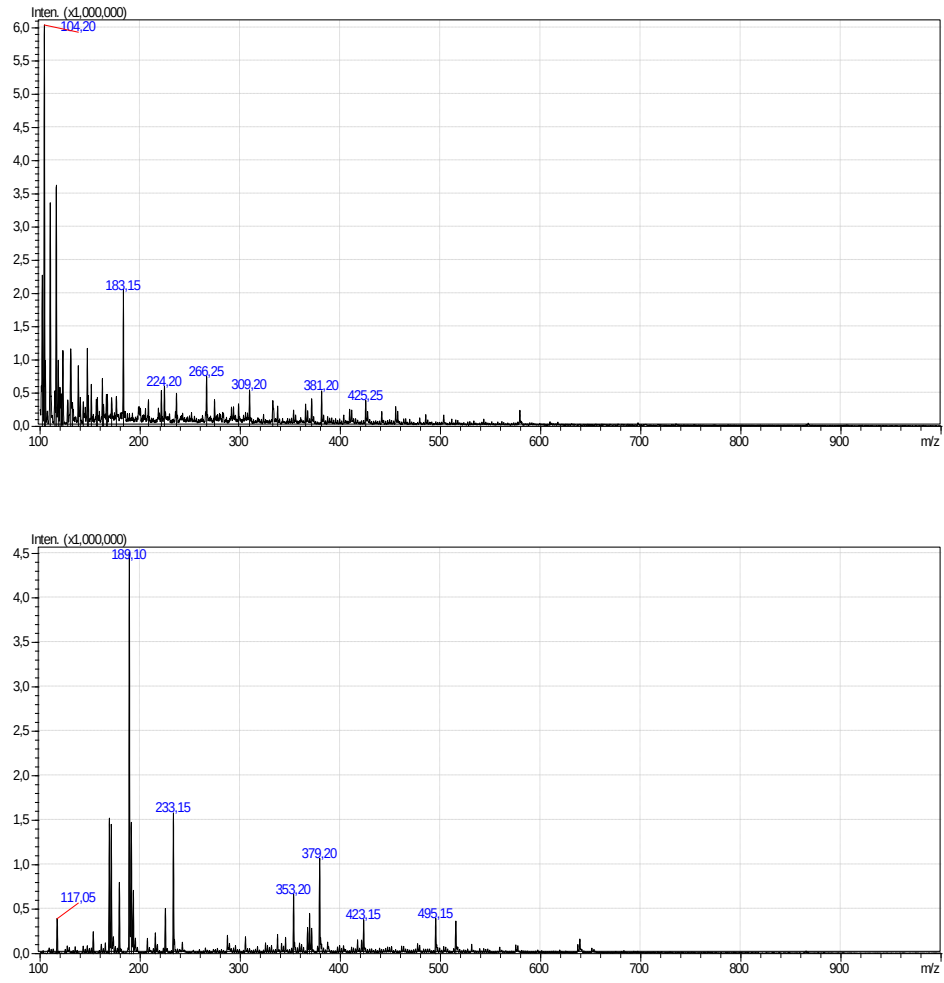


Şekil 5.11. *A. absinthium* etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

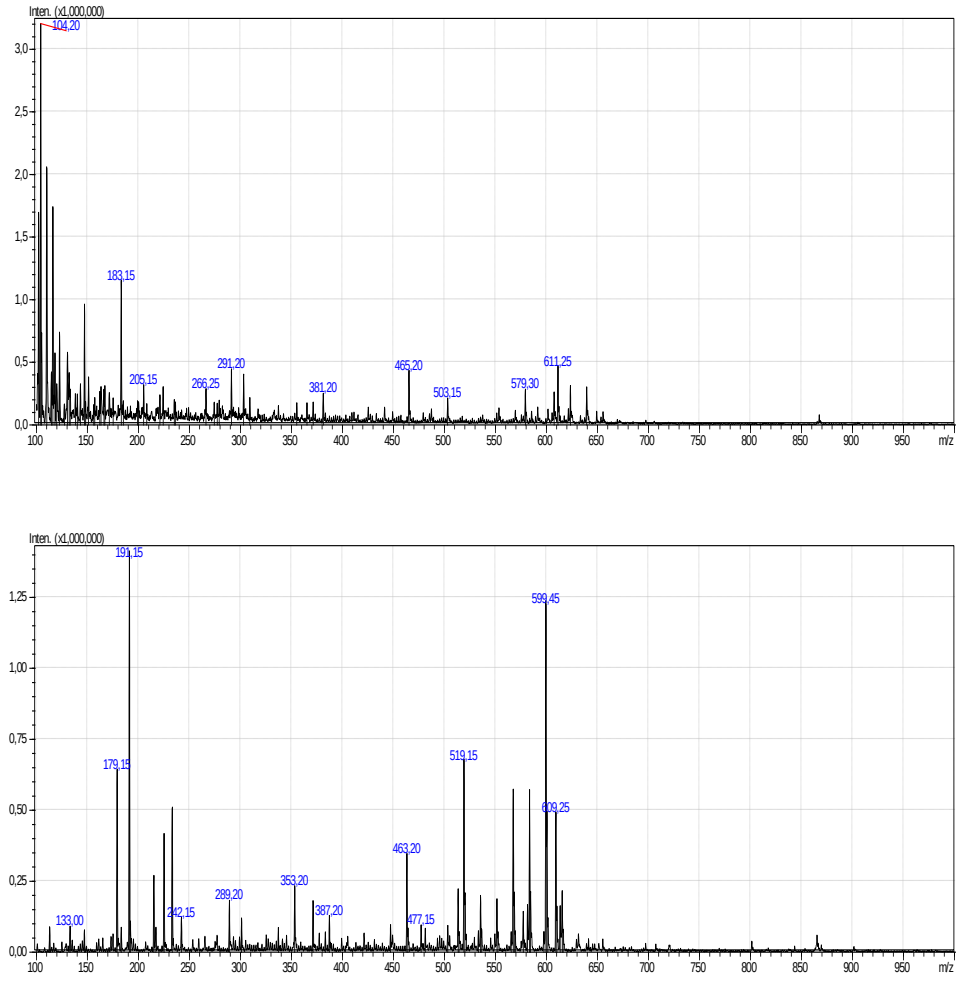


Şekil 5.12. LC-MS/MS analizi sonucu *Artemisia absinthium* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

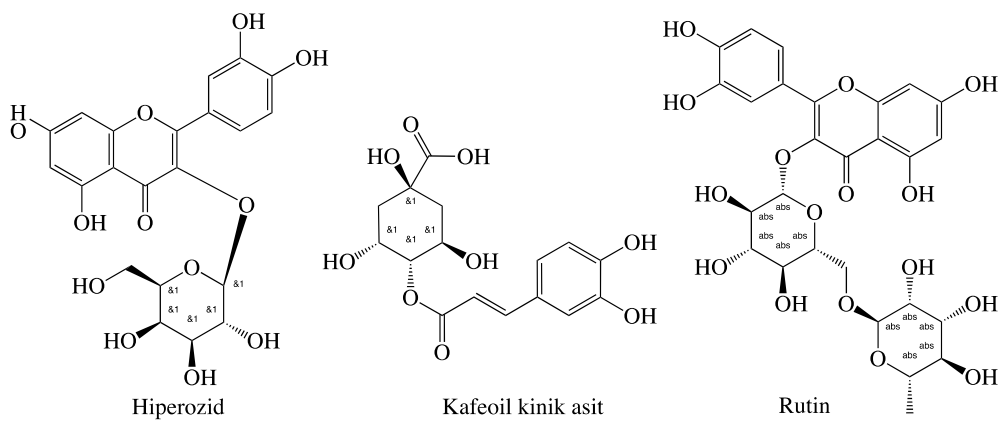
5.1.5. *Hypericum perforatum* bitkisinin içerik analizi



Şekil 5.13. *H. perforatum* sulu ekstralarının E⁺ ve E⁻ tarama sonuçları



Şekil 5.14. *H. perforatum* etanol ekstralarının E+ ve E- tarama sonuçları

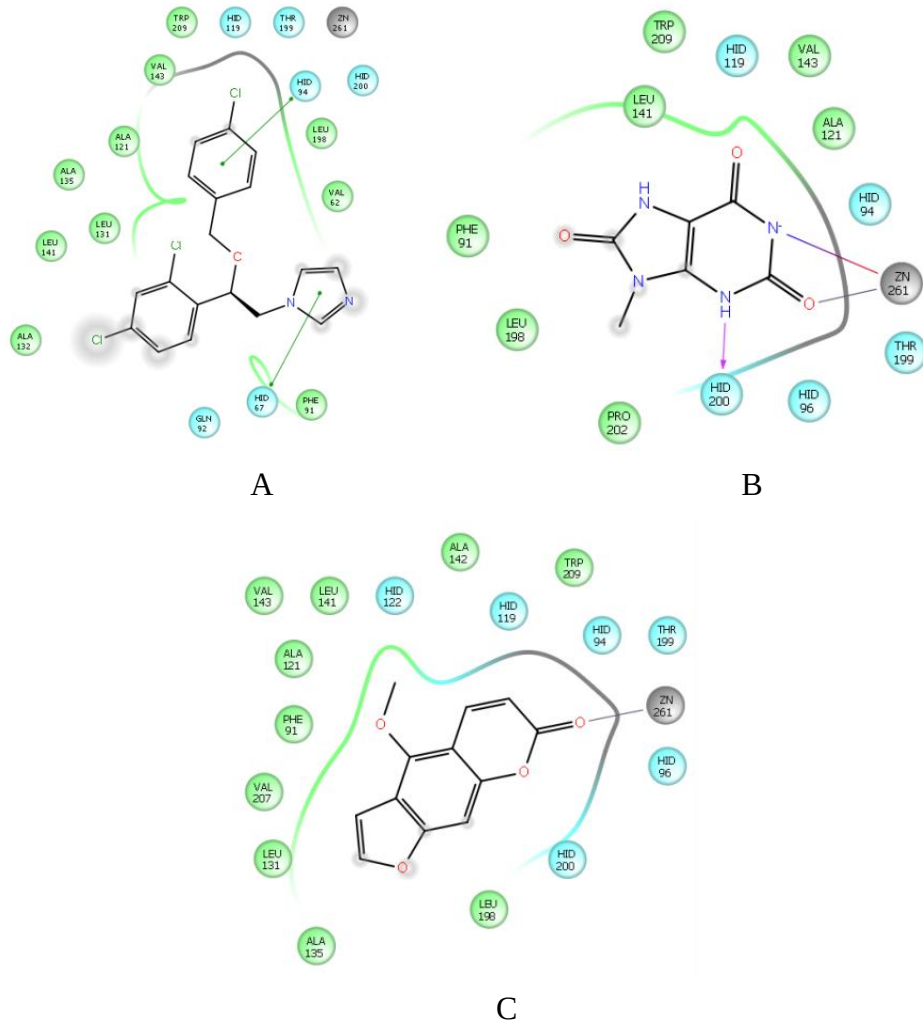


Şekil 5.15. LC-MS/MS analizi sonucu *Hypericum perforatum* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler

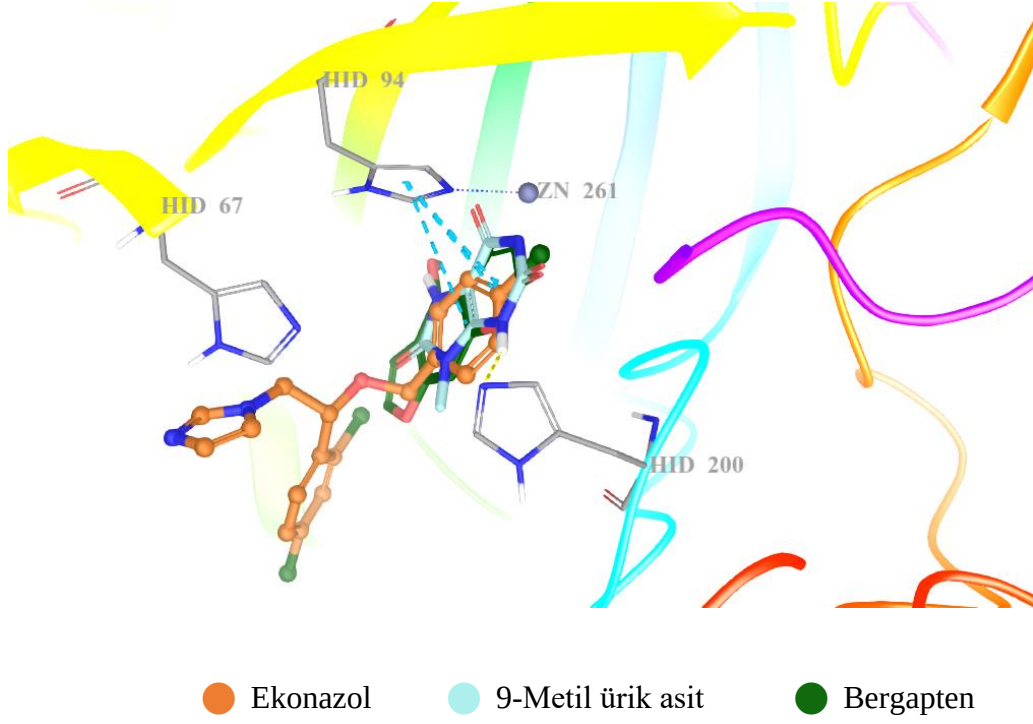
5.2. Moleküler Modelleme (Docking) Bulguları

LC-MS/MS sonuçlarına göre belirlediğimiz bileşikler Schrödinger's Maestro moleküler docking programının "ligand hazırlama" modülünde uygun X-ray kristal yapısı seçilerek optimize edilmiştir (PDB kodları; CA I: 1AZM, CA II: 5WLV).

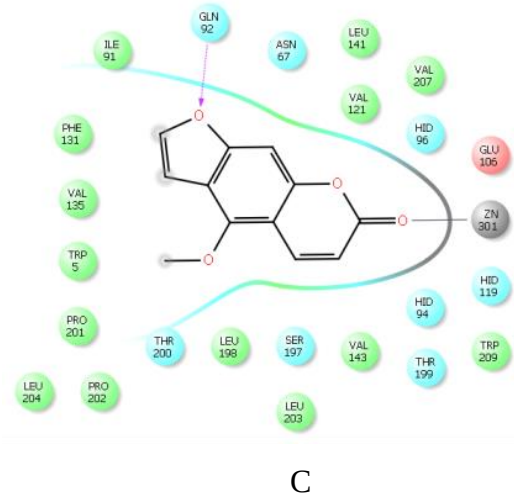
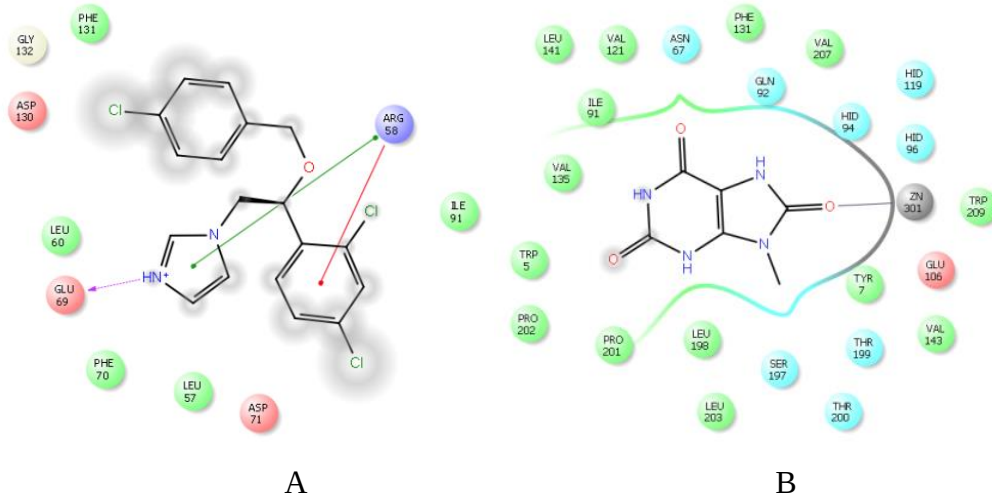
5.2.1. *Equisetum arvense* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları



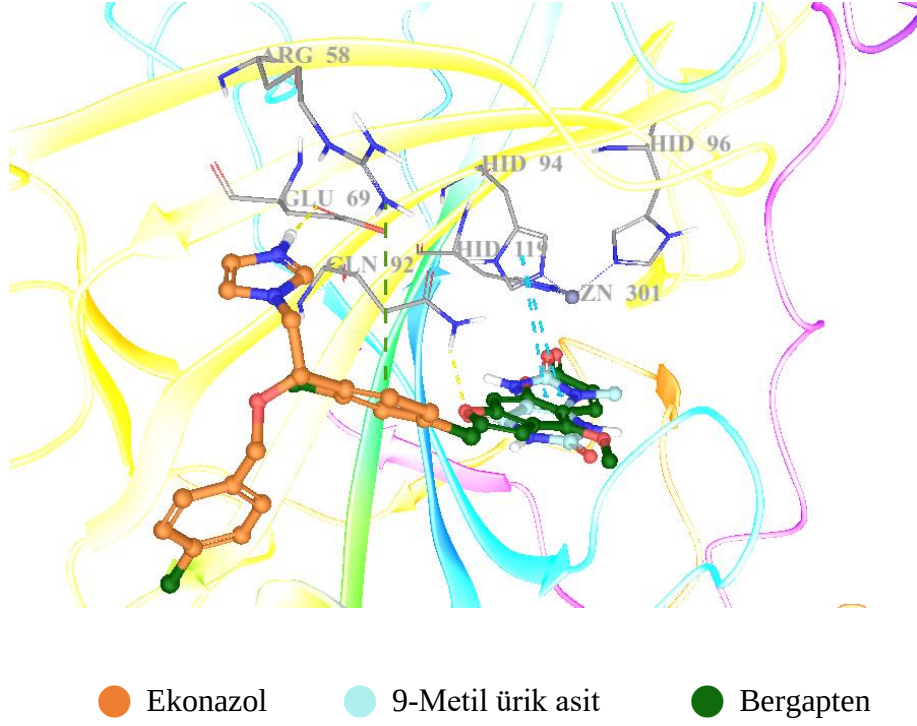
Şekil 5.16. A: Ekonazol, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri



Şekil 5.17. *Equisetum arvense* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Ekonazol'ün etkileşimi, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten'in etkileşimi.

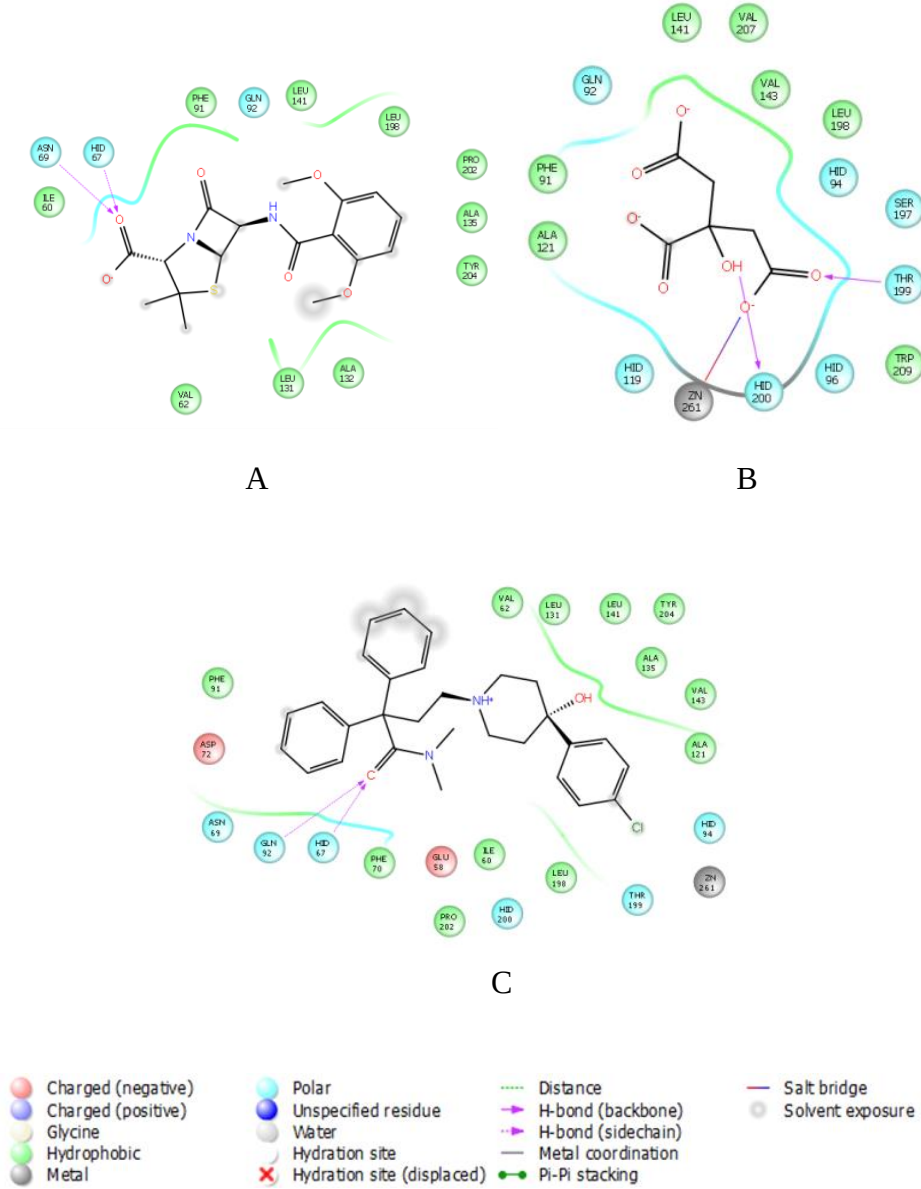


Şekil 5.18. A: Ekonazol, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri

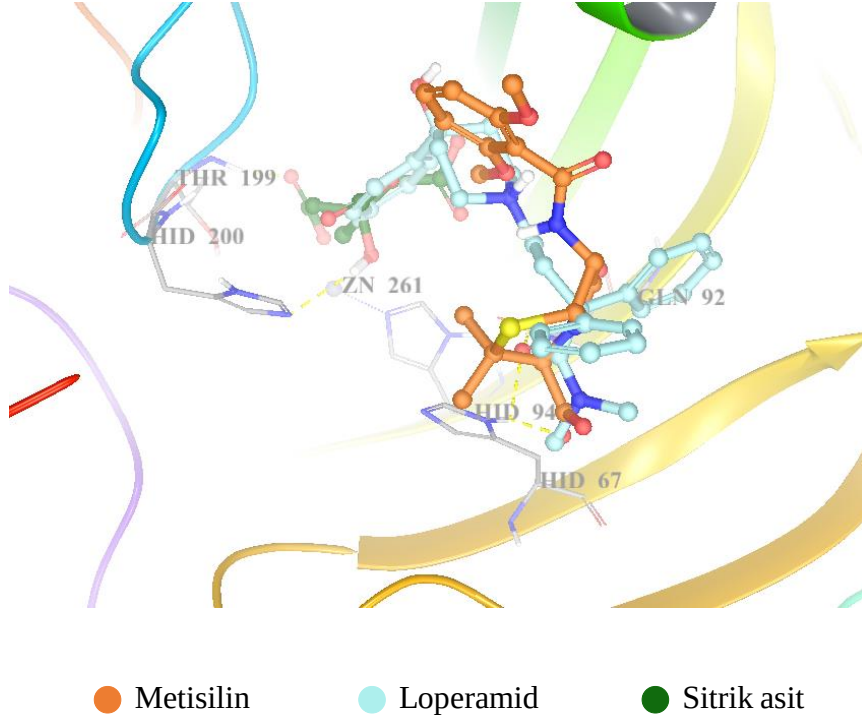


Şekil 5.19. *Equisetum arvense* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Ekonazol'ün etkileşimi, B: 9-Metil ürik asit ve C: Bergapten'in etkileşimi.

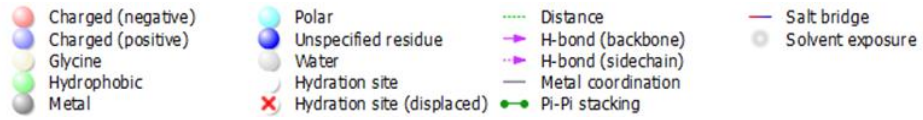
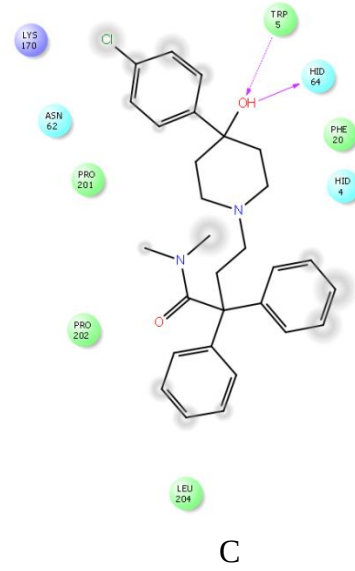
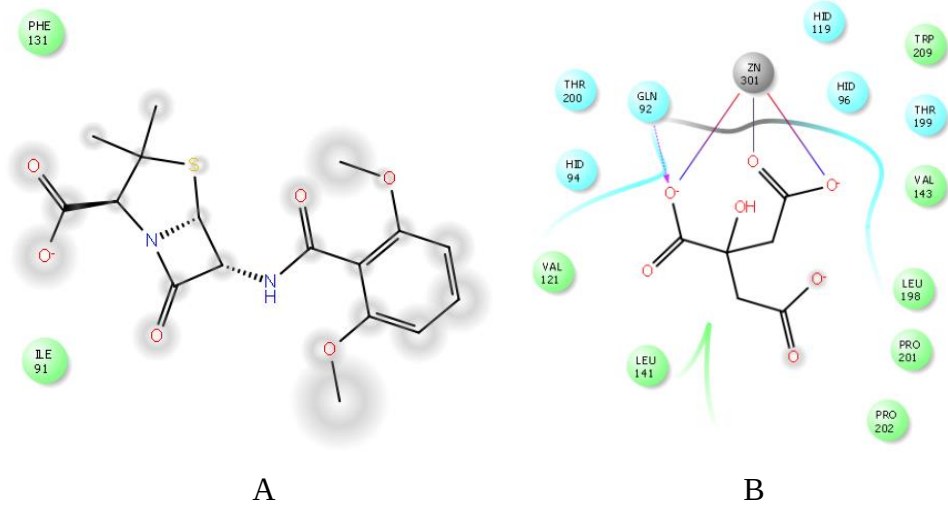
5.2.2. *Origanum vulgare* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları



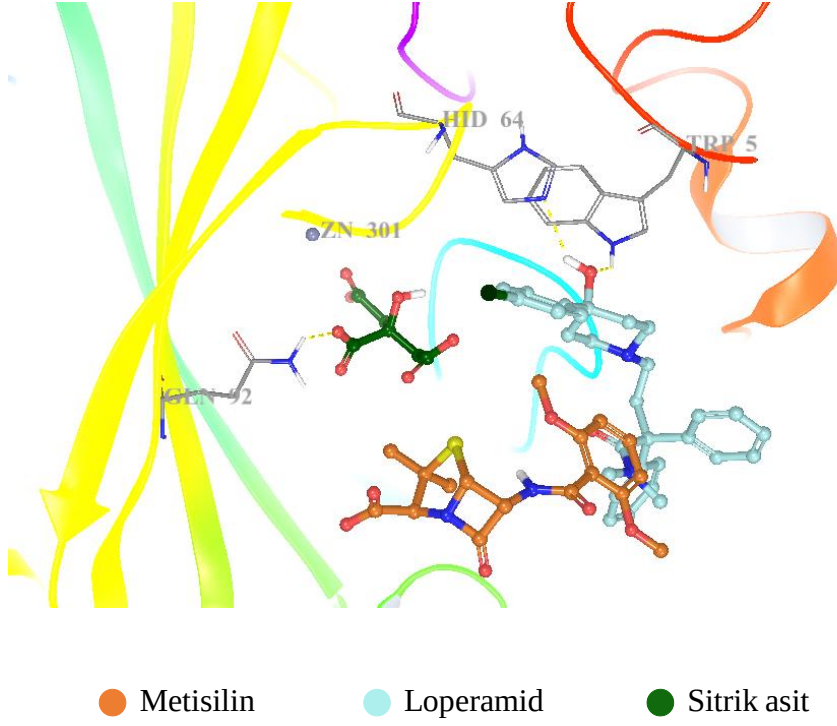
Şekil 5.20. A: Metisilin, B: Loperamid ve C: Sitrik asit bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri



Şekil 5.21. *Origanum vulgare* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Metisilin'in etkileşimi, B: Sitrik asit'in etkileşimi ve C: Loperamid'in etkileşimi.

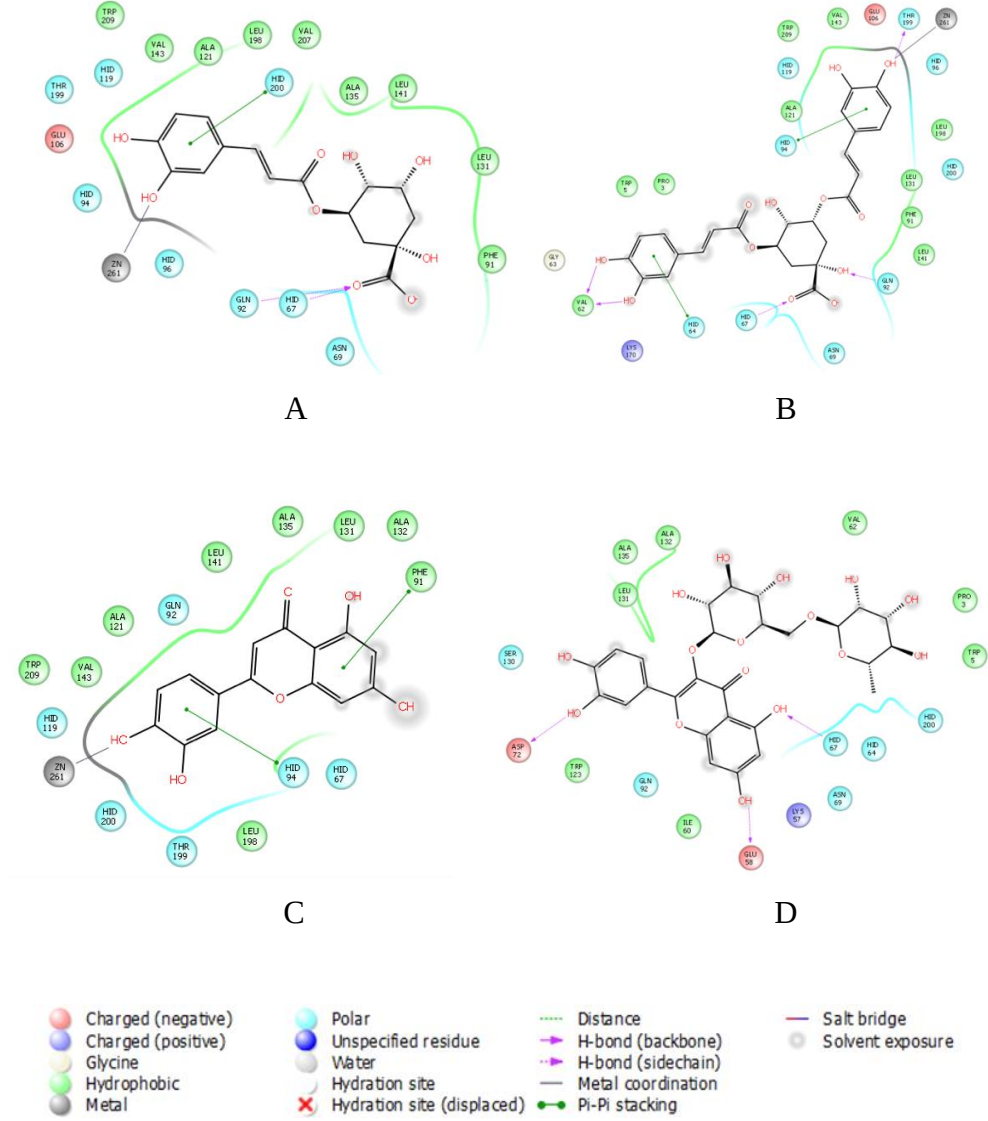


Şekil 5.22. A: Metisilin, B: Loperamid ve C: Sitrik asit bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri

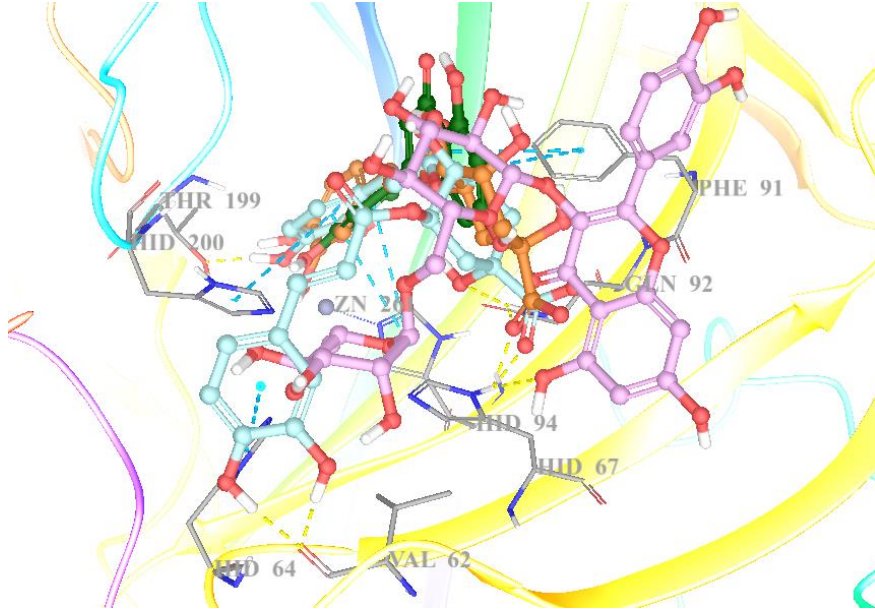


Şekil 5.23. *Origanum vulgare* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Metisilin'in etkileşimi, B: Sitrik asit'in etkileşimi ve C: Loperamid'in etkileşimi.

5.2.3. *Achillea millefolium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları

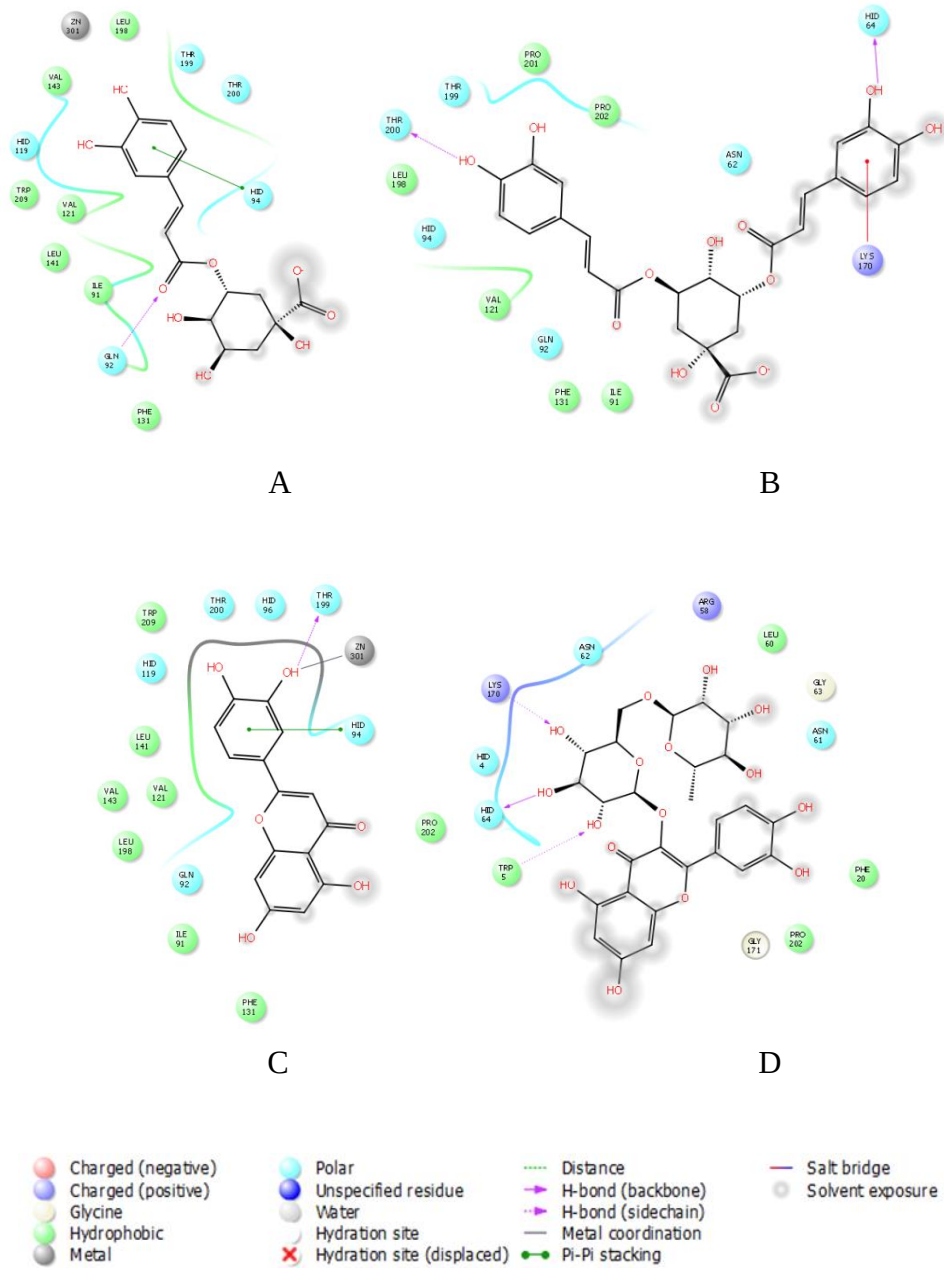


Şekil 5.24. A: Klorojenik asit, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit C: Luteolin ve D: Rutin bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri

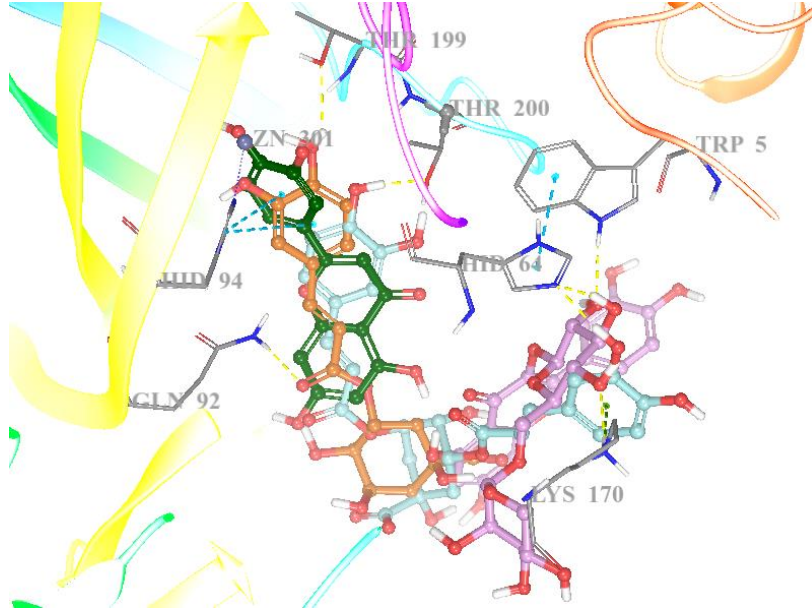


● Klorojenik asit ● 3-5-Dikafeoil kuinik asit ● Luteolin ● Rutin

Şekil 5.25. *Achillea millefolium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit'in etkileşimi, C: Luteolin'in etkileşimi ve D: Rutin'in etkileşimi.



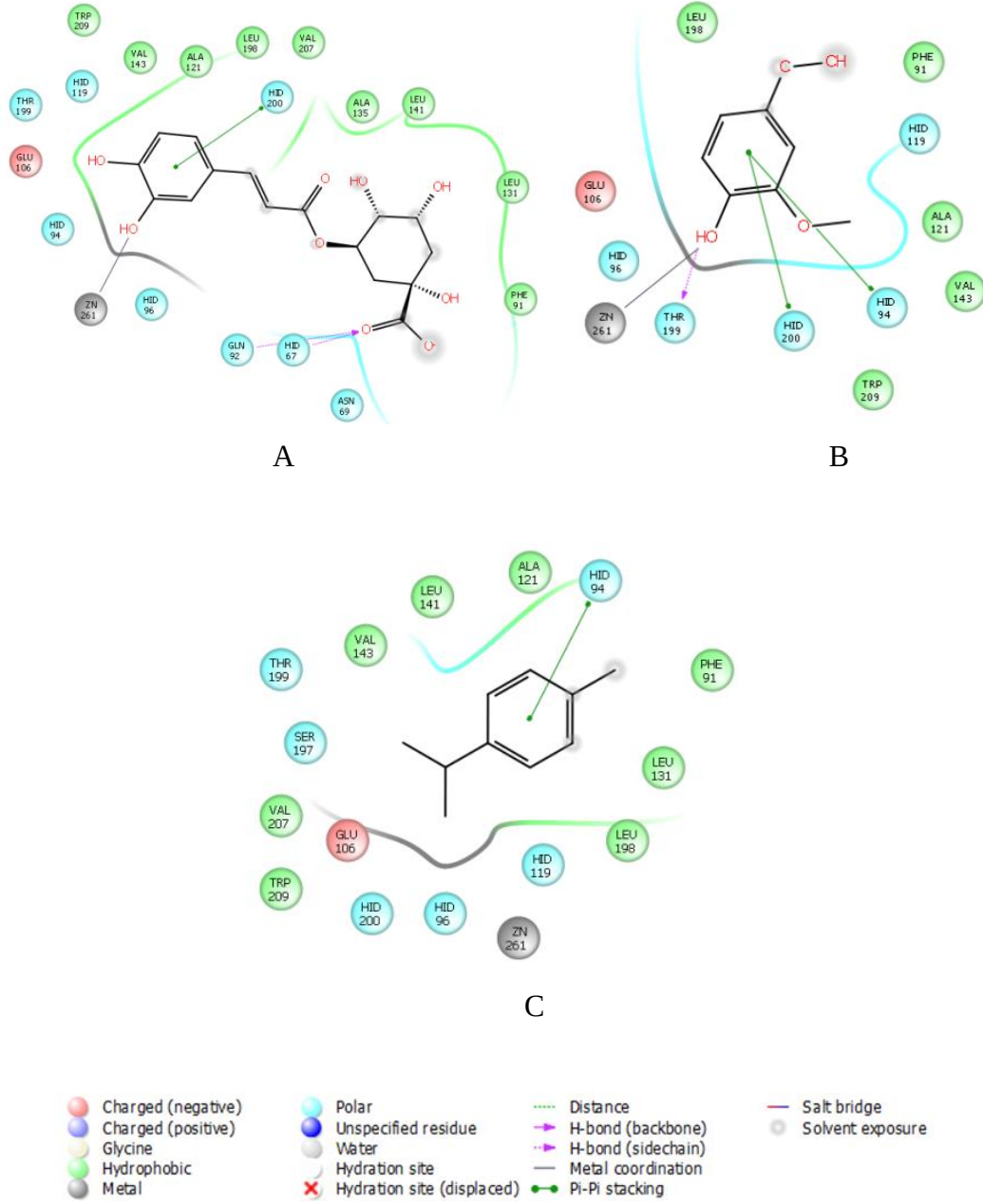
Şekil 5.26. A: Klorojenik asit, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit C: Luteolin ve D: Rutin bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri



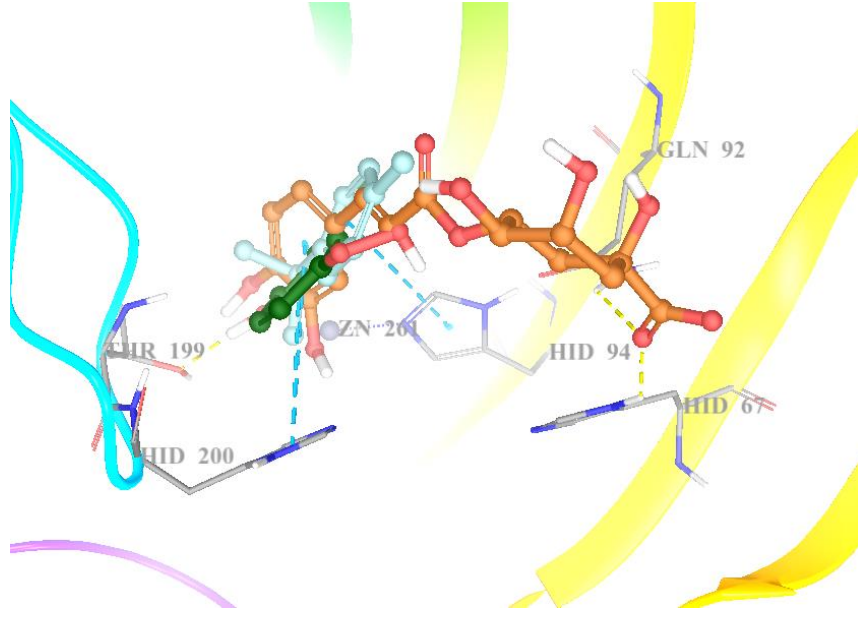
● Klorojenik asit ● 3-5-Dikafeoil kuinik asit ● Luteolin ● Rutin

Şekil 5.27. *Achillea millefolium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 3-5-Dikafeoil kuinik asit'in etkileşimi, C: Luteolin'in etkileşimi ve D: Rutin'in etkileşimi.

5.2.4. *Artemisia absinthium* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları

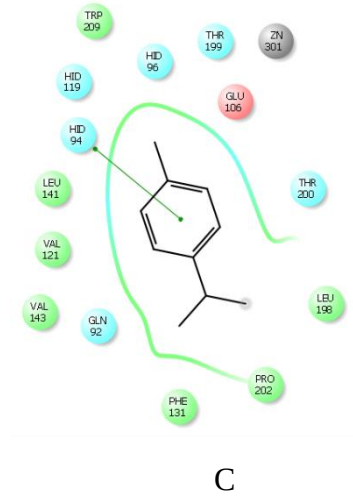
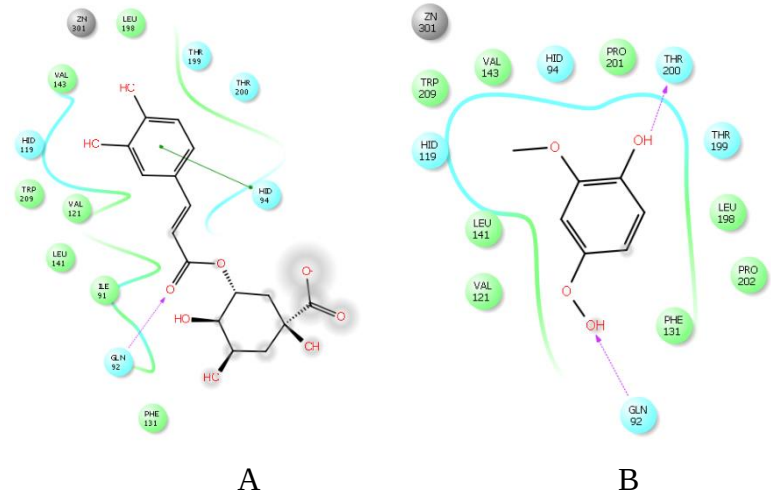


Şekil 5.28. A: Klorojenik asit, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ve C: P-Simen bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri

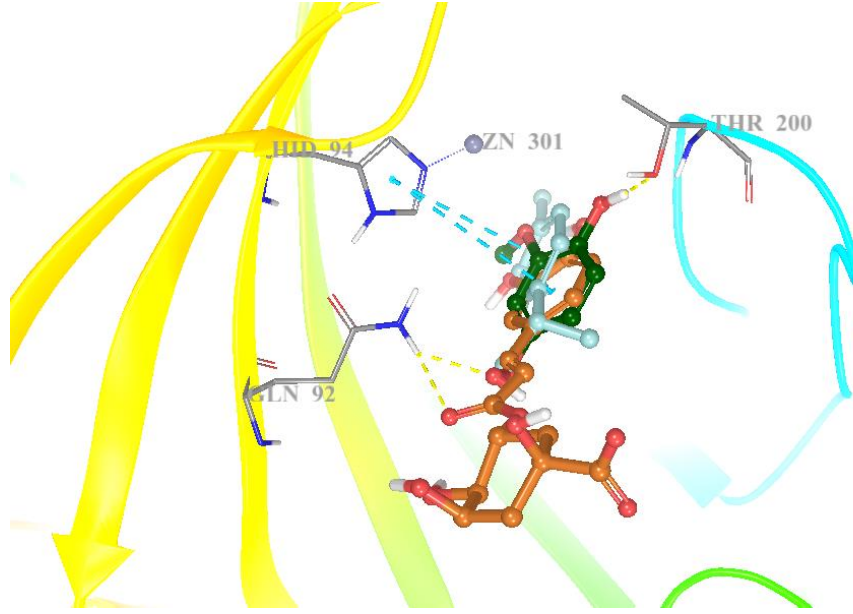


● Klorojenik asit ● 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ● P-Simen

Şekil 5.29. *Artemisia absinthium* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu: 1AZM) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol'ün etkileşimi ve C: P-Simen'in etkileşimi.



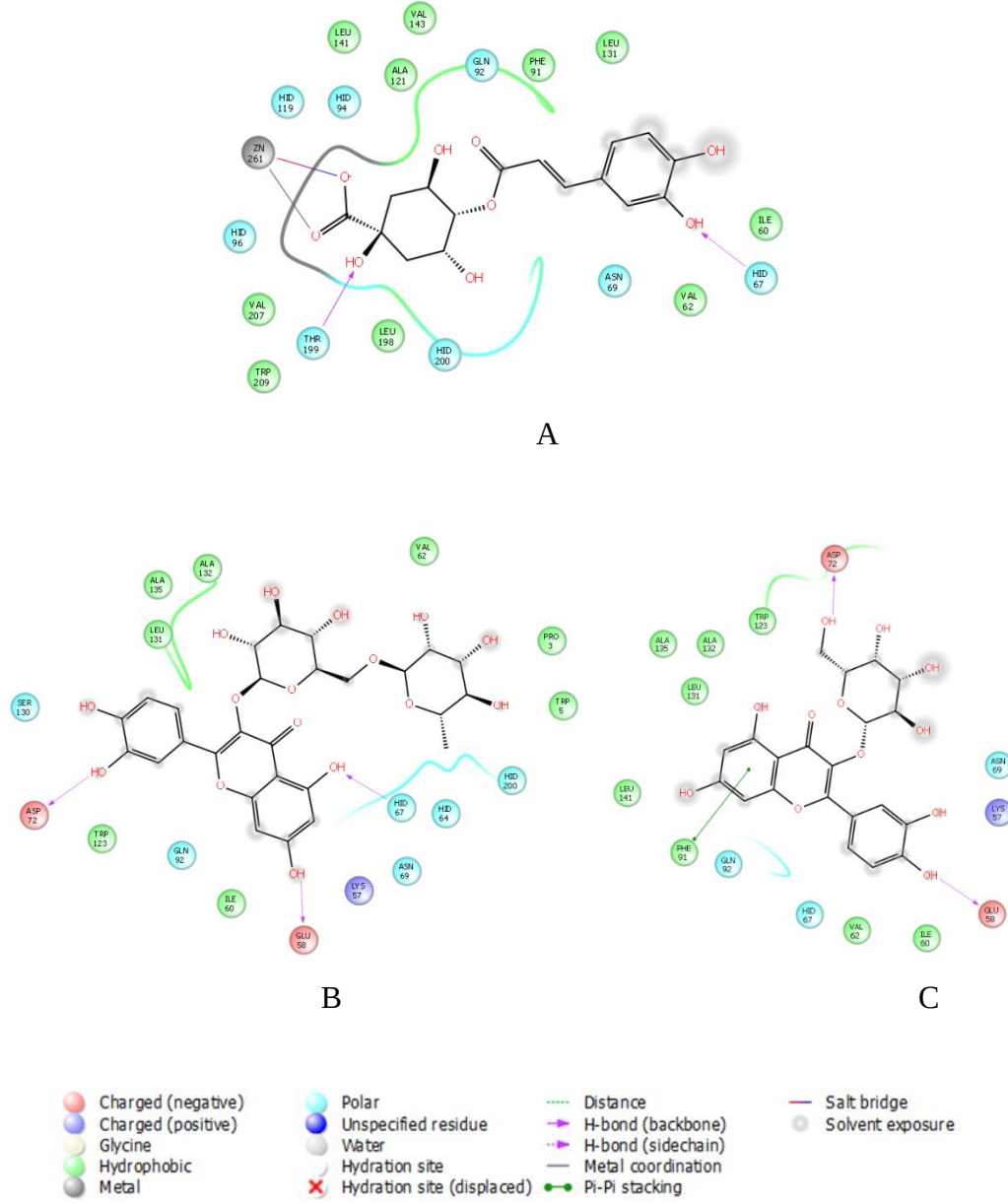
Şekil 5.30. A: Klorojenik asit, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ve C: P-Simen bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri



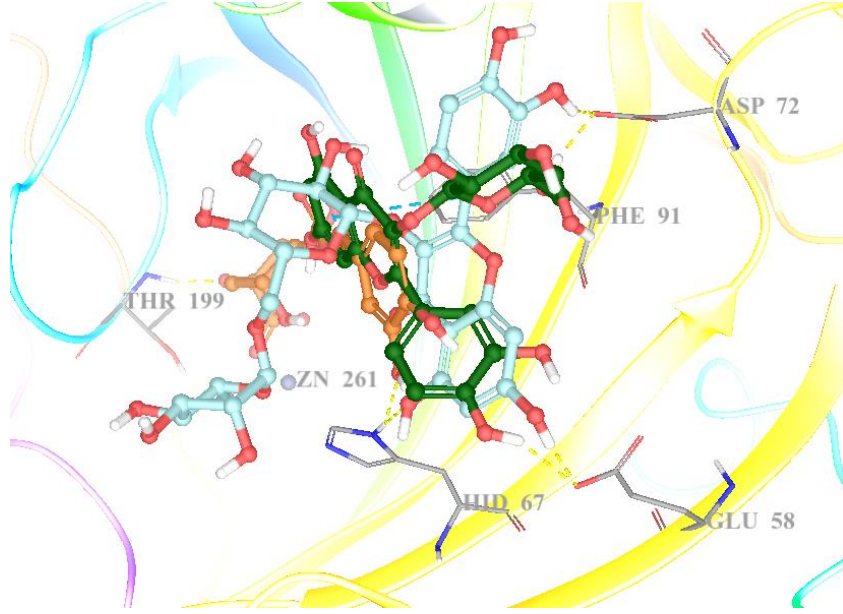
● Klorojenik asit ● 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol ● P-Simen

Şekil 5.31. *Artemisia absinthium* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WLV) ile etkileşimi. A: Klorojenik asit'in etkileşimi, B: 4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol'ün etkileşimi ve C: P-Simen'in etkileşimi.

5.2.5. *Hypericum perforatum* ekstralarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddeler ile ilgili yapılan docking çalışmaları

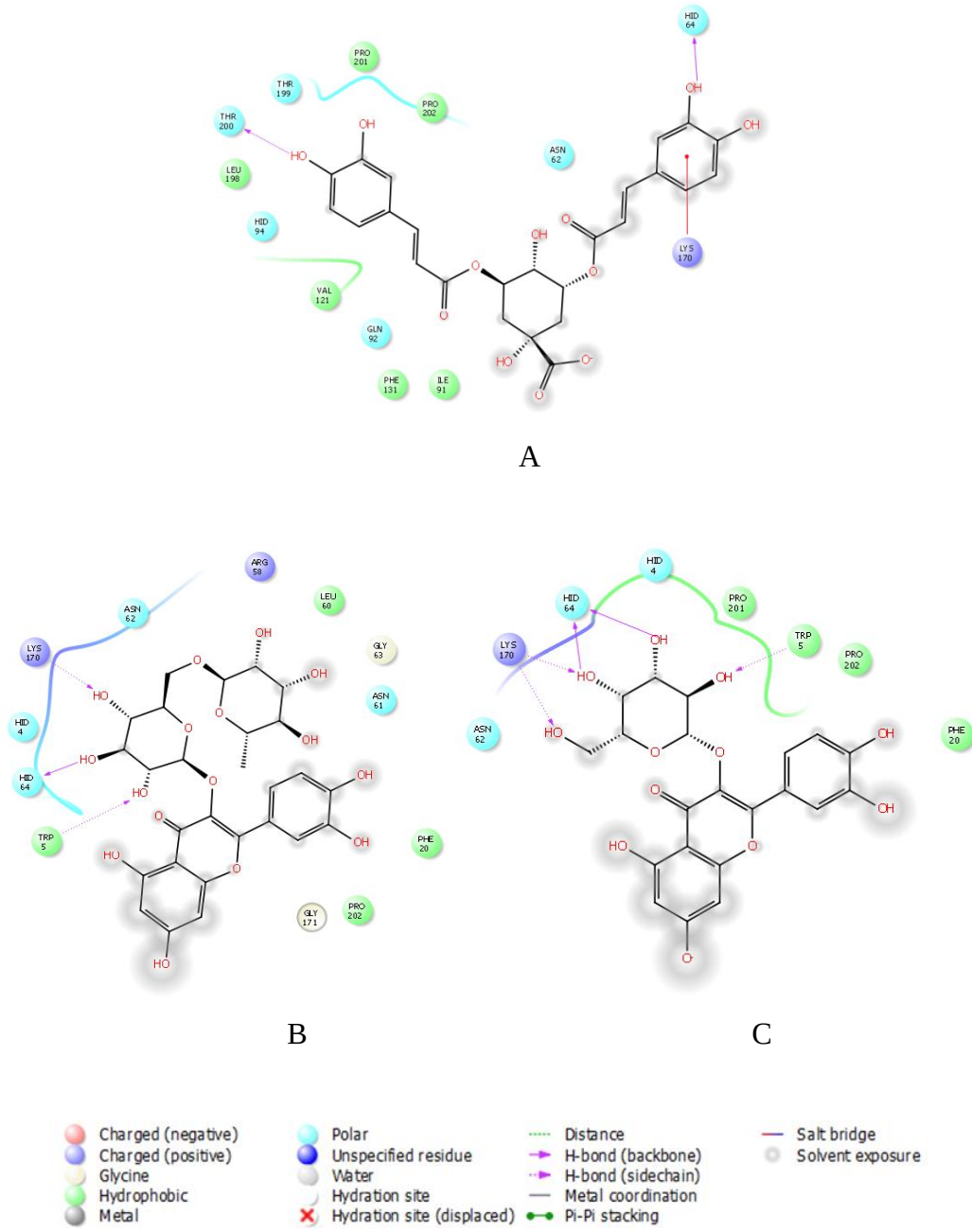


Şekil 5.32. A: Kafeoil kinik asit, B: Rutin ve C: Hiperozid bileşiklerinin hCA I izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri

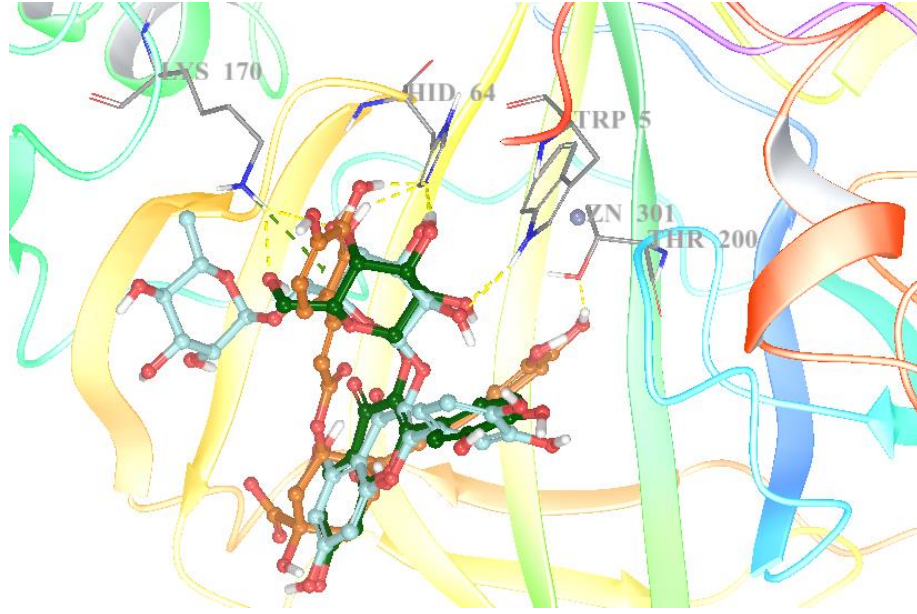


● Kafeoil kinik asit ● Rutin ● Hiperozid

Şekil 5.33. *Hypericum perforatum* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I izoenzimi (PDB kodu:1AZM) ile etkileşimi. A: Kafeoil kinik asit'in etkileşimi, B: Rutin'in etkileşimi ve C: Hiperozid'in etkileşimi.



Şekil 5.34. A: Kafeoil kinik asit, B: Rutin ve C: Hiperozid bileşiklerinin hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki aminoasitler ile etkileşimleri



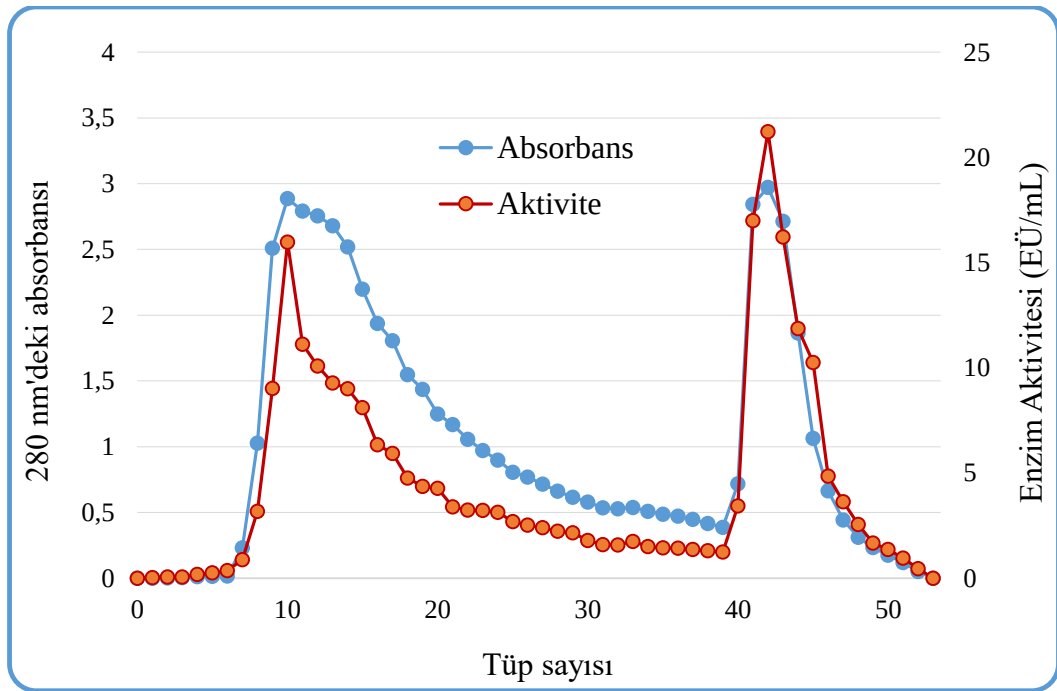
● Kafeoil kinik asit ● Rutin ● Hiperozid

Şekil 5.35. *Hypericum perforatum* ekstrelerinin içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA II izoenzimi (PDB kodu: 5WL V) ile etkileşimi. A: Kafeoil kinik asit'in etkileşimi, B: Rutin'in etkileşimi ve C: Hiperozid'in etkileşimi.

5.3. Karbonik Anhidraz Enzimi Saflaştırma ve Kantitatif Tayin Bulguları

5.3.1. hCA I ve II izoenzimleri için elde edilen saflaştırma sonuçları

Sepharose-4B-L-tirozin afinite kolon kromatografi yöntemi ile insan eritrositlerinden saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyon grafiği şekil 5.36’da ve saflaştırma tablosu Tablo 5.1’de verilmiştir. Elde ettiğimiz verilere göre hCA I izoenzimi 4490 EÜ/mL, hCA II izoenzimi ise 11330 EÜ/mL aktivite gösterdi. Aynı zamanda hCA I izoenziminin %59,98 ve hCA II izoenziminin %64,86 verim ile saflaştığı görüldü.



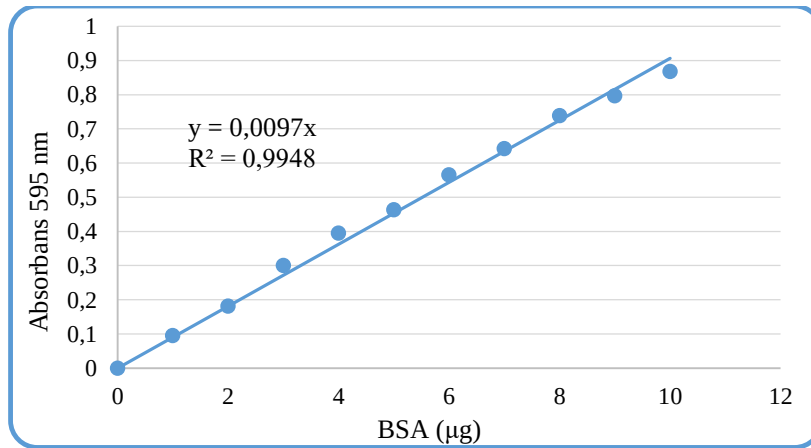
Şekil 5.36. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyon grafiği

Tablo 5.1. İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırma tablosu

Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EÜ)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	2620	20	113,7	2274,2	52400	23,04	100	1
CA I 'Diyaliz öncesi'	3930	7	0,86	6,02	27510	4569	52,50	198,30
CA I 'Diyaliz sonrası'	4490	7	0,86	6,02	31440	5220	59,98	226,56
CA II 'Diyaliz öncesi'	9136	3	0,80	2,40	27408	11420	52,30	495,65
CA II 'Diyaliz sonrası'	11330	3	0,80	2,40	33990	14162	64,86	614,67

5.3.2. Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

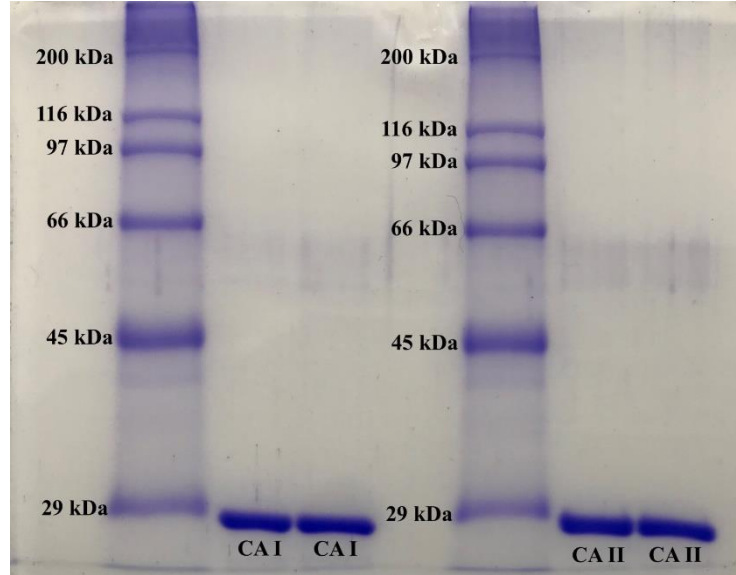
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonundan saflaştırdığımız proteinlerin kantitatif tayinini yapabilmemiz için Bradford yöntemine göre standart grafik çizildi. Saflaştırdığımız enzim çözeltilerindeki protein miktarını belirlemek için hazırladığımız standart grafikten yararlanıldı.



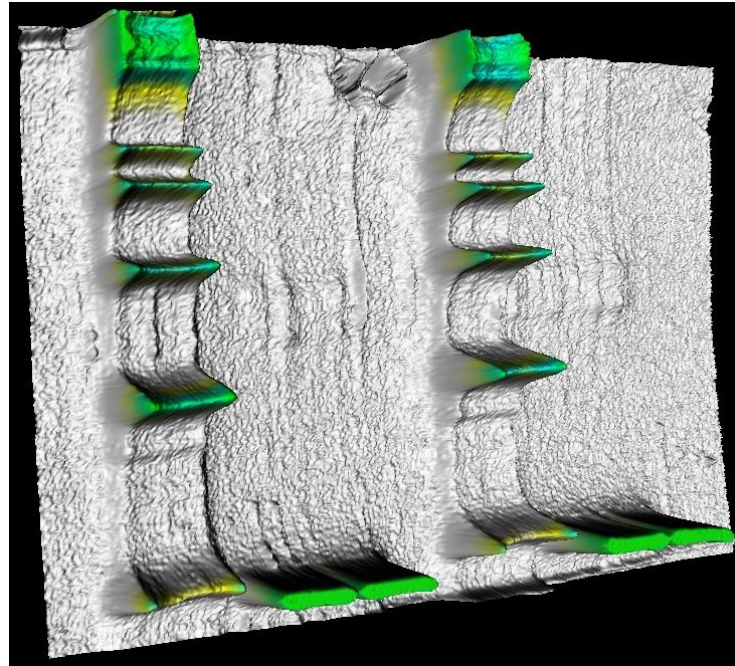
Şekil 5.37. Bradford metodu ile protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği

5.3.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Sepharose-4B-L-tirozin afinite kromatografisi yöntemi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenimlerinin saflığının kontrolü SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile yapıldı.



Şekil 5.38. SDS-PAGE fotoğrafı

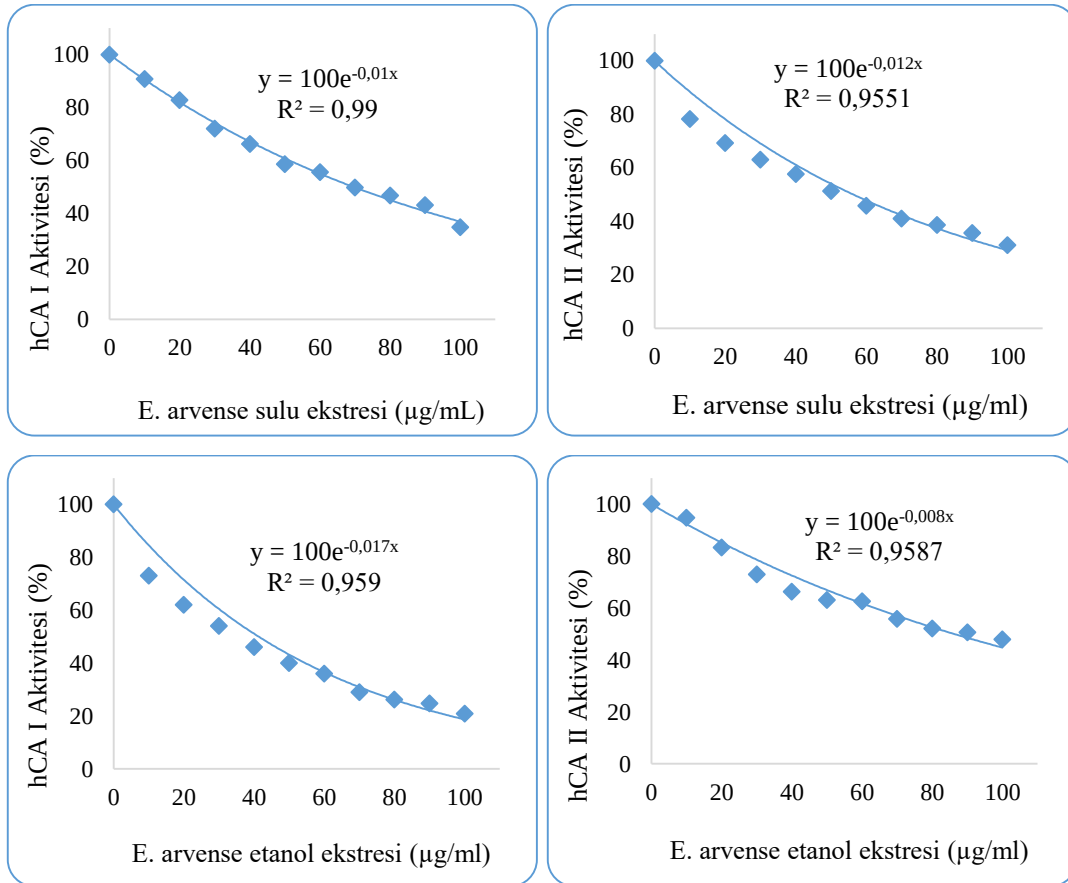


Şekil 5.39. SDS-PAGE 3 boyutlu görünümü

5.4. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) Hidrataz Aktivitesi Üzerine Bitki Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Yapılan Çalışma Sonuçları

5.4.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine *Equisetum arvense* (Tarla atkuyruğu) ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

İnhibitör olarak kullandığımız *Equisetum arvense* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin doymuş substrat konsantrasyonunda, afinite kromatografisi ile saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesine bakıldı. İnhibisyon çalışmaları CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Elde ettiğimiz verilere göre *Equisetum arvense* ekstreleri için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri (Şekil 5.40) aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.40. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *E. arvense* bitki ekstrelerinin farklı konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri

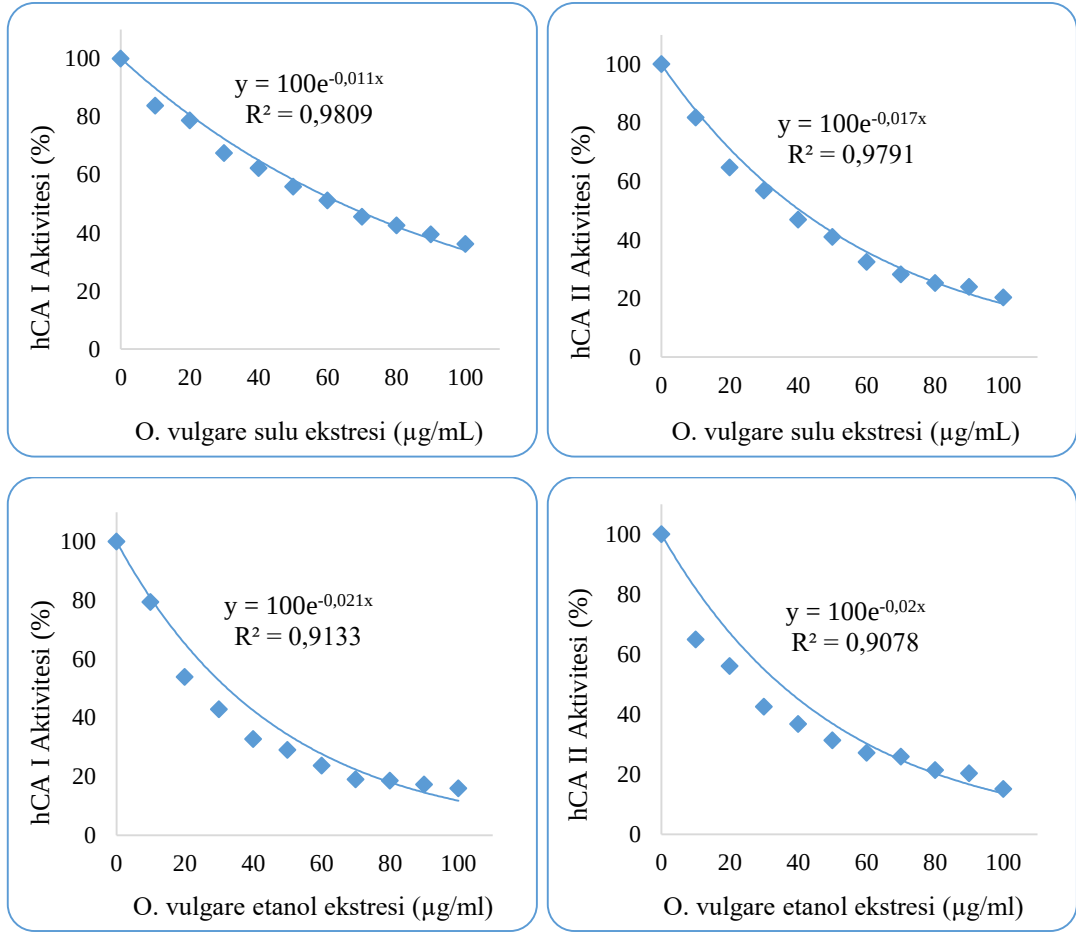
Aktivite(%) – İnhibitör grafikleri incelendiğinde, hCA I izoenziminin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *E. arvense*'nin etanol ekstresi, hCA II izoenziminin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine ise *E. arvense*'nin sulu ekstresi daha yüksek inhibisyon etki gösterdi.

Tablo 5.2. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren *E. arvense* ekstrelerinin r^2 ve IC₅₀ değerleri

Bitki ekstresi	İzoenzim	IC ₅₀ (µg/mL)	r^2
<i>E. arvense</i> bitkisinin sulu ekstresi	hCA I	69,00	0,9900
	hCA II	57,50	0,9551
<i>E. arvense</i> bitkisinin etanol ekstresi	hCA I	40,59	0,9590
	hCA II	86,25	0,9587

5.4.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine *Origanum vulgare* (Keklik otu) ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

İnhibitör olarak kullandığımız *Origanum vulgare* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin doygun substrat konsantrasyonunda, afinite kromatografisi ile saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesine bakıldı. İnhibisyon çalışmaları CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Elde ettiğimiz verilere göre *Origanum vulgare* ekstreleri için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri (Şekil 5.41) aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.41. hCA I ve II izoenzimlerinin CO_2 -Hidrataz aktivitesi üzerine *O. vulgare* bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC_{50} değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri

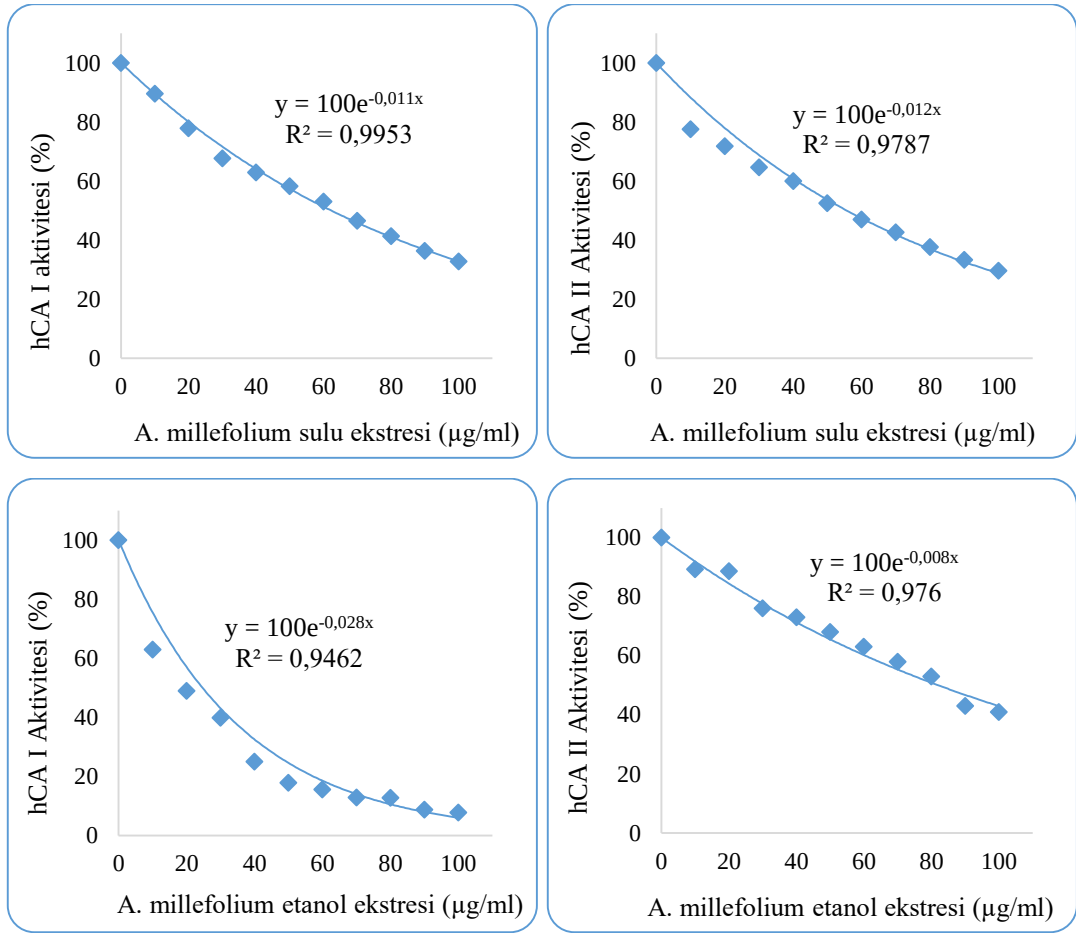
Aktivite(%) – İnhibitör grafikleri incelendiğinde, hem hCA I hem de hCA II izoenzimlerinin CO_2 -Hidrataz aktivitesi üzerine *O. vulgare*'nin etanol ekstraları daha yüksek inhibisyon etki gösterdi.

Tablo 5.3. hCA I ve II izoenzimlerinin CO_2 -Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren *O. vulgare* ekstralarının r^2 ve IC_{50} değerleri

Bitki ekstresi	İzoenzim	IC_{50} (μg/mL)	r^2
<i>O. vulgare</i> bitkisinin sulu ekstresi	hCA I	62,72	0,9809
	hCA II	40,58	0,9791
<i>O. vulgare</i> bitkisinin etanol ekstresi	hCA I	32,85	0,9133
	hCA II	34,50	0,9078

5.4.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine *Achillea millefolium* (Civanperçemi) ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

İnhibitör olarak kullandığımız *Achillea millefolium* bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının doygun substrat konsantrasyonunda, afinite kromatografisi ile saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesine bakıldı. İnhibisyon çalışmaları CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Elde ettiğimiz verilere göre *Achillea millefolium* ekstreleri için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri (Şekil 5.42) aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.42. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *A. millefolium* bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri

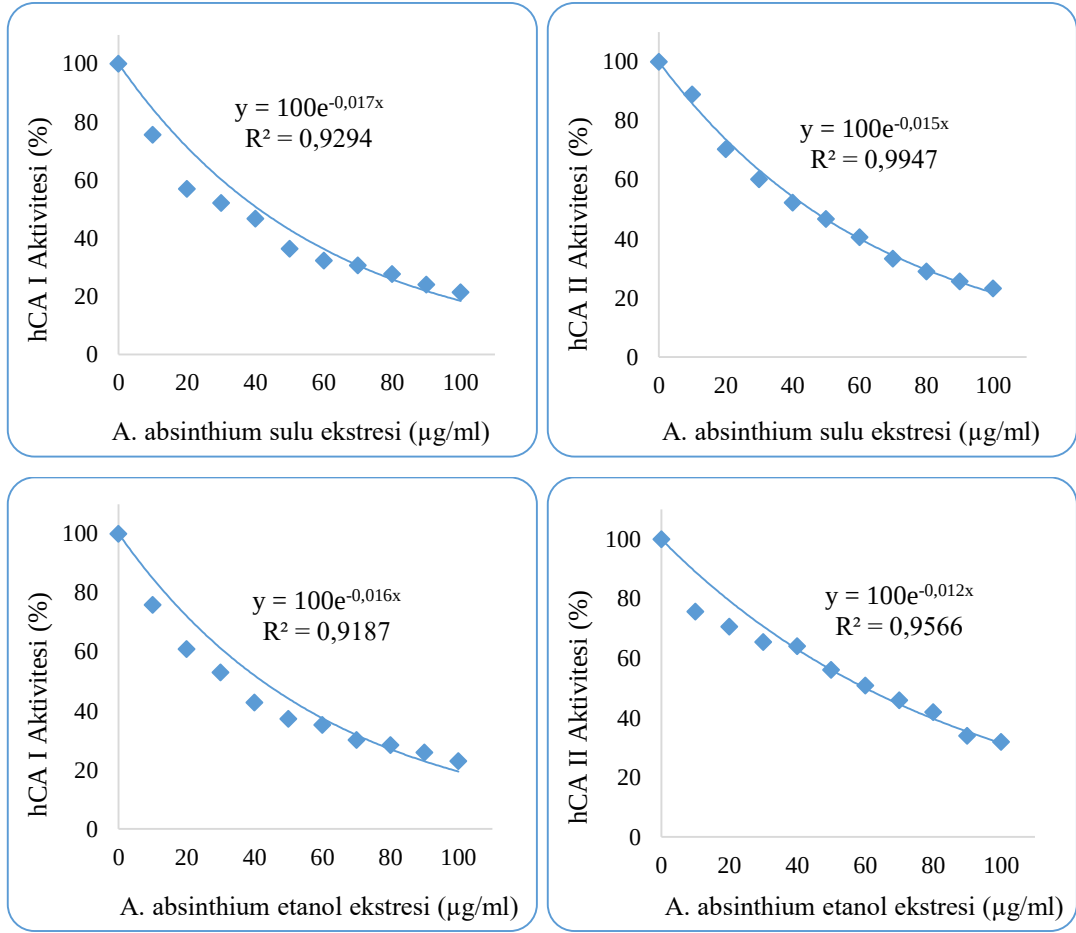
Aktivite(%) – İnhibitör grafikleri incelendiğinde, hCA I izoenziminin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *A. millefolium*'un etanol ekstresi, hCA II izoenziminin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine ise *A. millefolium*'un sulu ekstresi daha yüksek inhibisyon etki gösterdi.

Tablo 5.4. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren *A. millefolium* ekstrelerinin r^2 ve IC₅₀ değerleri

Bitki ekstresi	İzoenzim	IC ₅₀ (µg/mL)	r^2
<i>A. millefolium</i> bitkisinin sulu ekstresi	hCA I	62,72	0,9953
	hCA II	57,50	0,9787
<i>A. millefolium</i> bitkisinin etanol ekstresi	hCA I	24,64	0,9462
	hCA II	86,25	0,9760

5.4.4. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine *Artemisia absinthium* (Pelin otu) ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

İnhibitör olarak kullandığımız *Artemisia absinthium* bitkisinin su ve etanol ekstrelerinin doygun substrat konsantrasyonunda, afinite kromatografisi ile saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesine bakıldı. İnhibisyon çalışmaları CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Elde ettiğimiz verilere göre *Artemisia absinthium* ekstreleri için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri (Şekil 5.43) aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.43. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *A. absinthium* bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri

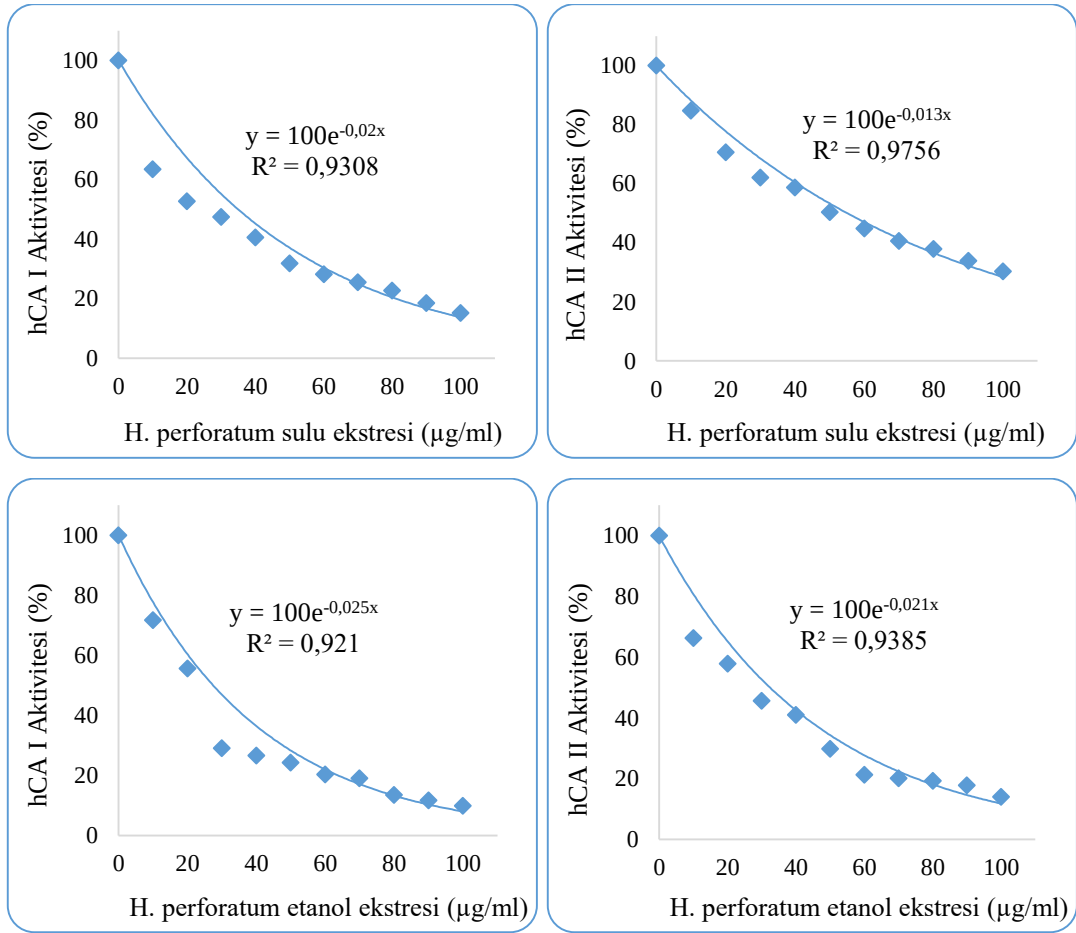
Aktivite(%) – İnhibitör grafikleri incelendiğinde, hem hCA I hem de hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *A. absinthium*’un sulu ekstraları daha yüksek inhibisyon etki gösterdi.

Tablo 5.5. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etki gösteren *A. absinthium* ekstralarının r² ve IC₅₀ değerleri

Bitki ekstresi	İzoenzim	IC ₅₀ (µg/mL)	r ²
<i>A. absinthium</i> bitkisinin sulu ekstresi	hCA I	40,58	0,9294
	hCA II	46,00	0,9947
<i>A. absinthium</i> bitkisinin etanol ekstresi	hCA I	43,13	0,9187
	hCA II	57,50	0,9566

5.4.5. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron) ekstreleri ile ilgili yapılan çalışma sonuçları

İnhibitör olarak kullandığımız *Hypericum perforatum* bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının doygun substrat konsantrasyonunda, afinite kromatografisi ile saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesine bakıldı. İnhibisyon çalışmaları CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Elde ettiğimiz verilere göre *Hypericum perforatum* ekstreleri için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri (Şekil 5.44) aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.44. hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrataz aktivitesi üzerine *H. perforatum* bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ değerlerinin bulunması için çizilen [Aktivite(%)] – [İnhibitör] grafikleri

Aktivite(%) – İnhibitör grafikleri incelendiğinde, hem hCA I hem de hCA II izoenzimlerinin CO₂-Hidrat az aktivitesi üzerine *H. perforatum*'un etanol ekstreleri daha yüksek inhibisyon etki gösterdi.

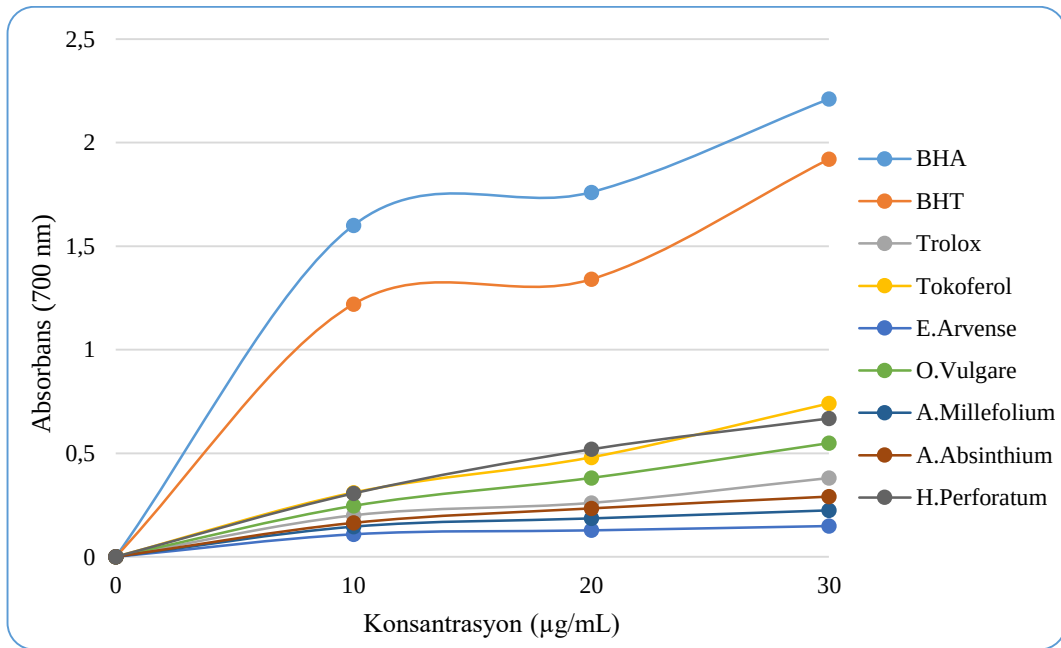
Tablo 5.6. *hCA I ve II izoenzimlerinin CO₂-Hidrat az aktivite leri üzerine inhibisyon etki gösteren H. perforatum* ekstre leri nin r^2 ve IC₅₀ değ er leri

Bitki ekstresi	İzoenzim	IC ₅₀ (µg/mL)	r^2
<i>H. perforatum</i> bitkisinin sulu ekstresi	hCA I	34,50	0,9308
	hCA II	53,07	0,9756
<i>H. perforatum</i> bitkisinin etanol ekstresi	hCA I	27,60	0,9210
	hCA II	32,85	0,9385

5.5. Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemleri

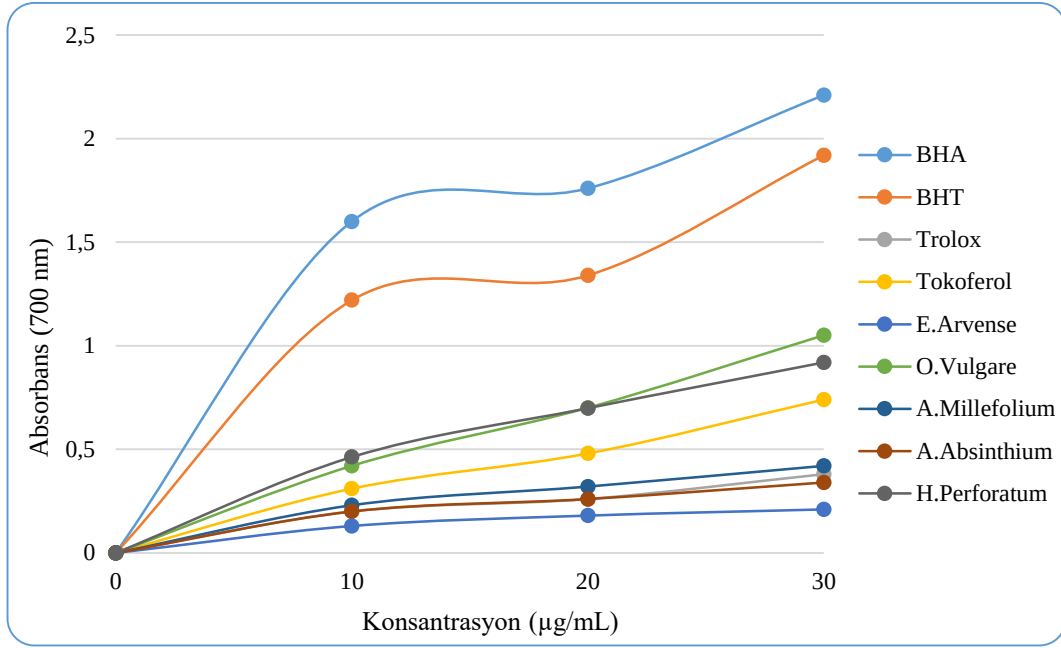
5.5.1. Demir indirgeme metodu (Fe^{3+} - Fe^{2+})

Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (10-30 $\mu\text{g/mL}$) alınarak Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasiteleri belirlendi. Bu metotta çözeltinin başta sarı olan renginin, ortamda bulunan maddelerin antioksidan kapasitesine bağlı olarak yeşil ve mavi renge döndüğü görüldü. Bitki ekstraktları ile standart antioksidanların 700 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.45 ve Şekil 5.46’da verildi.



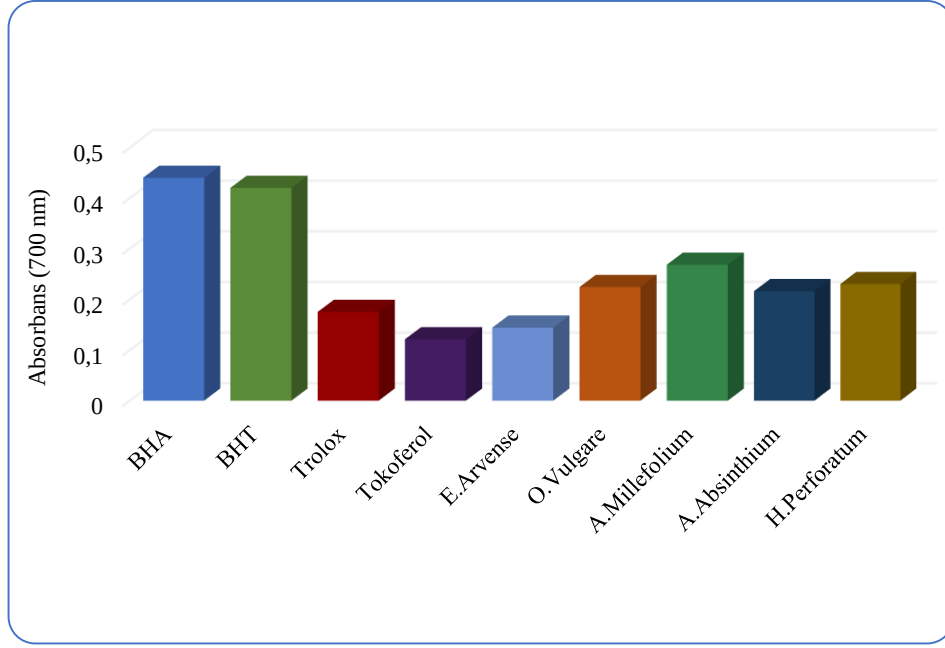
Şekil 5.45. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının Fe^{3+} - Fe^{2+} iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.45.’teki absorbans değerlerine bakıldığında Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin 10 $\mu\text{g/mL}$ için sırasıyla $\text{BHA} > \text{BHT} > \alpha\text{-Tokoferol} > \text{H. perforatum} > \text{O. vulgare} > \text{Trolox} > \text{A. absinthium} > \text{A. millefolium} > \text{E. arvense}$ olduğu görüldü.

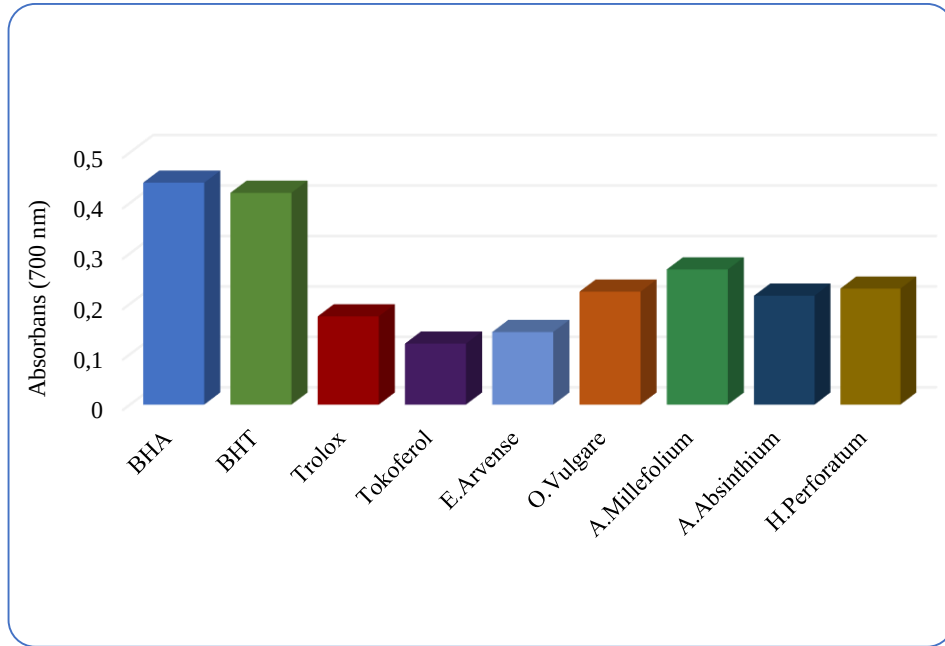


Şekil 5.46. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının Fe^{3+} - Fe^{2+} iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.46'daki absorbans değerlerine bakıldığında Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > BHT > *H. perforatum* > *O. vulgare* > α -Tokoferol > *A. millefolium* > *A. absinthium* > Trolox > *E. arvense* olduğu görüldü.



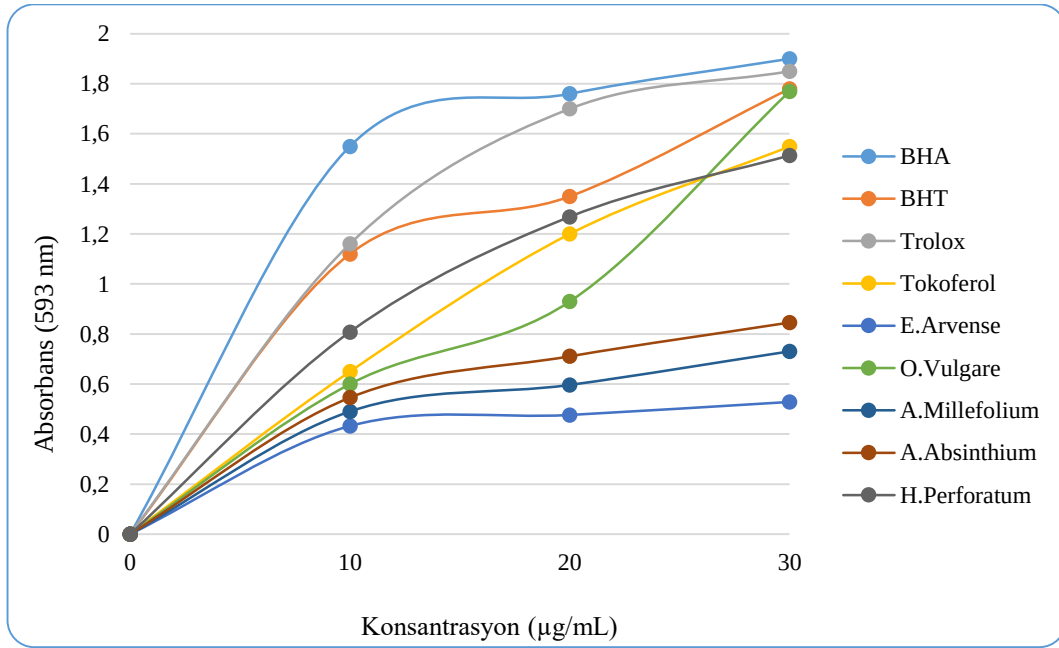
Şekil 5.47. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.48. Etanolü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Fe^{3+} indirgeme aktivitesi için 700 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

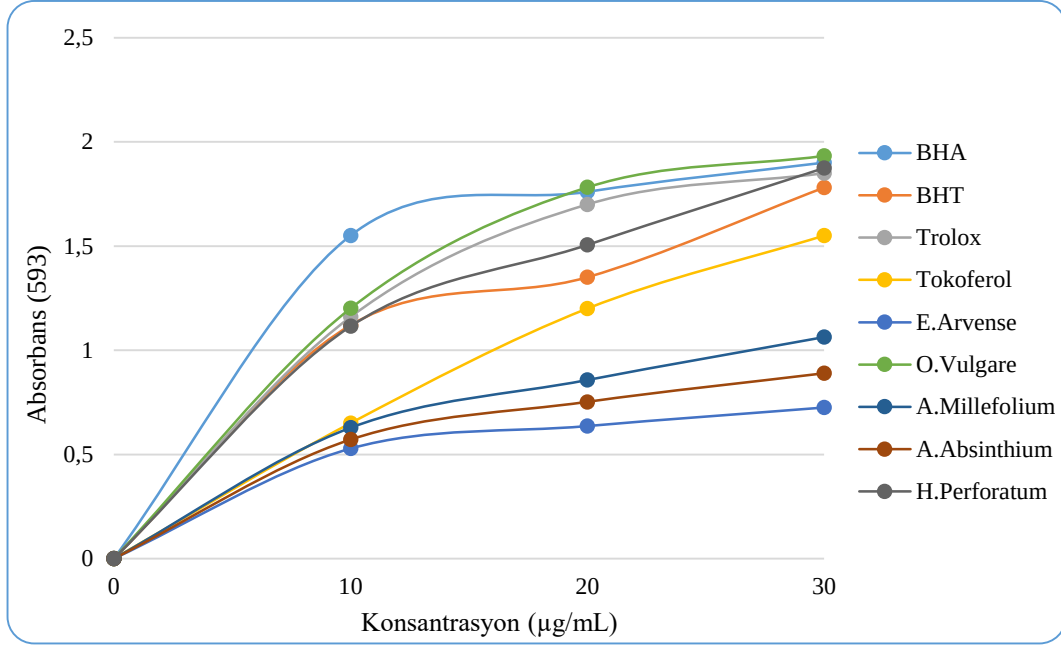
5.5.2. FRAP metodu

Bu metotta ile ortamda bulunan indirgeyici moleküller aracılığıyla Fe^{3+} iyonlarından oluşan Fe^{2+} iyonlarının TPTZ ile mavi renkli kompleks oluşturduğu gözlemlendi. Bitki ekstraktları ile standart antioksidanların farklı konsantrasyonlarının 593 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.49 ve Şekil 5.50’de verildi.



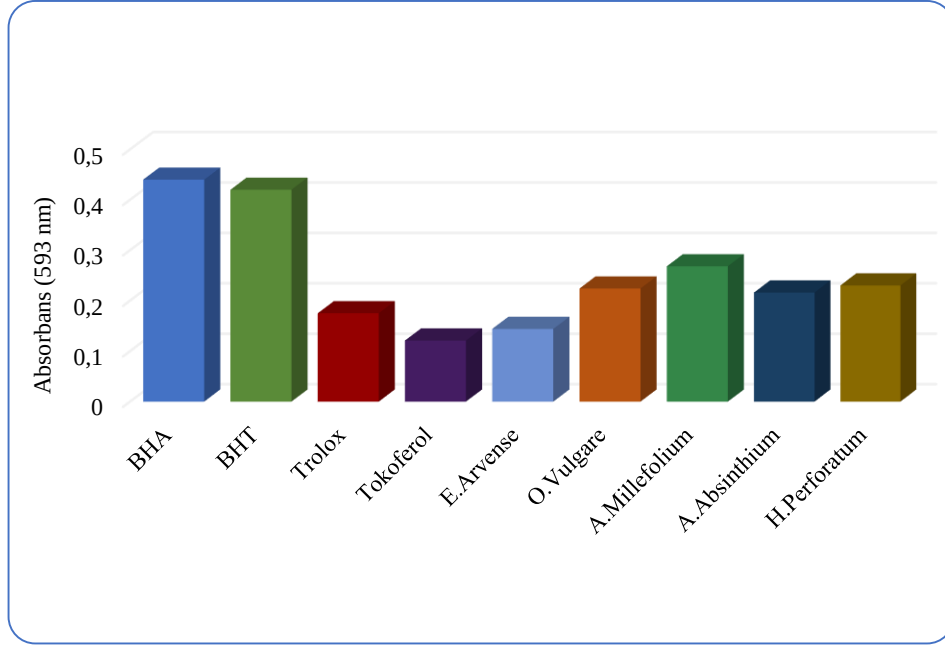
Şekil 5.49. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.49’deki absorbans değerlerine bakıldığında Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > Trolox > BHT > *H. perforatum* > α -Tokoferol > *O. vulgare* > *A. absinthium* > *A. millefolium* > *E. arvense* olduğu görüldü.

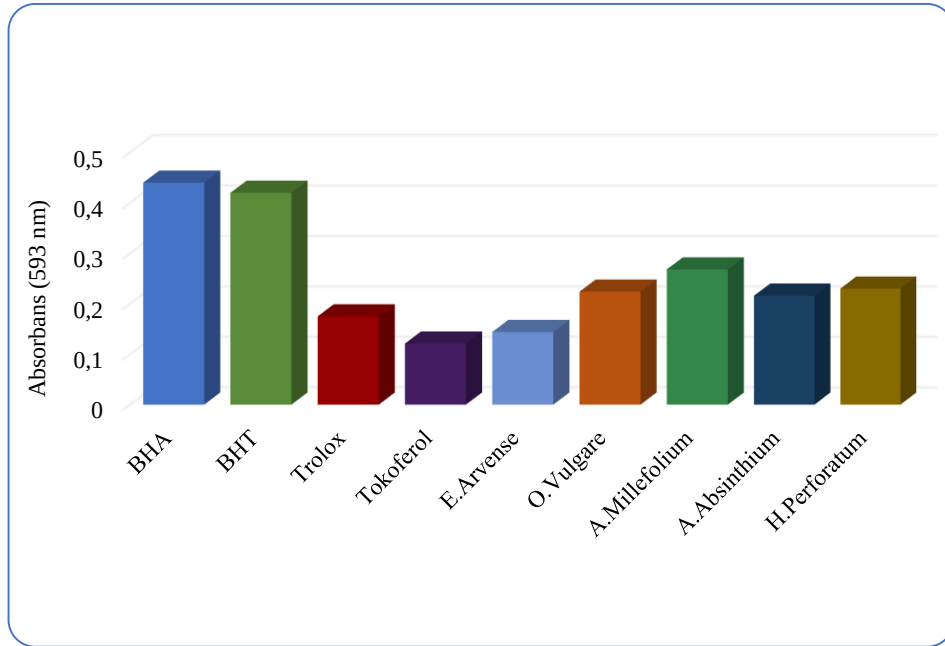


Şekil 5.50. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının FRAP reaktifi ile ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.50'deki absorbans değerlerine bakıldığında Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > O. vulgare > Trolox > BHT > H. perforatum > α -Tokoferol > A. millefolium > A. absinthium > E. arvense olduğu görüldü.



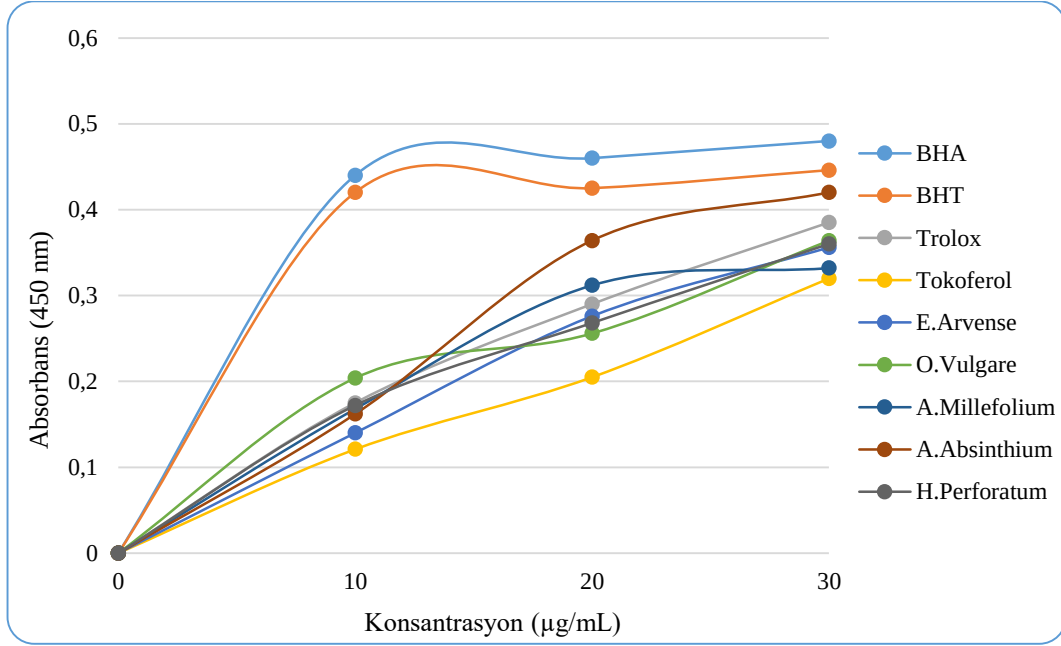
Şekil 5.51. FRAP reaktifi ile sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarının (Fe^{2+}) indirgeme aktivitesi için 593 nm 'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.52. FRAP reaktifi ile etanolü bitki ekstralarının 10 µg/mL 'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ferrik iyonlarının (Fe^{2+}) indirgeme aktivitesi için 593 nm 'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

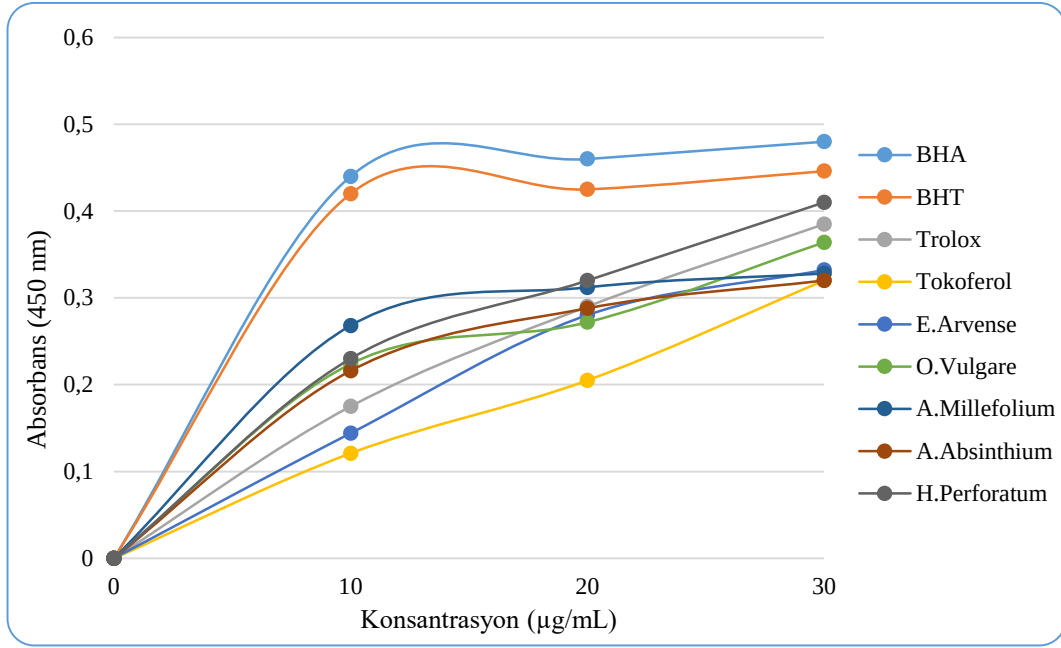
5.5.3. CUPRAC metodu

Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) alınarak Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasiteleri belirlendi. Bitki ekstraları ile standart antioksidanların 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.53 ve Şekil 5.54’te verildi.



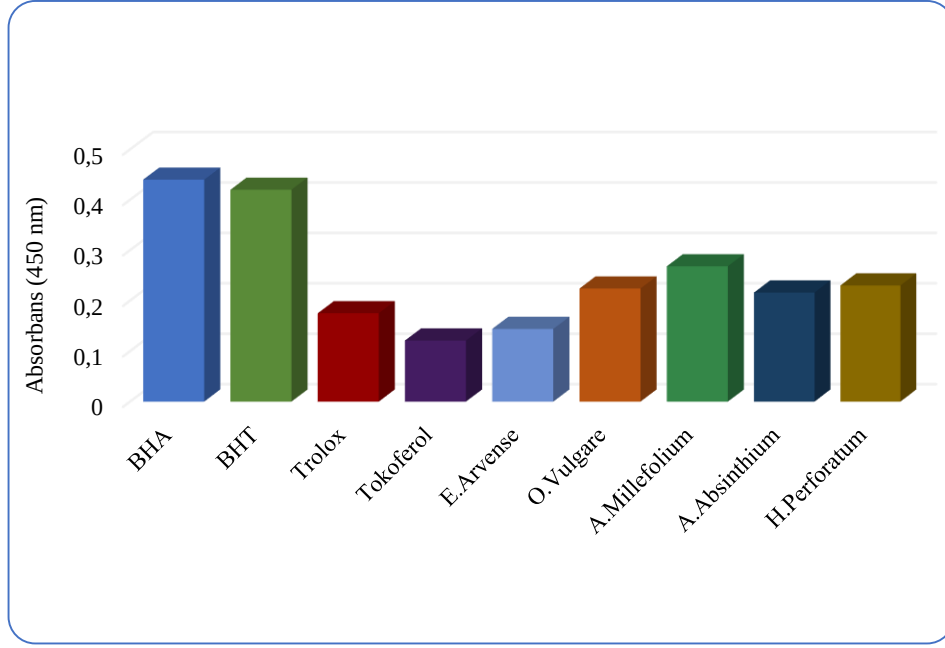
Şekil 5.53. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.53’teki absorbans değerlerine bakıldığında Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > BHT > *O. vulgare* > Trolox > *H. perforatum* > *A. millefolium* > *A. absinthium* > *E. arvense* > α -Tokoferol olduğu görüldü.

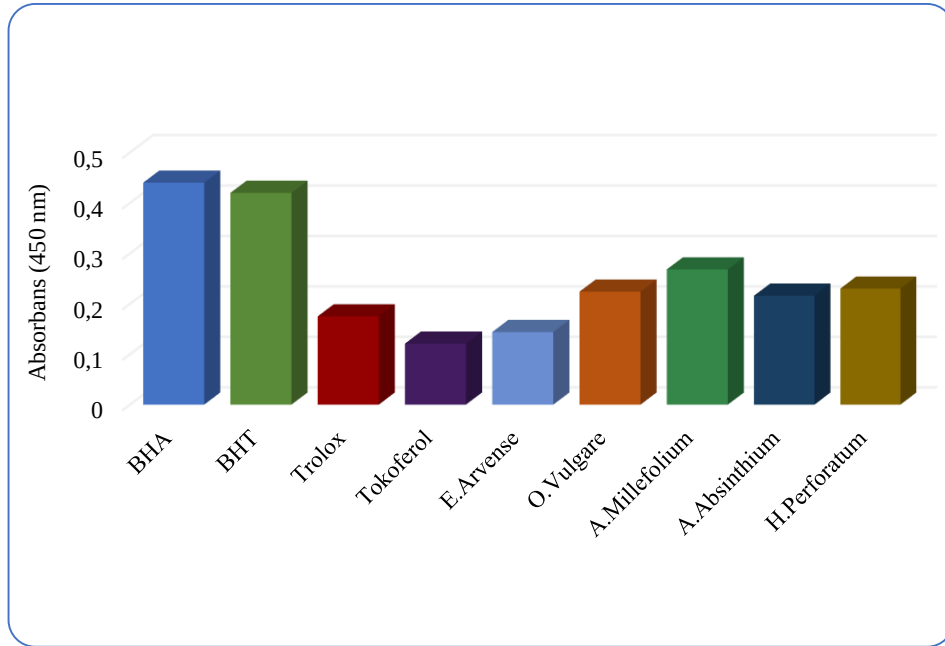


Şekil 5.54. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.54'teki absorbans değerlerine bakıldığında Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > BHT > *A. millefolium* > *H. perforatum* > *O. vulgare* > *A. absinthium* > Trolox > *E. arvense* > α -Tokoferol olduğu görüldü.



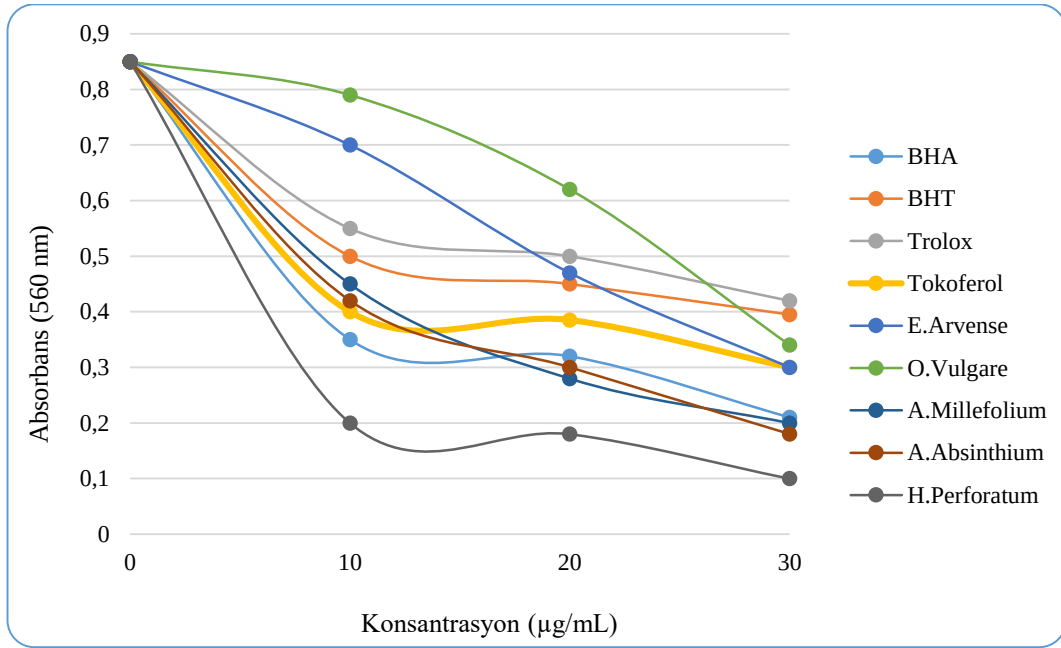
Şekil 5.55. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu^{2+} indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.56. Etanolü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen Cu^{2+} indirgeme aktivitesi için 450 nm'deki absorbans değerlerinin karşılaştırılması

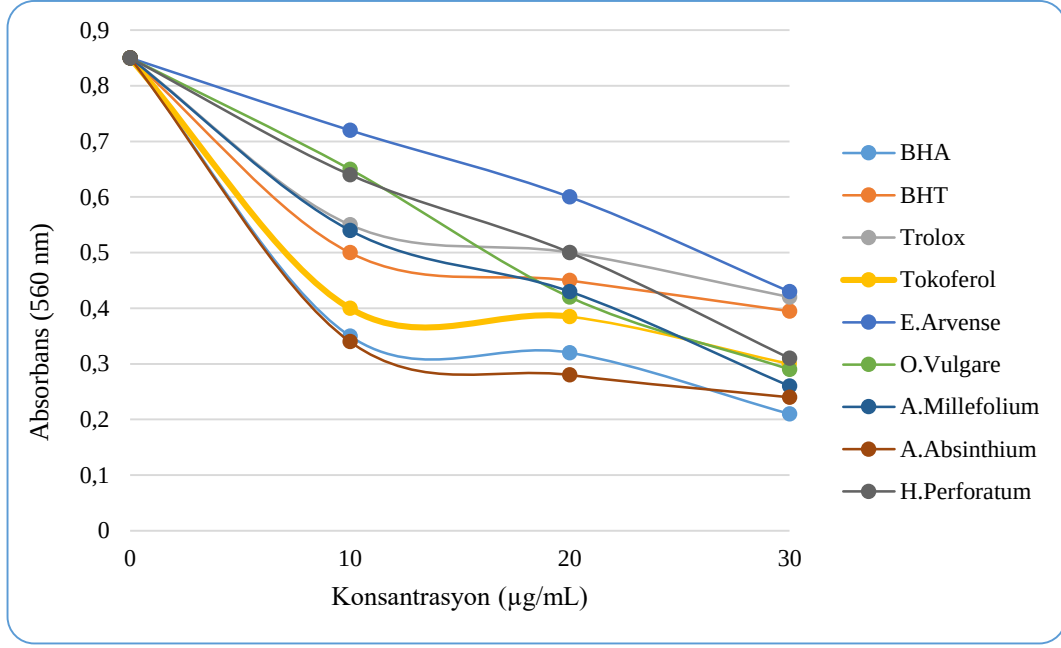
5.5.4. Süperoksit anyon radikali giderme

Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) alınarak, ortamdaki süperoksit radikallerini giderme kapasiteleri belirlendi. Bitki ekstraları ile standart antioksidanların 560 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.57 ve Şekil 5.58’de verildi.



Şekil 5.57. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.

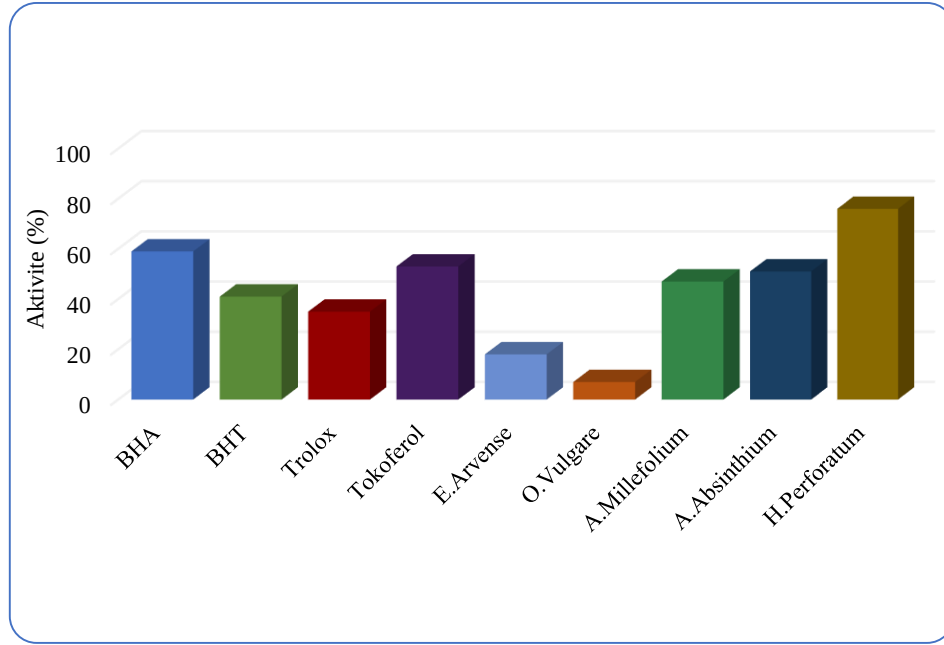
Şekil 5.57’deki absorbans değerlerine bakıldığında süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > BHA > α-Tokoferol > A. absinthium > A. millefolium > BHT > Trolox > E. arvense > O. vulgare olduğu görüldü.



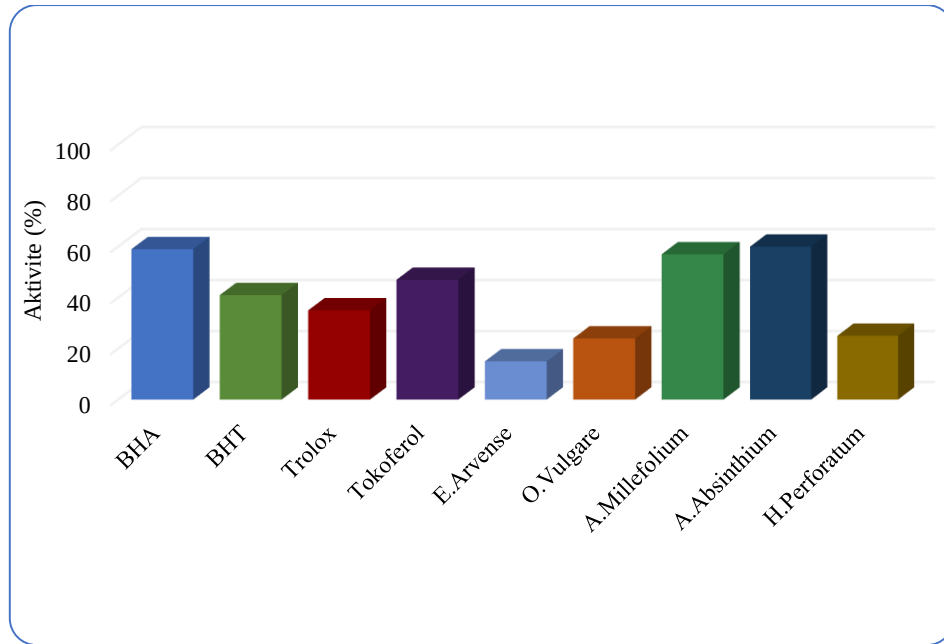
Şekil 5.58. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.58'deki absorbans değerlerine bakıldığında süperoksit anyon radikallerini giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *A. absinthium* > BHA > α -Tokoferol > BHT > *A. millefolium* > Trolox > *H. perforatum* > *O. vulgare* > *E. arvense* olduğu görüldü.

$$\text{Süperoksit giderme aktivitesi (\%)} = \left[\frac{\lambda_{560}(\text{kontrol}) - \lambda_{560}(\text{numune})}{\lambda_{560}(\text{kontrol})} \right] \times 100$$



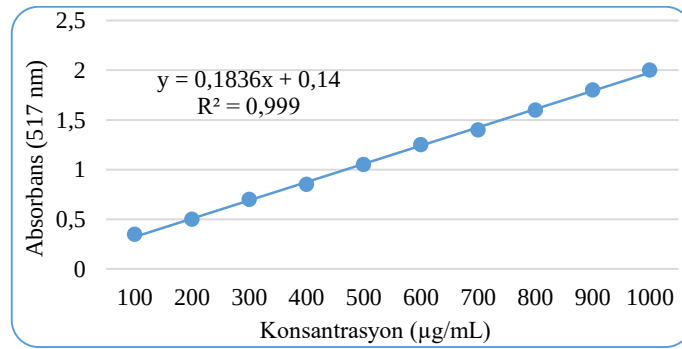
Şekil 5.59. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



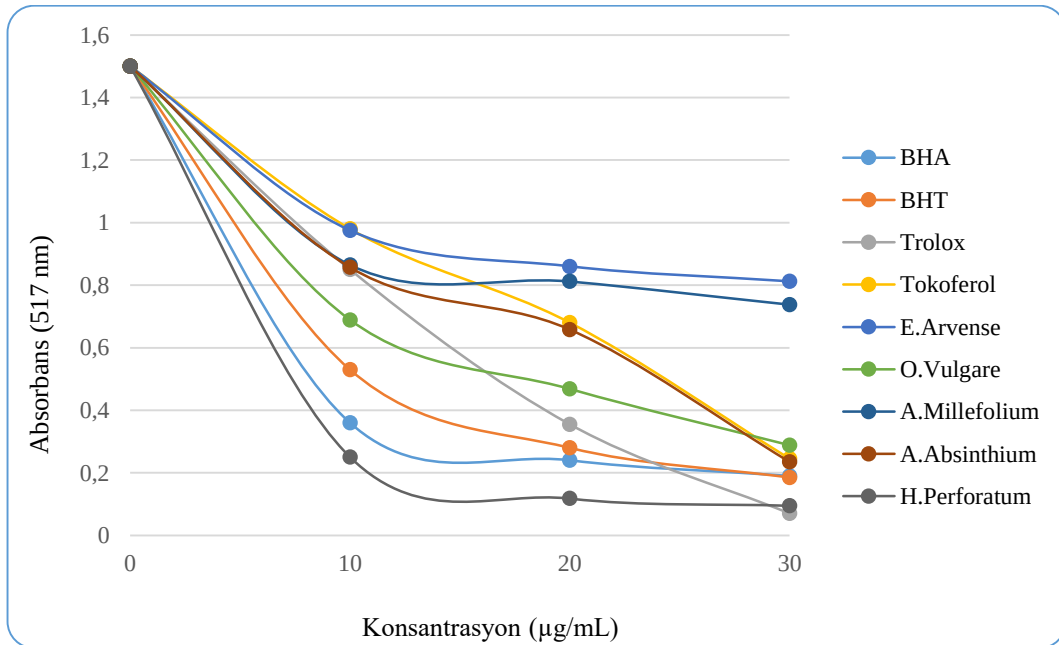
Şekil 5.60. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.5. DPPH metodu

DPPH radikali giderme kapasitesi tayininden önce DPPH için standart grafik Şekil 5.61 oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız su ve etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) alınarak yapılan DPPH radikali giderme tayininden sonra ortamda kalan serbest radikal miktarı ölçüldü. Bitki ekstratları ile standart antioksidanların 517 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.62 ve Şekil 5.63’te verildi.

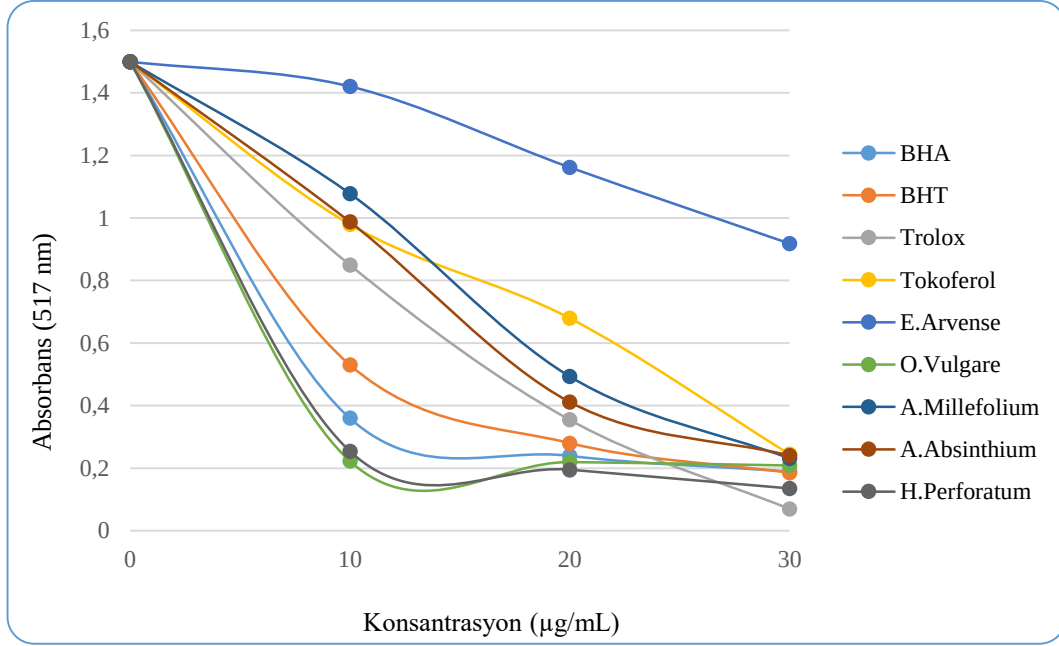


Şekil 5.61. DPPH serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DPPH grafiği



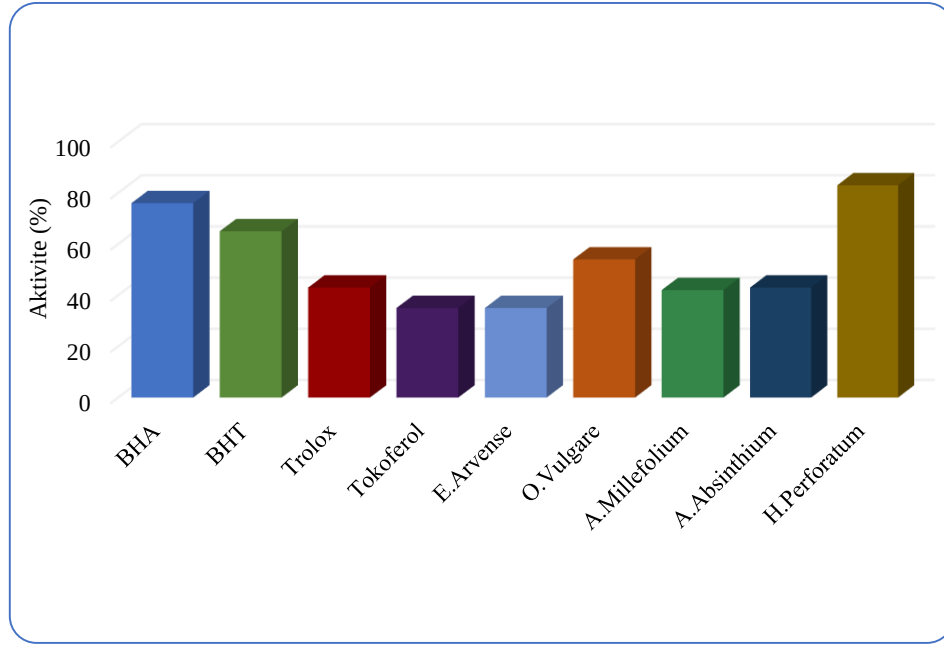
Şekil 5.62. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstratlarının DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.62'deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. DPPH radikali giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > BHA > BHT > *O. vulgare* > Trolox > *A. absinthium* > *A. millefolium* > *E. arvense* > α-Tokoferol olduğu görüldü.

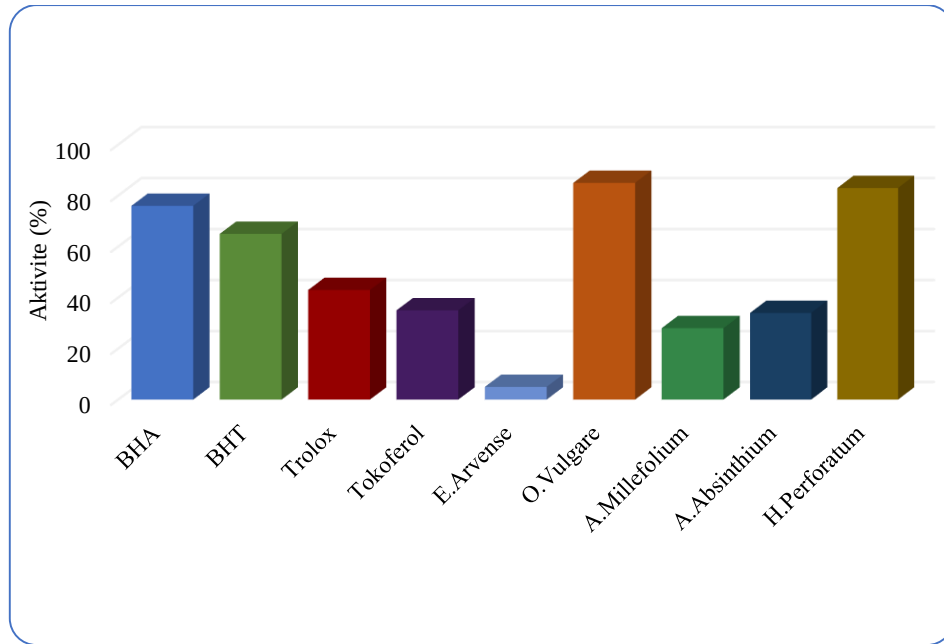


Şekil 5.63. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının DPPH radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması.

Şekil 5.63'teki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. DPPH radikali giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *O. vulgare* > *H. perforatum* > BHA > BHT > Trolox > α-Tokoferol > *A. absinthium* > *A. millefolium* > *E. arvense* olduğu görüldü.



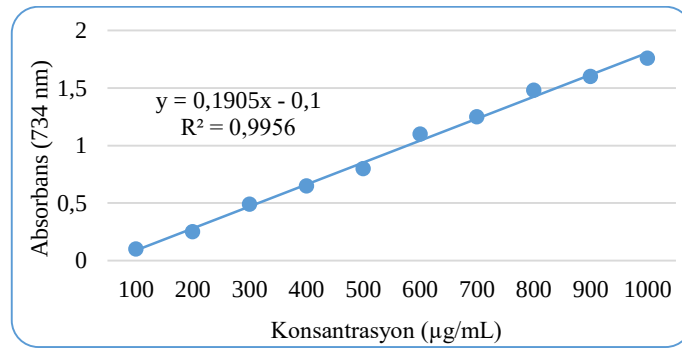
Şekil 5.64. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



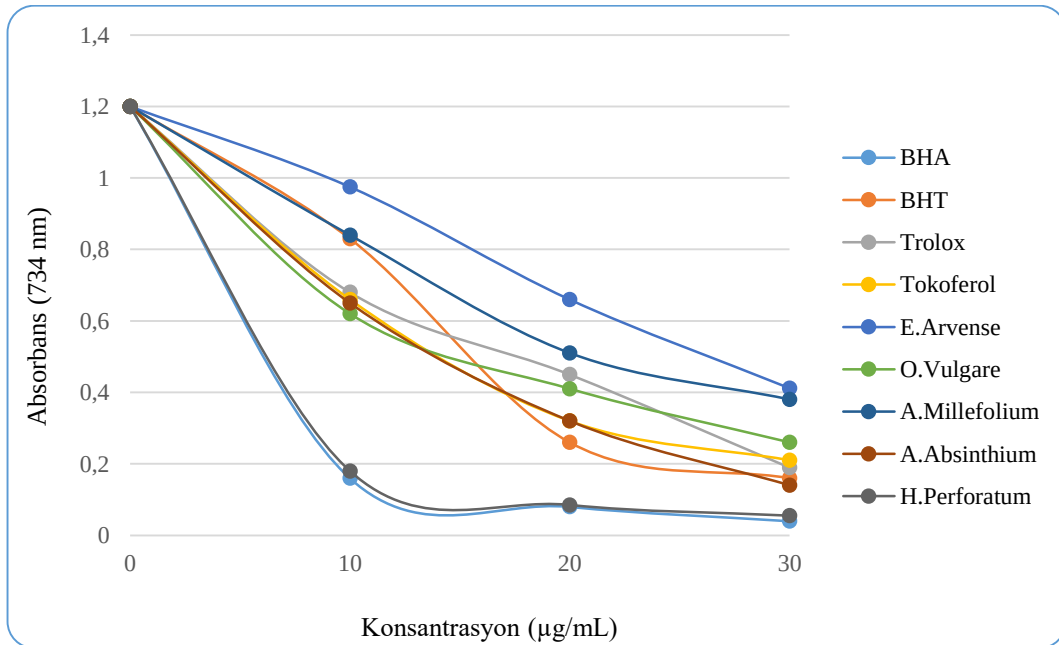
Şekil 5.65. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DPPH radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.6. ABTS metodu

ABTS^{•+} radikali giderme kapasitesi tayininden önce ABTS^{•+} için standart grafik Şekil 5.66 oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) alınarak yapılan ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi tayininden sonra ortamda kalan ABTS^{•+} radikal miktarı ölçüldü. Bitki ekstraktları ile standart antioksidanların 734 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.67 ve Şekil 5.68’de verildi.

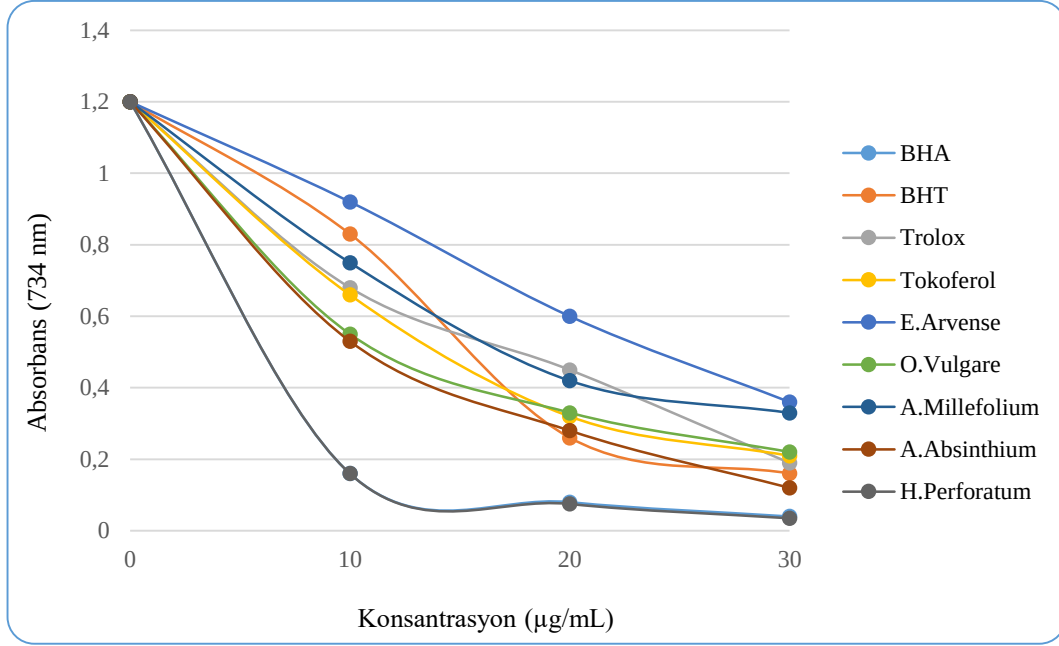


Şekil 5.66. ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart ABTS^{•+} grafiği



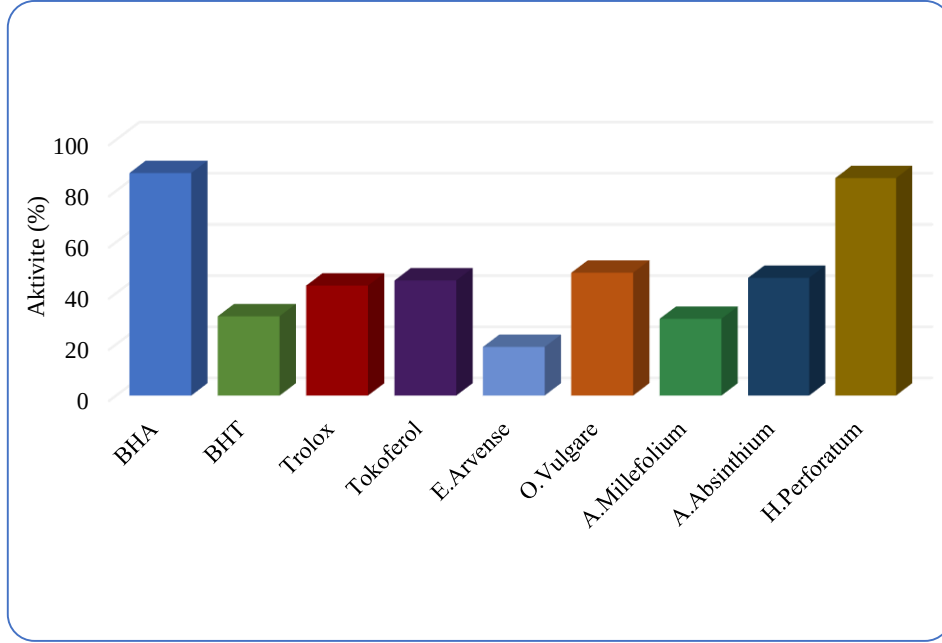
Şekil 5.67. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.67'deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. ABTS^{•+} serbest radikali giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla BHA > *H. perforatum* > *O. vulgare* > *A. absinthium* > α-Tokoferol > Trolox > BHT > *A. millefolium* > *E. arvense* olduğu görüldü.

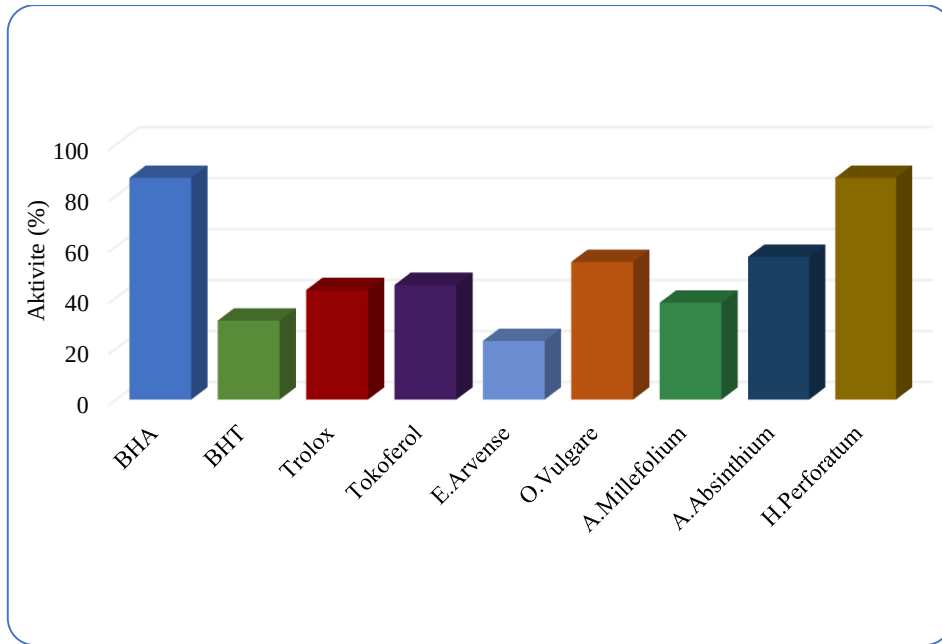


Şekil 5.68. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının ABTS^{•+} radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.68'deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. ABTS^{•+} serbest radikali giderme kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > BHA > *A. absinthium* > *O. vulgare* > α-Tokoferol > Trolox > *A. millefolium* > BHT > *E. arvense* olduğu görüldü.



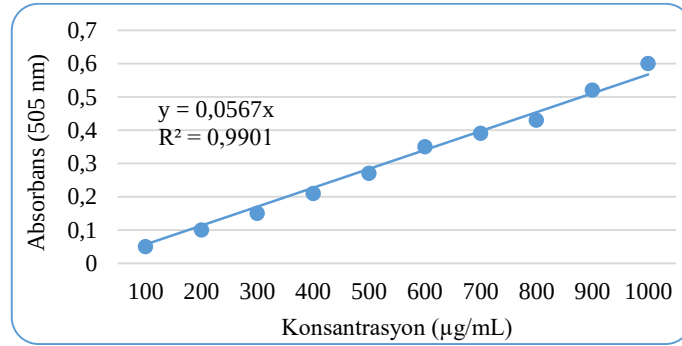
Şekil 5.69. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



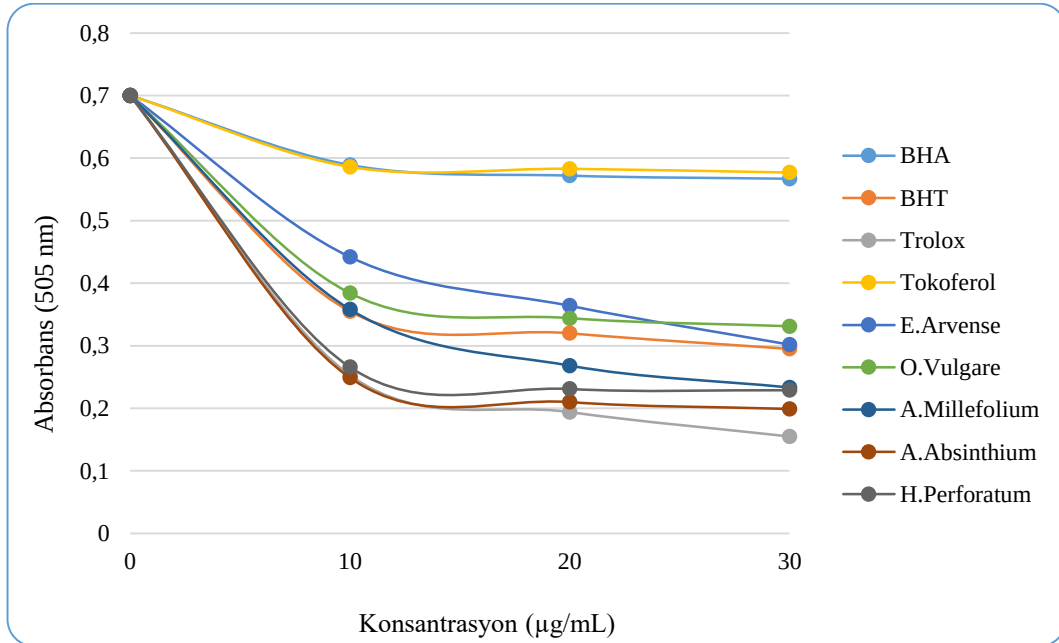
Şekil 5.70. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen ABTS radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.7. DMPD•⁺ radikali giderme aktivitesi tayini

DMPD•⁺ serbest radikali giderme aktivitesi tayininden önce DMPD•⁺ serbest radikali için standart grafik (Şekil 5.71) oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) alınarak DMPD•⁺ radikali giderme aktivitesi ölçüldü. Bitki ekstraları ile standart antioksidanların 505 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.72 ve Şekil 5.73’te verildi.

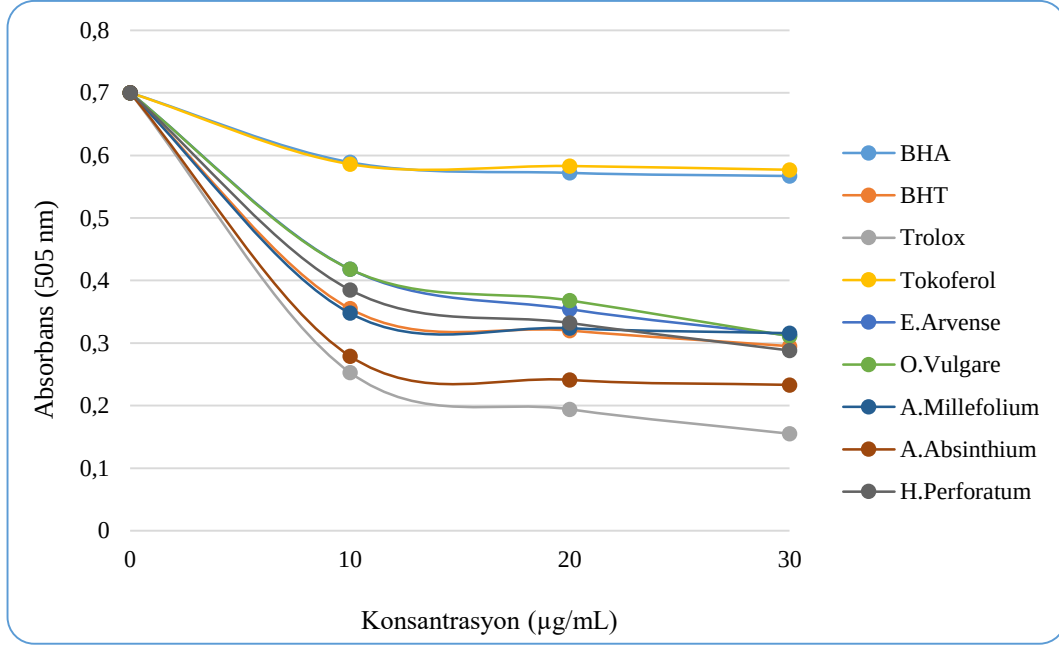


Şekil 5.71. DMPD•⁺ serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanan standart DMPD grafiği



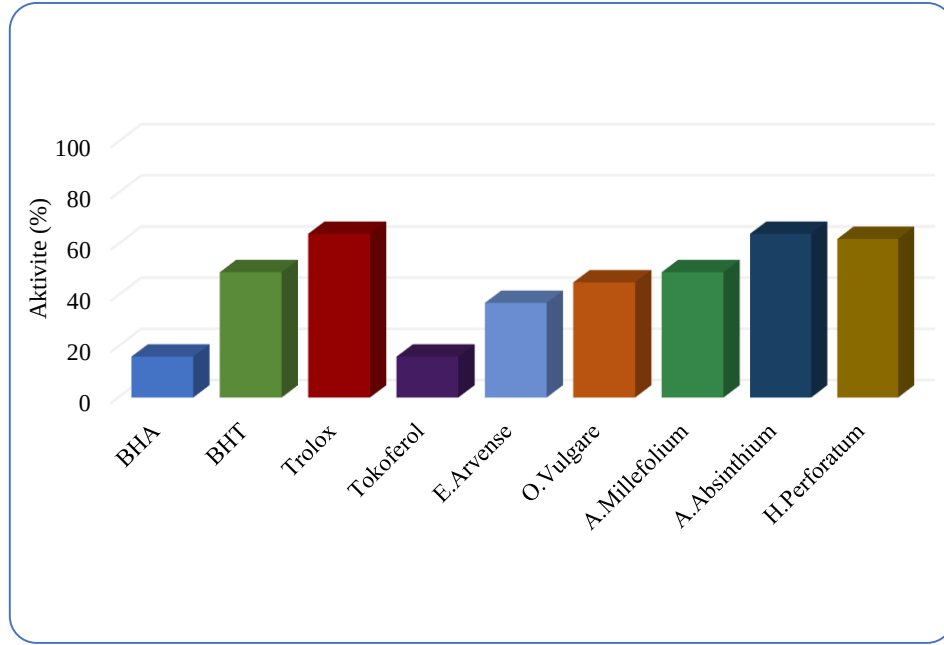
Şekil 5.72. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının DMPD•⁺ serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.72'deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan $\text{DMPD}^{\bullet+}$ serbest radikali miktarı azaldı. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ radikali giderme kapasitesinin 10 $\mu\text{g/mL}$ için sırasıyla *A. absinthium* > Trolox > *H. perforatum* > BHT > *A. millefolium* > *O. vulgare* > *E. arvense* > α -Tokoferol > BHA olduğu görüldü.

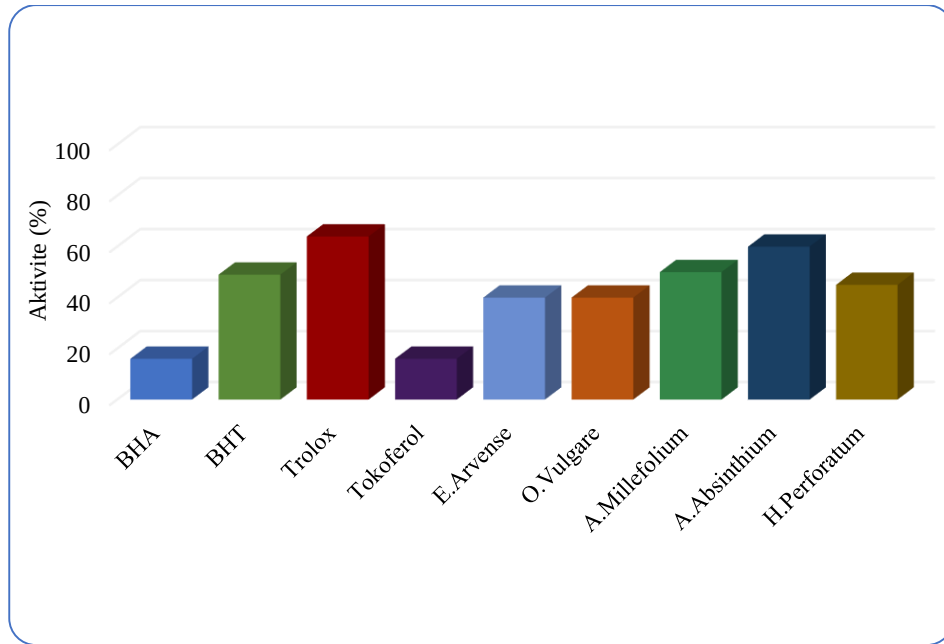


Şekil 5.73. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g/mL}$) etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının $\text{DMPD}^{\bullet+}$ serbest radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.73'teki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan $\text{DMPD}^{\bullet+}$ serbest radikali miktarı azaldı. $\text{DMPD}^{\bullet+}$ radikali giderme kapasitesinin 10 $\mu\text{g/mL}$ için sırasıyla Trolox > *A. absinthium* > *A. millefolium* > BHT > *H. perforatum* > *O. vulgare* > *E. arvense* > α -Tokoferol > BHA olduğu görüldü.



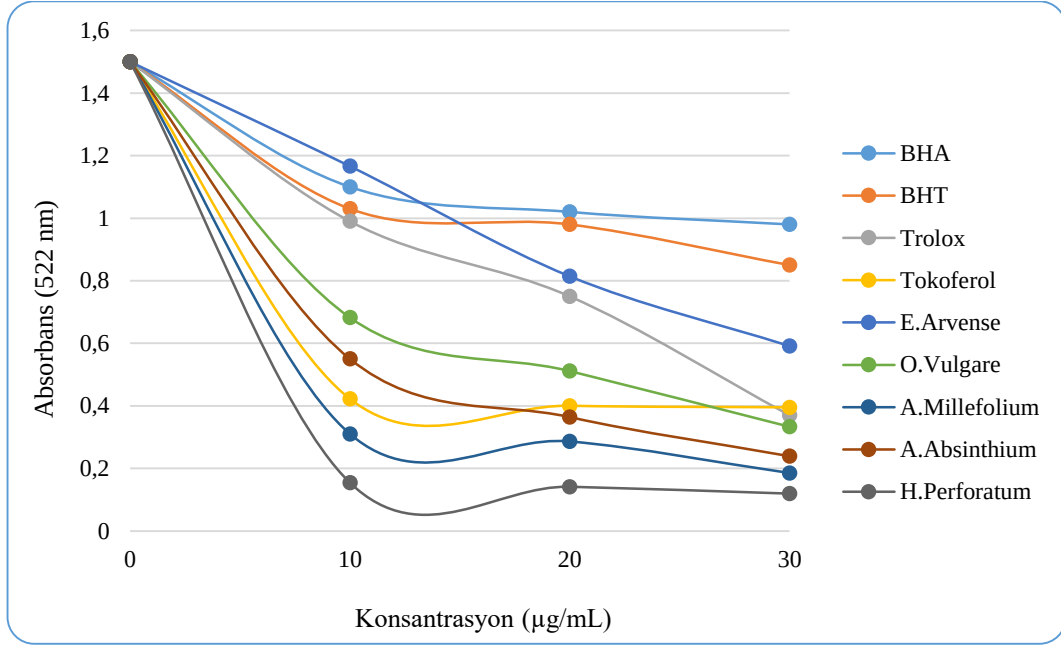
Şekil 5.74. Sulu bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.75. Etanollü bitki ekstralarının 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen DMPD radikali giderme aktivite (%) değerlerinin karşılaştırılması

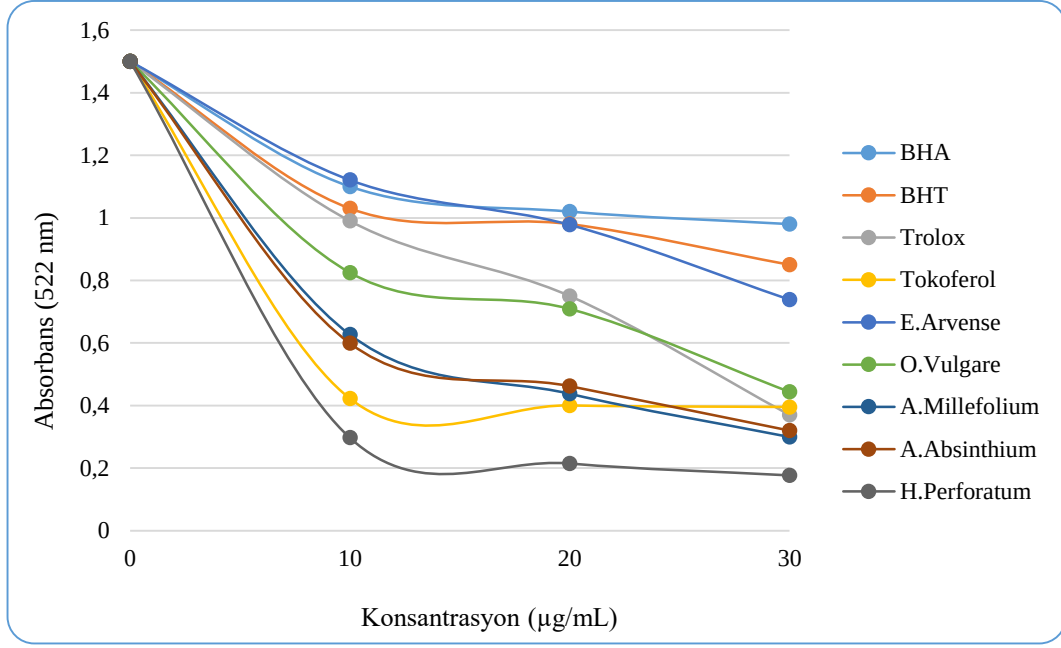
5.5.8. Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini

Bipiridil reaktifi kullanılarak, su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstralarının farklı konsantrasyonları (10-30 µg/mL) için bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini yapıldı. Bitki ekstraları ile standart antioksidanların 522 nm’de ölçülen absorbans değerleri kıyaslandı ve Absorbans-Konsantrasyon grafiği Şekil 5.76 ve Şekil 5.77’de verildi.



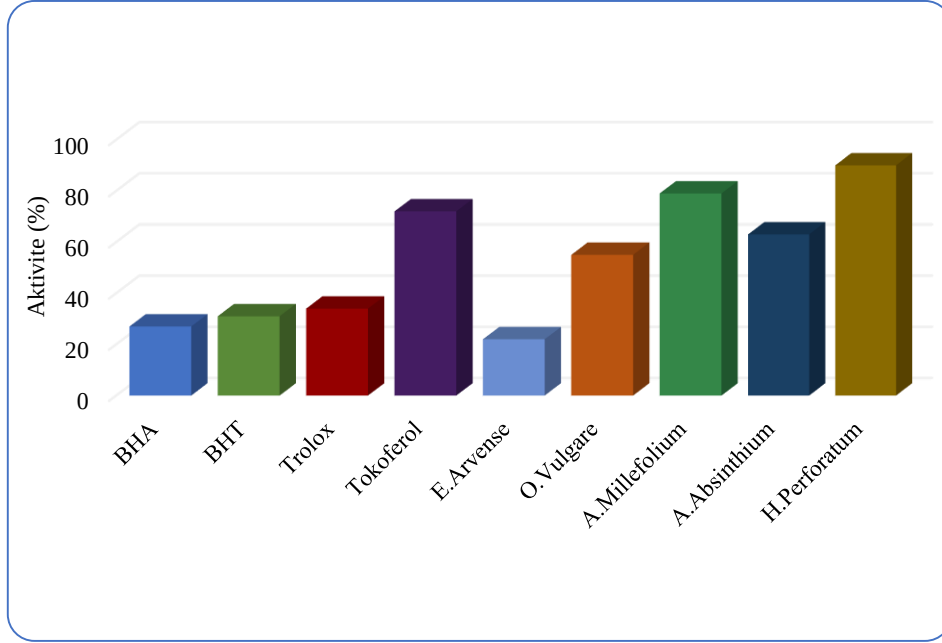
Şekil 5.76. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) su ile hazırlanan bitki ekstralarının metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.76’deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. Bipiridil metal şelatlama kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > *A. millefolium* > α-Tokoferol > *A. absinthium* > *O. vulgare* > Trolox > BHT > BHA > *E. arvense* olduğu görüldü.

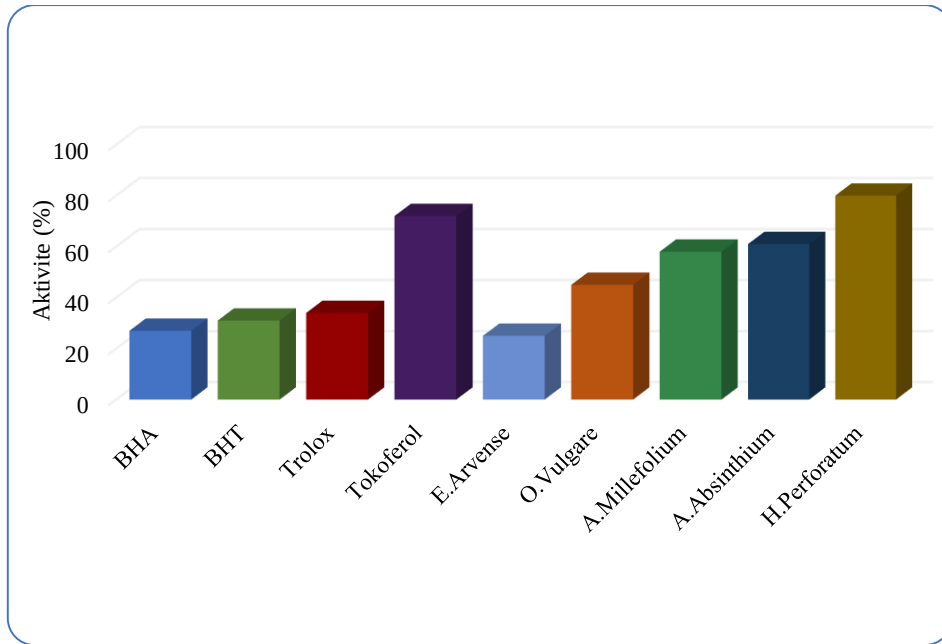


Şekil 5.77. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/mL) etanol ile hazırlanan bitki ekstratlarının metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Şekil 5.77’deki absorbans değerlerine bakıldığında madde konsantrasyonu arttıkça ortamda kalan serbest radikal miktarı azaldı. Bipiridil metal şelatlama kapasitesinin 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > α-Tokoferol > *A. absinthium* > *A. millefolium* > *O. vulgare* > Trolox > BHT > BHA > *E. arvense* olduğu görüldü.



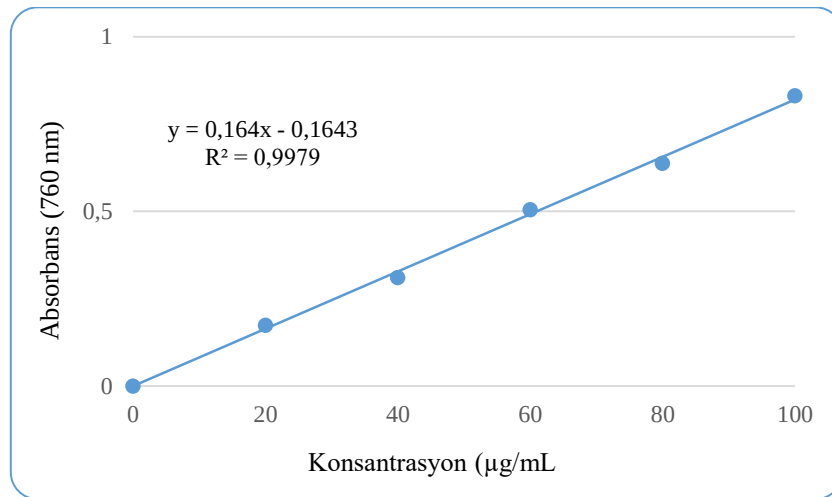
Şekil 5.78. Sulu bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 5.79. Etanollü bitki ekstrlerinin 10 µg/mL'lik konsantrasyonlarına karşılık gelen bipiridil metal şelatlama aktiviteleri (%) değerlerinin karşılaştırılması

5.5.9. Total fenol miktarı tayini

Total fenol miktarı tayininden önce gallik asit için standart grafik (Şekil 5.80) oluşturuldu. Çalışmada kullandığımız su ve alkol ile hazırlanan bitki ekstralarının fenol miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Ekstrelerin toplam fenol miktarları gallik asidin kalibrasyon eğrisi ve eğri denkleminden yararlanılarak hesaplandı.



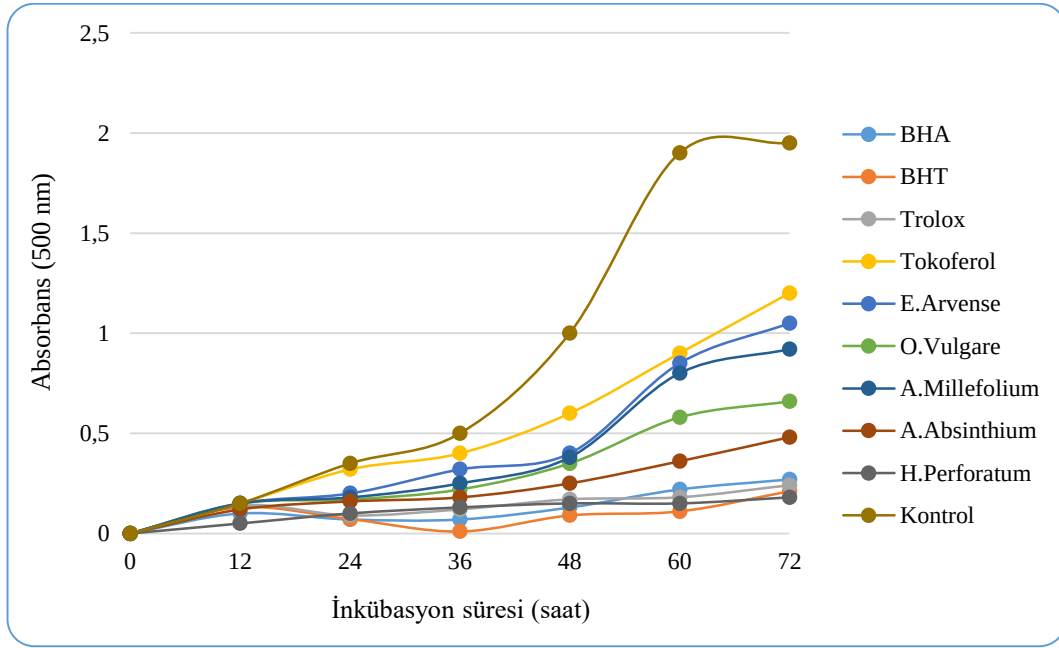
Şekil 5.80. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

Tablo 5.7. Bitki ekstralarının gallik asit'e toplam fenol miktarları

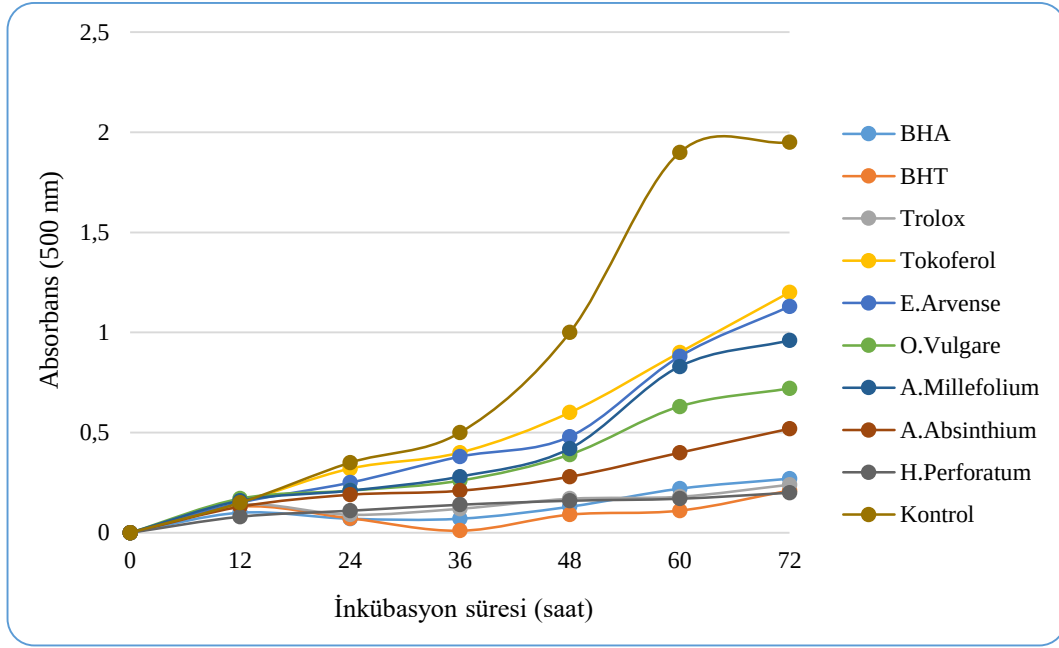
Bitki	GAE	
	(mg/g Gallik asit'e eşdeğer fenol miktarı)	
	Sulu ekstre	Etanollü ekstre
<i>E. arvense</i>	7,15	11,34
<i>O. vulgare</i>	16,42	17,20
<i>A. millefolium</i>	11,53	16,89
<i>A. absinthium</i>	13,45	15,67
<i>H. perforatum</i>	17,02	18,03

5.5.10. Total antioksidan aktivite tayini

Bitki ekstralarının total antioksidan kapasite tayinleri için tiyosiyanat metodu kullanıldı. Bu yöntem için önceden hazırladığımız linoleik asit emülsiyonunun otoksidasyonu sonucu oluşan peroksitler, ferröz iyonlarını (Fe^{3+}) ferrik iyonlarına (Fe^{2+}) indirgemektedir. Böylece oluşan ferrik iyonları (Fe^{3+}) tiyosiyanat ile (SCN^-) ile $Fe(SCN)^{2+}$ kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleksin spesifik olarak 500 nm dalga boyunda absorbans vermesiyle ölçüm gerçekleştirildi.



Şekil 5.81. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen sulu ekstraların geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması



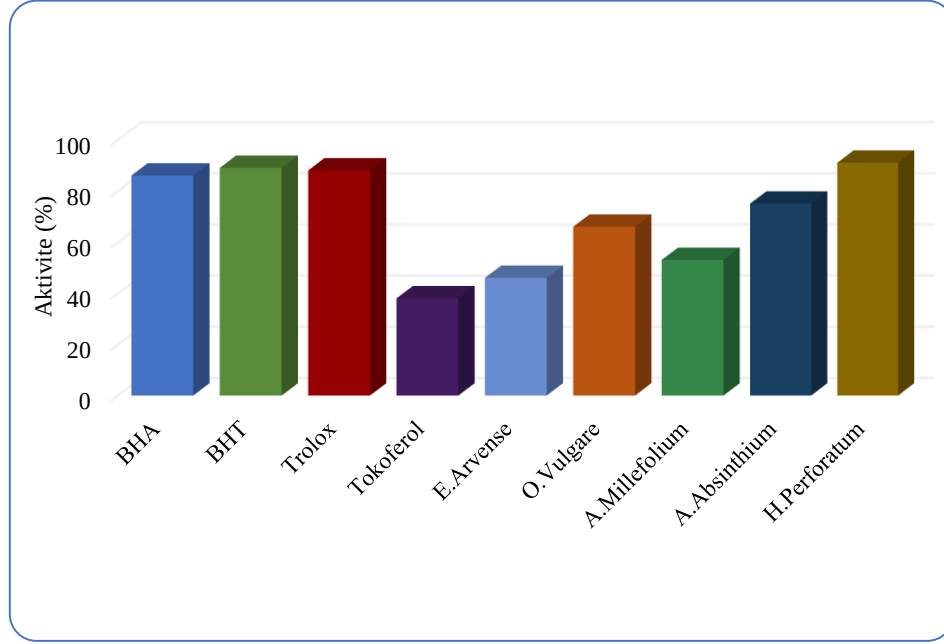
Şekil 5.82. 10 µg/mL konsantrasyonda ilave edilen etanolü ekstrelerin geçen süreye bağlı olarak total antioksidan kapasite kuvvetlerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks ve α-Tokoferol ile karşılaştırılması

Absorbansın fazla olması peroksit radikallerinin fazla olduğunu ve antioksidan olarak kullandığımız maddenin antioksidan kapasitesinin düşük olduğunu ifade eder. Bu tayin için pozitif kontrol olarak kullandığımız antioksidanlar ile birlikte çalıştığımız ekstrelerin 10 µg/mL konsantrasyondaki çözelti çözeltilerinin 500 nm dalga boyunda ölçülmesiyle belirlendi.

Standart olarak kullandığımız BHA, BHT, α-Tokoferol, Troloks ve çalışmada kullandığımız ekstrelerin linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesi yüzde (%) olarak aşağıda verilen denklemden faydalanılarak yapıldı.

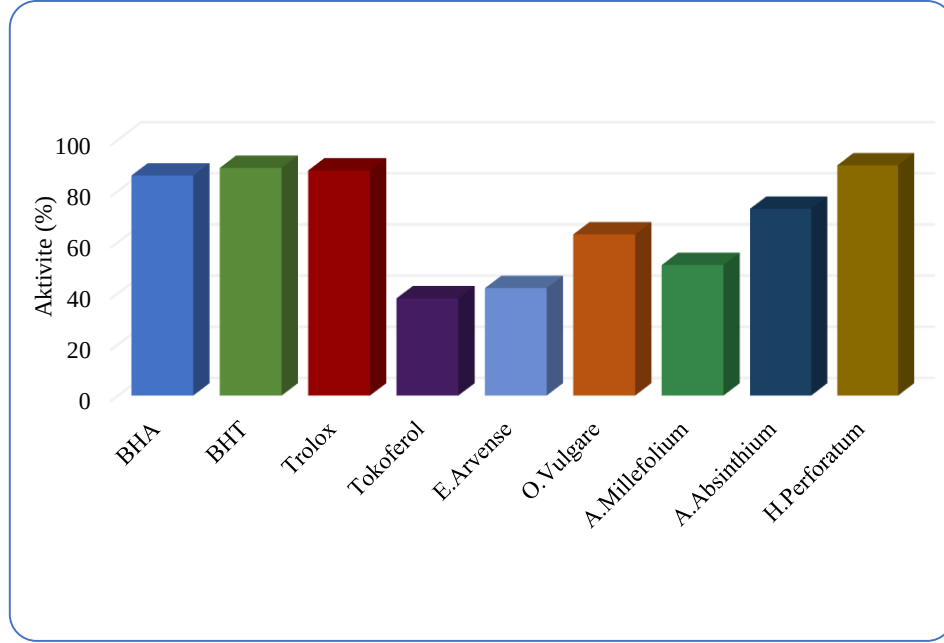
$$\text{Lipid peroksidasyonun inhibisyon yüzdesi (\%)} = \left[1 - \frac{(\lambda_{N500})}{(\lambda_{K500})} \right]$$

Denklemden faydalanılarak yapılan hesaplama işlemlerinde pozitif kontrol olarak kullandığımız BHA, BHT, α -Tokoferol ve Trolox ile çalıştığımız sulu ve etanollü bitki ekstralarının 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları için linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu yüzde (%) olarak inhibe etme değerleri şekil 5.83 ve şekil 5.84'te gösterilmiştir.



Şekil 5.83. 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda kullanılan sulu ekstraların 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması

Kullandığımız standartlar ve bitkilerin sulu ekstralarının total antioksidan kapasite tayini yöntemi ile lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerinin karşılaştırılmasında 10 $\mu\text{g/mL}$ için sırasıyla *H. perforatum* > BHT > Trolox > BHA > *A. absinthium* > *O. vulgare* > *A. millefolium* > *E. arvense* > Tokoferol olduğu görüldü.



Şekil 5.84. 10 µg/mL konsantrasyonda kullanılan etanollü ekstrelerin 72. saatteki lipid peroksidasyon inhibisyonu yüzdelerinin karşılaştırılması

Kullandığımız standartlar ve bitkilerin etanollü ekstrelerinin total antioksidan kapasite tayini yöntemi ile lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerinin karşılaştırılmasında 10 µg/mL için sırasıyla *H. perforatum* > BHT > Trolox > BHA > *A. absinthium* > *O. vulgare* > *A. millefolium* > *E. arvense* > Tokoferol olduğu görüldü.

5.6. MTT Sitotoksosite Testi

Yapılan MTT sitotoksosite testine göre *Equisetum arvense*, *Origanum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium*, *Hypericum perforatum*'un sulu ekstreleri ve *Origanum vulgare*'nin etanol ekstrelerinin IC₅₀ değerleri 500 µg/mL'nin üzerinde çıktı, etanol ekstrelerine göre çok daha düşük miktarda toksik etki gösterdi.

Diğer taraftan *Equisetum arvense*, *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* ve *Hypericum perforatum*'un etanol ekstrelerinin IC₅₀ değerleri 3,9 µg/mL'den düşük çıkarak sulu ekstrelerden daha toksik olduğu görüldü.

Tablo 5.8. MTT testi sonuçları

Bitkiler	Sulu ekstrelerin IC ₅₀ değeri (µg/mL)	Etanol ekstrelerinin IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
<i>Equisetum arvense</i>	> 500	< 3,9
<i>Origanum vulgare</i>	> 500	> 500
<i>Achillea millefolium</i>	> 500	< 3,9
<i>Artemisia absinthium</i>	> 500	< 3,9
<i>Hypericum perforatum</i>	> 500	< 3,9

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

İnsan eritrositlerinden CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografi yöntemi ile hCA I ve hCA II izoenzimleri saflaştırıldı. Şekil 5.26'da gösterilen elüsyon grafiğinden faydalanılarak enzim aktivitesi en yüksek olan tüpler belirlendi. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere belirlenen tüpler birleştirilerek toplamda hCA I için 7 mL ve hCA II için 3 mL izoenzim diyaliz edildi. Diyaliz sonucu ortamdan tuzlar uzaklaştırılmış olur. Tablo 5.1'de görüldüğü üzere diyaliz öncesi ve sonrası için saflaştırma verileri hesaplandı. hCA I için diyaliz öncesi verim %52,50 iken diyaliz sonrası %59,98'e, hCA II için diyaliz öncesi verim %52,30 iken diyaliz sonrası %64,86'ya yükseldiği görüldü. Diyaliz sonrası hesaplanan en yüksek spesifik aktivite hCA I için 5220 iken hCA II için 14162'dir.

Elde ettiğimiz protein miktarlarını ölçmek için kantitatif protein tayini yapıldı. Bunun sonucunda seçtiğimiz tüplerde protein miktarı hCA I için 0,86 mg/mL, hCA II için ise 0,80 mg/mL olarak ölçüldü. Saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı.

Saflaştırdığımız hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon çalışmaları yapıldı. Bunun için önceden su ve etanol ile hazırlanan bitki ekstraktları inhibitör olarak kullanıldı. 10-100 µg/mL arasındaki 10 farklı konsantrasyon denendi ve IC₅₀ değerleri belirlendi.

Sonuçlara bakıldığında hCA I için en yüksek inhibisyonu *Achillea millefolium* bitkisinin etanol ekstresi, hCA II için en yüksek inhibisyonu *Hypericum perforatum* bitkisinin etanol ekstresi gösterdi. En düşük inhibisyonu hCA I için *Equisetum arvense* bitkisinin sulu ekstresi, hCA II için ise *Equisetum arvense* ve *Achillea millefolium* bitkilerinin etanol ekstraktları gösterdi.

LC-MS/MS yöntemi ile bitki ekstraktlarının içeriğinde tespit edilen başlıca etken maddelerin hCA I ve II enzimlerinin aktif bölgesinde moleküler docking çalışmaları yapıldı.

hCA I için elde edilen sonuçlara göre *Equisetum arvense* bitkisinde tespit edilen ekonazol, bergapten ve 9-metil ürik asit aktif bölgeye kuvvetli affinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko metali (Zn261) ile tuz köprüsü ve metal bağları oluşturmuştur. Ayrıca, bileşikler histidin (His67, 94 ve 200) aminoasidi ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları kurmuştur (Şekil 5.16). Aynı bileşiklerin hCA II için yapılan moleküler docking çalışmaları ise bileşiklerin aktif bölge ile etkileşiminde çinko

metalinin (Zn301) yanı sıra arginin (Arg58), glutamik asit (Glu69) ve glutamin (Gln92) aminoasitlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Bileşikler Zn301 ile metal bağı kurarken; belirtilen aminoasitler ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 5.18).

hCA I için elde edilen sonuçlara göre *Origanum vulgare* bitkisinde tespit edilen metisilin, loperamid ve sitrik asit aktif bölgeye kuvvetli affinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko metal (Zn261) ile tuz köprüsü oluşturmuştur. Ayrıca, bileşikler histidin (His67 ve 200), asparagin (Asn69) ve glutamin (Gln92) aminoasitleri ile hidrojen bağları kurmuştur (Şekil 5.20). Aynı bileşiklerin hCA II için yapılan moleküler docking çalışmaları ise bileşiklerin aktif bölge ile etkileşiminde çinko metalinin (Zn301) yanı sıra glutamin (Gln92), histidine (His64) ve triptofan (Trp5) aminoasitlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Bileşikler Zn301 ile tuz köprüsü kurarken; belirtilen aminoasitler ile hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 5.22).

hCA I için elde edilen sonuçlara göre *Achillea millefolium* bitkisinde tespit edilen klorojenik asit, 3-5-dikafeoil kuinik asit, luteolin ve rutin aktif bölgeye kuvvetli affinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko metal (Zn261) ile metal bağı oluşturmuştur. Ayrıca, bileşikler histidin (His64, 67, 94 ve 200), glutamin (Gln92), valin (Val62), treonin (Thr199), fenilalanin (Phe91), aspartik asit (Asp72) ve glutamik asit (Glu58) aminoasitleri ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları kurmuştur (Şekil 5.24). Aynı bileşiklerin hCA II için yapılan moleküler docking çalışmaları ise bileşiklerin aktif bölge ile etkileşiminde çinko metalinin (Zn301) yanı sıra histidin (His64 ve 94), glutamin (Gln92), treonin (Thr199 ve 200), lizin (Lys170) ve triptofan (Trp5) aminoasitlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Bileşikler Zn301 ile metal bağı kurarken; belirtilen aminoasitler ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 5.26).

hCA I için elde edilen sonuçlara göre *Artemisia absinthium* bitkisinde tespit edilen klorojenik asit, 4-hidroperoksi-2-metoksi fenol ve *p*-simen aktif bölgeye kuvvetli affinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko metal (Zn261) ile metal bağı oluşturmuştur. Ayrıca, bileşikler histidin (His67, 94 ve 200), glutamin (Gln92) ve Treonin (Thr199) aminoasitleri ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları kurmuştur (Şekil 5.28). Aynı bileşiklerin hCA II için yapılan moleküler docking çalışmaları ise bileşiklerin aktif bölge ile etkileşiminde çinko metal ile etkileşim göstermemiştir. Histidin (His94), glutamin (Gln92) ve treonin (Thr200) aminoasitleri ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 5.30).

hCA I için elde edilen sonuçlara göre *Hypericum perforatum* bitkisinde tespit edilen kafeoil kinik asit, rutin ve hiperozid aktif bölgeye kuvvetli afinite göstermiştir. Bileşikler enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko metali (Zn261) ile tuz köprüsü ve metal bağları oluşturmuştur. Ayrıca, bileşikler histidin (His67), treonin (Thr199), fenilalanin (Phe91), aspartik asit (Asp72) ve glutamik asit (Glu58) aminoasitleri ile π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları kurmuştur (Şekil 5.32). Aynı bileşiklerin hCA II için yapılan moleküler docking çalışmaları ise bileşiklerin aktif bölge ile etkileşiminde çinko metali ile etkileşim göstermemiştir. Histidin (His64), treonin (Thr200), lizin (Lys170) ve triptofan (Trp5) aminoasitlerinin önemli rol oynadığını göstermektedir. Belirtilen aminoasitler sadece hidrojen bağları oluşturmuştur (Şekil 5.34).

Bitki ekstralarının antioksidan etkilerini belirlemek için; demir indirgeme metodu, FRAP metodu, CUPRAC metodu, süperoksit anyon radikali giderme, DPPH metodu, ABTS metodu, DMPD radikali giderme aktivitesi tayini, bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini, total fenol miktar tayini ve total antioksidan aktivite testleri yapıldı. Hazırlanan ekstraların antioksidan etkileri standart olarak kullanılan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol ile kıyaslanarak belirlendi.

Demir indirgeme metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *H. perforatum* ve *O. vulgare*'nin ekstralarının demir indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

FRAP metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *H. perforatum* ve *O. vulgare*'nin ekstralarının ferrik iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan olan α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

CUPRAC metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *H. perforatum*, *A. millefolium*, *A. absinthium* ve *O. vulgare*'nin ekstralarının Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitelerinin standart antioksidan olan α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

Süperoksit anyon radikali giderme metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *A. absinthium* ve *H. perforatum*'un ekstralarının süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinin kullandığımız bütün standart antioksidanlara göre daha yüksek olduğu görüldü.

DPPH metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *O. vulgare* ve *H. perforatum*'un ekstralarının DPPH radikali giderme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

ABTS metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *H. perforatum*, *O. vulgare* ve *A. absinthium* ekstrelerinin ABTS^{•+} radikali giderme kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHT, Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

DMPD radikali giderme aktivitesi metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *A. absinthium*'un ekstrelerinin DMPD^{•+} serbest radikali giderme kapasitesinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

Bipiridil metal şelatlama aktivitesi metodunda elde ettiğimiz sonuçlara göre *H. perforatum* ve *A. millefolium*'un ekstrelerinin metal şelatlama kapasitelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu görüldü.

Tablo 5.7'de görüldüğü gibi bitkilerin sulu ve etanollü ekstrelerine bakıldığında *H. perforatum*'un hem sulu hem de etanollü ekstresinin en yüksek fenolik bileşik içerdiği görüldü. *E. arvense*'nin ise sulu ve etanollü ekstresinin en düşük total fenol miktarına sahip olduğu tespit edildi.

Total antioksidan kapasite tayini yönteminde elde ettiğimiz sonuçlara göre hem sulu hem de etanollü ekstrelerin 10 μ g/mL için lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasiteleri karşılaştırıldığında, *H. perforatum*'un BHA, BHT, Trolox ve α -Tokoferol'e göre daha yüksek olduğu tespit edildi. En düşük miktarda lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesi ise *E. arvense* ekstrelerinde görüldü.

Yapılan MTT sitotoksikite testine göre, tez kapsamında kullandığımız bitkilerin sulu ekstrelerinin IC₅₀ değerleri 500 μ g/mL'nin üzerinde çıkarak, etanol ekstrelerine göre düşük miktarda toksik etki göstermiştir. Etanol ile hazırlanan ekstrelerle bakıldığında ise sadece *Origanum vulgare*'nin 500 μ g/mL'nin üzerinde olduğu, diğer tüm bitki gruplarının ise kullanılan minimum doz olan 3,9 μ g/mL'den düşük konsantrasyonda IC₅₀ değerine sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 6.1. *hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılması, molekül kütlesi tayini ve inhibisyon çalışmaları ile ilgili toplu sonuçlar*

hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar			
		hCA I	hCA II
Spesifik Aktivite (EU/mg protein)		5220	14162
Saflaştırma Katsayısı		226,56	614,67
Verim (%)		59,98	64,86
Molekül kütlesi tayini			
		hCA I	hCA II
SDS-PAGE		29,3 kDa	29,3 kDa
İnhibisyon çalışmaları			
Bitkiler	İzoenzim	Sulu Ekstre IC ₅₀ (µg/mL)	Etanol Ekstresi IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Equisetum</i>	hCA I	69,00	40,59
<i>arvense</i>	hCA II	57,50	86,25
<i>Origanum</i>	hCA I	62,72	32,85
<i>vulgare</i>	hCA II	40,58	34,50
<i>Achillea</i>	hCA I	62,72	24,64
<i>millefolium</i>	hCA II	57,50	86,25
<i>Artemisia</i>	hCA I	40,58	43,13
<i>absinthium</i>	hCA II	46,00	57,50
<i>Hypericum</i>	hCA I	34,50	27,60
<i>perforatum</i>	hCA II	53,07	32,85

Tablo 6.2. *hCA I ve hCA II izoenzimleri için docking çalışmalarının toplu sonuçları*

hCA I ve hCA II izoenzimleri için docking çalışmalarının toplu sonuçları				
Bağlandığı izoenzim	Bitkiler	Tespit edilen etken maddeler	Aktif bölgede bağlandığı amino asit	Bağ türü
hCA I	<i>E. arvense</i>	Ekonazol,	His67, His94 ve His200	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA II		Bergapten, 9-Metil ürik asit	Arg58, Glu69 ve Gln92	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA I	<i>O. vulgare</i>	Metisilin,	His67, His200, Asn69 ve Gln92	Hidrojen bağları
hCA II		Loperamid, Sitrik asit	Gln92, His64 ve Trp5	Hidrojen bağları
hCA I	<i>A.millefolium</i>	Klorojenik asit,	His64, His67, His94, His200, Gln92, Val62,	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA II		3-5-Dikafeoil kuinik asit, Luteolin, Rutin	Thr199, Phe91, Asp72 ve Glu58 His64, His94, Gln92, Thr199, Thr200, Lys170 ve Trp5	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA I	<i>A. absinthium</i>	Klorojenik asit,	His67, His94, His200, Gln92 ve Thr199	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA II		4-Hidroperoksi-2-Metoksi fenol, <i>p</i> -simen	His94, Gln92 ve Thr200	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA I	<i>H.perforatum</i>	Kafeoil kinik asit,	His67, Thr199, Phe91, Asp72 ve Glu58	π - π etkileşimleri ve hidrojen bağları
hCA II		Rutin, Hiperozid,	His64, Thr200, Lys170 ve Trp5	Hidrojen bağları

Tablo 6.3. Antioksidan deneylerin toplu sonuçları

Antioksidan deneylerin toplu sonuçları		
Deneyin Adı	Bitki ekstralarının ve standart antioksidanların 10 (µg/mL) konsantrasyonları için sırasıyla aktiviteleri	
	Sulu ekstralar	Etanollü ekstralar
Demir indirgeme metodu (Fe ³⁺ - Fe ²⁺)	BHA > BHT > α-Tokoferol > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > Trolox > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i>	BHA > BHT > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > α-Tokoferol > <i>A. millefolium</i> > <i>A. absinthium</i> > Trolox > <i>E. arvense</i>
FRAP metodu	BHA > Trolox > BHT > <i>H. perforatum</i> > α-Tokoferol > <i>O. vulgare</i> > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i>	BHA > <i>O. vulgare</i> > Trolox > BHT > <i>H. perforatum</i> > α-Tokoferol > <i>A. millefolium</i> > <i>A. absinthium</i> > <i>E. arvense</i>
CUPRAC metodu	BHA > BHT > <i>O. vulgare</i> > Trolox > <i>H. perforatum</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>A. absinthium</i> > <i>E. arvense</i> > α-Tokoferol	BHA > BHT > <i>A. millefolium</i> > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. absinthium</i> > Trolox > <i>E. arvense</i> > α-Tokoferol
Süperoksit anyon radikali giderme	<i>H. perforatum</i> > BHA > α-Tokoferol > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > BHT > Trolox > <i>E. arvense</i> > <i>O. vulgare</i>	<i>A. absinthium</i> > BHA > α-Tokoferol > BHT > <i>A. millefolium</i> > Trolox > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>E. arvense</i>
DPPH metodu	<i>H. perforatum</i> > BHA > BHT > <i>O. vulgare</i> > Trolox > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i> > α-Tokoferol	<i>O. vulgare</i> > <i>H. perforatum</i> > BHA > BHT > Trolox > α-Tokoferol > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i>
ABTS metodu	BHA > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. absinthium</i> > α-Tokoferol > Trolox > BHT > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i>	<i>H. perforatum</i> > BHA > <i>A. absinthium</i> > <i>O. vulgare</i> > α-Tokoferol > Trolox > <i>A. millefolium</i> > BHT > <i>E. arvense</i>
DMPD radikali giderme aktivitesi tayini	<i>A. absinthium</i> > Trolox > <i>H. perforatum</i> > BHT > <i>A. millefolium</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>E. arvense</i> > α-Tokoferol > BHA	Trolox > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > BHT > <i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>E. arvense</i> > α-Tokoferol > BHA
Bipiridil metal şelatlama aktivitesi tayini	<i>H. perforatum</i> > <i>A. millefolium</i> > α-Tokoferol > <i>A. absinthium</i> > <i>O. vulgare</i> > Trolox > BHT > BHA > <i>E. arvense</i>	<i>H. perforatum</i> > α-Tokoferol > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>O. vulgare</i> > Trolox > BHT > BHA > <i>E. arvense</i>
Total fenol miktarı tayini	<i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. absinthium</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i>	<i>H. perforatum</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>A. absinthium</i> > <i>E. arvense</i>
Total antioksidan aktivite tayini	<i>H. perforatum</i> > BHT > Trolox > BHA > <i>A. absinthium</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i> > Tokoferol	<i>H. perforatum</i> > BHT > Trolox > BHA > <i>A. absinthium</i> > <i>O. vulgare</i> > <i>A. millefolium</i> > <i>E. arvense</i> > Tokoferol

KAYNAKÇA

- [1] Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2015). Enzimler, in *Biyokimya* (s. 89-137). Erzurum: Aktif Yayınevi.
- [2] Nelson, D.L., Cox, M.M. (2005). Enzimler, N. Kılıç (Ed.), in *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (s. 243-290). Ankara: Palme Yayıncılık.
- [3] Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. (2007). Enzimler, in *İnsan Biyokimyası* (s. 198-202). Ankara: Palme Yayıncılık.
- [4] Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*, 7 (2), 168-181.
- [5] Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev*, 112 (8), 4421-4468.
- [6] Neri, D., Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov*, 10 (10), 767-777.
- [7] Supuran, C.T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzym Inhib Med Ch*, 27 (6), 759-772.
- [8] Schlicker, C., Hall, R.A., Vullo, D., Middelhaufe, S., Gertz, M., Supuran, C.T., Muhlschlegel, F.A., Steegborn, C. (2009). Structure and inhibition of the CO₂-sensing carbonic anhydrase Can2 from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J Mol Biol*, 385 (4), 1207-1220.
- [9] Alterio, V., Langella, E., Viparelli, F., Vullo, D., Ascione, G., Dathan, N.A., Morel, F.M., Supuran, C.T., De Simone, G., Monti, S.M. (2012). Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CDCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, 94 (5), 1232-1241.
- [10] Carta, F., Maresca, A., Covarrubias, A.S., Mowbray, S.L., Jones, T.A., Supuran, C.T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3588c. *Bioorg Med Chem Lett*, 19 (23), 6649-6654.
- [11] Gulcin, I., Beydemir, S. (2013). Phenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Rev Med Chem*, 13 (3), 408-430.

- [12] Abdulkadir Coban, T., Beydemir, S., Gulcin, I., Ekinici, D., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T. (2009). Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV. *Bioorg Med Chem*, 17 (16), 5791-5795.
- [13] Ekinici, D., Cavdar, H., Talaz, O., Senturk, M., Supuran, C.T. (2010). NO-releasing esters show carbonic anhydrase inhibitory action against human isoforms I and II. *Bioorg Med Chem*, 18 (10), 3559-3563.
- [14] Ozturk Sarikaya, S.B., Topal, F., Senturk, M., Gulcin, I., Supuran, C.T. (2011). In vitro inhibition of alpha-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21 (14), 4259-4262.
- [15] Silverman, D.N., Lindskog, S. (2002). The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting protolysis of water. *Accounts Chem Res*, 21 (1), 30-36.
- [16] Christianson, D.W., Fierke, C.A. (1996). Carbonic anhydrase: Evolution of the zinc binding site by nature and by design. *Accounts Chem Res*, 29 (7), 331-339.
- [17] Mikulski, R.L., Silverman, D.N. (2010). Proton transfer in catalysis and the role of proton shuttles in carbonic anhydrase. *Biochim Biophys Acta*, 1804 (2), 422-426.
- [18] Lowe, N., Brady, H.J.M., Barlow, J.H., Sowdes, J.C., Edwards, M., Butterworth, P.H.W. (1990). Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene*, 93 (2), 277-283.
- [19] Imtaiyaz Hassan, M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W.S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg Med Chem*, 21 (6), 1570-1582.
- [20] Beydemir, S., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.I., Büyükkökuroğlu, M.E. (2002). Effects of gentamicin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biol Pharm Bull*, 25 (8), 966-969.
- [21] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). Carbonic anhydrase activators: the first X-ray crystallographic study of an adduct of isoform I. *Bioorg Med Chem Lett*, 16 (19), 5152-5156.
- [22] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 10 (5), 575-600.
- [23] Ren, X., Lindskog, S. (1992). Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase I. *Bba-Protein Struct M*, 1120 (1), 81-86.

- [24] Behravan, G., Jonsson, B.-H., Lindskog, S. (1990). Fine tuning of the catalytic properties of carbonic anhydrase. Studies of a Thr200 His variant of human isoenzyme II. *Eur J Biochem*, 190 (2), 351-357.
- [25] Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglion, G., Supuran, C.T. (1997). Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry-U.S.*, 36 (34), 10384-10392.
- [26] Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Therapeut*, 74 (1), 1-20.
- [27] Sly, W.S., Hu, P.Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 64, 375-401.
- [28] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*, 15 (13), 4336-4350.
- [29] Gambhir, K.K., Ornasir, J., Headings, V., Bonar, A. (2007). Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochem Genet*, 45 (5-6), 431-439.
- [30] Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S., Ono, M. (2012). Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol*, 2012, 768190.
- [31] Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Gitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B., Whitesides, G.M. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem Rev*, 108 (3), 946-1051.
- [32] Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S.J., Srinivasan, V.J., Wojtkowski, M., Fujimoto, J.G., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Bursell, S.E., Aiello, L.P., Feener, E.P. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med*, 13 (2), 181-188.
- [33] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 23 (2), 146-189.
- [34] De Simone, G., Supuran, C.T. (2012). (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J Inorg Biochem*, 111, 117-129.

- [35] Harvison, P.J. (2005). Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators. CRC Enzyme Inhibitors Series Edited by Claudiu T. Supuran, Andrea Scozzafava, and Janet Conway. CRC Press, Boca Rotan, FL. 2004. ix + 363 pp. 16 × 23 cm. ISBN 0-415-30673-6. \$138.95. *J Med Chem*, 48 (8), 3091-3091.
- [36] Maren, T.H. (1967). Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev*, 47 (4), 595-781.
- [37] Hall, T.J., Higgins, W., Tardif, C., Chambers, T.J. (1991). A comparison of the effects of inhibitors of carbonic anhydrase on osteoclastic bone resorption and purified carbonic anhydrase isozyme II. *Calcified Tissue Int*, 49 (5), 328-332.
- [38] Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2013). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 23 (6), 705-716.
- [39] Carta, F., Supuran, C.T. (2013). Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*, 23 (6), 681-691.
- [40] Masereel, B., Thiry, A., Dogne, J.-M., Supuran, C. (2008). Anticonvulsant sulfonamides/sulfamates/sulfamides with carbonic anhydrase inhibitory activity: Drug design and mechanism of action. *Curr Pharm Design*, 14 (7), 661-671.
- [41] Hynninen, P., Parkkila, S., Huhtala, H., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W.S., Tomas, E. (2012). Carbonic anhydrase isozymes II, IX, and XII in uterine tumors. *APMIS*, 120 (2), 117-129.
- [42] Kenny, A.D. (1985). Role of carbonic anhydrase in bone: plasma acetazolamide concentrations associated with inhibition of bone loss. *Pharmacology*, 31 (2), 97-107.
- [43] Pierce, W.M., Jr., Nardin, G.F., Fuqua, M.F., Sabah-Maren, E., Stern, S.H. (1991). Effect of chronic carbonic anhydrase inhibitor therapy on bone mineral density in white women. *J Bone Miner Res*, 6 (4), 347-354.
- [44] Pan, J., Lau, J., Mesak, F., Hundal, N., Pourghiasian, M., Liu, Z., Benard, F., Dedhar, S., Supuran, C.T., Lin, K.S. (2014). Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled carbonic anhydrase IX inhibitors for imaging with positron emission tomography. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 29 (2), 249-255.
- [45] D'Ambrosio, K., De Simone, G., Supuran, C.T. (2015). Human carbonic anhydrases: Catalytic properties, structural features, and tissue distribution, in *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts* (s. 17-30). Florence, Italy: Elsevier.

- [46] De Simone, G., Alterio, V., Supuran, C.T. (2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin Drug Dis*, 8 (7), 793-810.
- [47] Domsic, J.F., Avvaru, B.S., Kim, C.U., Gruner, S.M., Agbandje-McKenna, M., Silverman, D.N., McKenna, R. (2008). Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J Biol Chem*, 283 (45), 30766-30771.
- [48] Mangani, S., Hakansson, K. (1992). Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur J Biochem*, 210 (3), 867-871.
- [49] Håkansson, K., Carlsson, M., Svensson, L.A., Liljas, A. (1992). Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes. *J Mol Biol*, 227 (4), 1192-1204.
- [50] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. X-ray crystal studies of the carbonic anhydrase II-trithiocarbonate adduct--an inhibitor mimicking the sulfonamide and urea binding to the enzyme. *Bioorg Med Chem Lett*, 20 (2), 474-478.
- [51] Carta, F., Aggarwal, M., Maresca, A., Scozzafava, A., McKenna, R., Masini, E., Supuran, C.T. (2012). Dithiocarbamates strongly inhibit carbonic anhydrases and show antiglaucoma action in vivo. *J Med Chem*, 55 (4), 1721-1730.
- [52] Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors: interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I-XIV). *Bioorg Med Chem Lett*, 18 (5), 1583-1587.
- [53] Becker, B. (1955). The mechanism of the fall in intraocular pressure induced by the carbonic anhydrase inhibitor, diamox*. *Am J Ophthalmol*, 39 (2), 177-184.
- [54] Maren, T.H., Jankowska, L., Sanyal, G., Edelhauser, H.F. (1983). The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp Eye Res*, 36 (4), 457-479.
- [55] Sugrue, M.F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog Retin Eye Res*, 19 (1), 87-112.
- [56] Pinard, M.A., Boone, C.D., Rife, B.D., Supuran, C.T., McKenna, R. (2013). Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem*, 21 (22), 7210-7215.

- [57] Mincione, F., Benedini, F., Biondi, S., Cecchi, A., Temperini, C., Formicola, G., Pacileo, I., Scozzafava, A., Masini, E., Supuran, C.T. (2011). Synthesis and crystallographic analysis of new sulfonamides incorporating NO-donating moieties with potent antiglaucoma action. *Bioorg Med Chem Lett*, 21 (11), 3216-3221.
- [58] Carta, F., Akdemir, A., Scozzafava, A., Masini, E., Supuran, C.T. (2013). Xanthates and trithiocarbonates strongly inhibit carbonic anhydrases and show antiglaucoma effects in vivo. *J Med Chem*, 56 (11), 4691-4700.
- [59] Carta, F., Aggarwal, M., Maresca, A., Scozzafava, A., McKenna, R., Supuran, C.T. (2012). Dithiocarbamates: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. Crystallographic and kinetic investigations. *Chem Commun*, 48 (13), 1868-1870.
- [60] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C. (2008). Carbonic anhydrase activation and the drug design. *Curr Pharm Design*, 14 (7), 708-715.
- [61] Pastorekova, S., Vullo, D., Nishimori, I., Scozzafava, A., Pastorek, J., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase activators: activation of the human tumor-associated isozymes IX and XII with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem*, 16 (7), 3530-3536.
- [62] Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D., Supuran, C.T. (2006). Carbonic anhydrase activators. Activation of isozymes I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-histidine and crystallographic analysis of their adducts with isoform II: engineering proton-transfer processes within the active site of an enzyme. *Chem Biol*, 12 (27), 7057-7066.
- [63] Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S.A., Scozzafava, A., Quinn, R.J., Supuran, C.T. (2009). Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors. *J Am Chem Soc*, 131 (8), 3057-3062.
- [64] Sun, M.-K., Alkon, D.L. (2001). Pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning, and memory through carbonic anhydrase activation in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 297 (3), 961-967.
- [65] Sun, M.-K., Alkon, D.L. (2002). Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement. *Trends Pharmacol Sci*, 23 (2), 83-89.
- [66] Briganti, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (1999). Novel carbonic anhydrase isozymes I, II and IV activators incorporating sulfonyl-histamino moieties. *Bioorg Med Chem Lett*, 9 (14), 2043-2048.

- [67] Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2006). Protein oxidation. *Ann Ny Acad Sci*, 899 (1), 191-208.
- [68] Laitonjam, W.S. (2012). Natural antioxidants (NAO) of plants acting as scavengers of free radicals, in *Stud Nat Prod Chem* (s. 259-275). Elsevier.
- [69] Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21 (3), 361-370.
- [70] Losada-Barreiro, S., Bravo-Diaz, C. (2017). Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. *Eur J Med Chem*, 133, 379-402.
- [71] Hall, C. (1997). Structure-activities of natural antioxidants, S. Cuppett (Ed.), in *Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts* (s. 2-29). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- [72] Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolis*, 49 (2), 3-8.
- [73] Halliwell, B. (2009). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res*, 31 (4), 261-272.
- [74] Bergman, M., Varshavsky, L., Gottlieb, H.E., Grossman, S. (2001). The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*, 58 (1), 143-152.
- [75] Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*, 86 (3), 345-391.
- [76] Halliwell, B. (1981). *Chloroplast metabolism. The structure and function of chloroplasts in green leaf cells*. Oxford.: Clarendon Press.
- [77] Audran, G., Marque, S.R.A., Santelli, M. (2018). Ozone, chemical reactivity and biological functions. *Tetrahedron*, 74 (43), 6221-6261.
- [78] Zullino, S., Buzzella, F., Simoncini, T. (2018). Nitric oxide and the biology of pregnancy. *Vascul Pharmacol*, 110, 71-74.
- [79] Nordberg, J., Arnér, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Bio Med*, 31 (11), 1287-1312.
- [80] Augusto, O., Miyamoto, S. (2011). Oxygen radicals and related species. *Free Rad Biomed*, 1, 19-42.
- [81] Schaich, K.M., Shahidi, F., Zhong, Y., Eskin, N.M. (2013). Lipid oxidation, in *Biochemistry of Foods (Third Edition)* (s. 419-478). New York: Elsevier.

- [82] Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem*, 73 (3), 285-290.
- [83] Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem*, 46 (10), 4113-4117.
- [84] Cook, N. (1996). Flavonoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Eur Ceram Soc*, 66-76.
- [85] Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *J Med Plants Res*, 2 (11), 321-330.
- [86] Singh, N., Rajini, P.S. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem*, 85 (4), 611-616.
- [87] Martinez-Castillo, M., Pacheco-Yeppez, J., Flores-Huerta, N., Guzman-Tellez, P., Jarillo-Luna, R.A., Cardenas-Jaramillo, L.M., Campos-Rodriguez, R., Shibayama, M. (2018). Flavonoids as a natural treatment against *entamoeba histolytica*. *Front Cell Infect Mi*, 8, 209.
- [88] Desmarchelier, C., Ciccia, G., Coussio, J. (2000). Recent advances in the search for antioxidant activity in South American plants, in *Stud Nat Prod Chem* (s. 343-367). Elsevier.
- [89] Asgarpanah, J., Roohi, E. (2012). Phytochemistry and pharmacological properties of *Equisetum arvense* L. *J Med Plants Res*, 6 (21), 3689-3693.
- [90] Sandhu, N.S., Kaur, S., Chopra, D. (2010). *Equisetum arvense*: pharmacology and phytochemistry—a review. *Asian J Pharm Clin Res*, 3 (3), 146-150.
- [91] Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agr Food Chem*, 49 (9), 4168-4170.
- [92] Khan, M., Khan, S.T., Khan, N.A., Mahmood, A., Al-Kedhairi, A.A., Alkhathlan, H.Z. (2018). The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. *Arab J Chem*,

- [93] Yan, F., Azizi, A., Janke, S., Schwarz, M., Zeller, S., Honermeier, B. (2016). Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. *Ind Crop Prod*, 92, 19-25.
- [94] Lukas, B., Schmiderer, C., Novak, J. (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae). *Phytochemistry*, 119, 32-40.
- [95] Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *J Ethnopharmacol*, 87 (2-3), 215-220.
- [96] Mills, S., Bone, K. (2005). *The essential guide to herbal safety*. Elsevier Health Sciences.
- [97] Öztürk, Y. (1997). Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry*, 30 (S 2), 125-128.
- [98] Güneş, S., Tihminlioğlu, F. (2017). *Hypericum perforatum* incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material. *Int J Biol Macromol*, 102, 933-943.
- [99] Gioti, E.M., Fiamegos, Y.C., Skalkos, D.C., Stalikas, C.D. (2009). Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. *Food Chem*, 117 (3), 398-404.
- [100] Alía, M., Horcajo, C., Bravo, L., Goya, L. (2003). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutr Res*, 23 (9), 1251-1267.
- [101] Adeva-Andany, M.M., Fernández-Fernández, C., Sánchez-Bello, R., Donapetry-García, C., Martínez-Rodríguez, J. (2015). The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans. *Atherosclerosis*, 241 (1), 183-191.
- [102] Pala, N., Cadoni, R., Sechi, M. (2015). Carbonic anhydrase I, in *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts* (s. 31-49). Florence, Italy: Elsevier.
- [103] Supuran, C.T., Capasso, C., De Simone, G. (2015). Carbonic anhydrase II as target for drug design, in *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts* (s. 51-90). Florence, Italy: Elsevier.

- [104] Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, 2014
- [105] Ďuračková, Z. (2007). Oxidants, antioxidants and redox stress. *Z Klin Chem Klin Bio*, 11-59.
- [106] Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, 80 (5), 780-787.
- [107] Yan, M.H., Wang, X., Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Bio Med*, 62, 90-101.
- [108] Liochev, S.I., Fridovich, I. (1994). The role of O_2^- in the production of $HO\cdot$: in vitro and in vivo. *Free Radical Bio Med*, 16 (1), 29-33.
- [109] Kumar, S., Krishna Chaitanya, R., Preedy, V. (2017). Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components, in (s. Elsevier.
- [110] Fernandes, R.d.P.P., Trindade, M.A., de Melo, M.P. (2018). Natural antioxidants and food applications: Healthy perspectives, in *Alternative Replacement Food* (s. 31-64). Elsevier.
- [111] Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T. (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chem*, 91 (3), 389-394.
- [112] Chun, S.-S., Vatter, D.A., Lin, Y.-T., Shetty, K. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem*, 40 (2), 809-816.
- [113] Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A.G.B., Andre, E., de Paula Werner, M.F., Marques, M.C.A. (2010). Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. *J Ethnopharmacol*, 130 (1), 85-92.
- [114] Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Kolodziejczyk, P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 (8), 1732-1738.
- [115] Sparkman, O.D. (2000). Mass spectrometry desk reference 2. *J Am Soc Mass Spectr*, 12 (11), 1144.
- [116] Release, S. (2016). Schrödinger suite 2016-2 induced fit docking protocol. *Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY*,

- [117] Hunaiti, A.A., Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Sci Total Environ*, 248 (1), 45-50.
- [118] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 (1-2), 248-254.
- [119] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680.
- [120] Wilbur, K.M., Anderson, N.G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 176 (1), 147-154.
- [121] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *Jpn J N Diet*, 44 (6), 307-315.
- [122] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *Int J Food Sci Nutr*, 57 (5-6), 292-304.
- [123] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4), 555-559.
- [124] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617), 1199.
- [125] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, 26 (9-10), 1231-1237.
- [126] Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agr Food Chem*, 47 (3), 1035-1040.
- [127] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- [128] YAKA, E. (2004). *Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS un PC12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi*.Yayımlanmamış Tıpta Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi.



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : 25403353-050.99-E.26581
Konu : 2018 - 33 Karar

13/03/2018

Sayın Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR
Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü / Biyokimya Anabilim Dalı

Sorumlu Araştırmacısı olduğunuz **“Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Bu İzoenzimler Üzerinde Etkilerinin Araştırılması”** başlıklı çalışma hakkında alınan karar ilişikte gönderilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.

Prof. Dr.Ömür ŞAYLIGİL
Etik Kurul Başkanı

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır. Evrak doğrulama adresi:
<https://ebysnetm.ogu.edu.tr/Home/Dogrulama/cb02f33c-2f8d-4051-b7b4-d778fa80bf37>

Adres : Meselik Kampüsü PK:26480 Odunpazarı
Telefon : 0222 2392979-4690
E-Posta : aserttas@ogu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi : Aysun SERTTAŞ - Bilgisayar İşletmeni
Faks : 222 239 37 72
Elektronik Ağ : <http://girisimselolmayanetikkurul.ogu.edu.tr/>
KEP Adresi : esk.osmangaziunirek@hs01.kep.tr



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI

Prof. Dr.Ömür ŞAYLIGİL
(Başkan)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Uğur BİLGE
(Başkan Yardımcısı)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Aile Hekimliği Anabilim Dalı

Doç. Dr. Özlem ÖRSAL
(Raportör)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Eskişehir Sağlık Bilimleri Fakültesi
Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Setenay DİNÇER
ÖNER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyostatistik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr.Timuçin KAŞİFOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı /
Romatoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Altan EŞSİZÖĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı

Doç.Dr.Ömer KILIÇ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı /
Çocuk Enfeksiyon Hast. Bilim Dalı

Doç. Dr. Batu Can YAMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi
Anabilim Dalı

Prof. Dr. Bekir YAŞAR
Genel Cerrahi Uzmanı

Av. Önder CAN
Avukat

Etik Kurul Sekreterliği
Aysun SERTTAŞ
Makbule SARIÇİÇEK
Tel: 0 222 239 29 79 / 4690

KARAR FORMU

Başvuru Tarihi:
02.02.2018

Çalışmanın Başlığı:

“Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Bu İzoenzimler Üzerinde Etkilerinin Araştırılması”

Çalışmacılar:

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı - Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR (Yüksek Lisans Tez Danışmanı), Deniz NEZİR (Yüksek Lisans Tez Sahibi), Oya BÜYÜKEMİR

Çalışmanın değerlendirildiği ilk toplantı tarihi:

27.02.2018

Sonuç:

1. Araştırmacılar İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (2015) ve Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi (2013)’ni imzalamış bu imza ile sorumluluğu kabul ettiklerini beyan etmişlerdir.

İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (2015)’a göre; 2.23. Etkilenebilir Özneler: Klinik araştırmaya gönüllü olma isteği kabul edilsin veya edilmesin katılımının sağlayacağı yarar beklentisi veya katılmayı reddettiği takdirde hiyerarşik yapı içinde bulunan kişiler tarafından misilleme göreceği beklentisi nedeniyle özgür karar verme iradesi etkilenebilecek kişilerdir. Tıp, eczacılık, diş hekimliği ve hemşirelik öğrencileri, araştırma yapılan yere bağlı çalışan hastane veya laboratuvar personeli, ilaç sektöründe çalışanlar, silahlı kuvvetler mensupları, er ve erbaşlar ile tutuklular gibi belirli bir hiyerarşik yapı içerisinde bulunan kişiler bunlara örnektir. Ayrıca, tedavi edilemeyen bir hastalığı olan hastalar, bakım evlerinde yaşayanlar, işsiz veya yoksul kişiler, acil tıbbi müdahale gereken kişiler, çocuklar, onay verme ehliyeti bulunmayanlar ve bunun gibi kişiler de bu hassas gruba dâhildir.

2. Ulusal ve uluslararası mevzuatta dile getirilen “Tıbbi verilerin gizliliğine azami dikkat esastır.”
3. Araştırmacıların yetkin ve bu araştırma için yeterli oldukları anlaşılmaktadır.

Karar Tarihi: 27.02.2018 Karar No: 22	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR (Yüksek Lisans Tez Danışmanı) sorumluluğunda yürütülen <i>“Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Bu İzoenzimler Üzerinde Etkilerinin Araştırılması”</i> başlıklı çalışmanın yapılmasının etik açıdan uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Araştırmacılara başarılar dileriz.
---	--

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Unvanı/Adı/Soyadı		Kurumu	İmza
1	Prof. Dr. Ömür ŞAYLIGİL (Başkan)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
2	Doç. Dr. Uğur BİLGE (Başkan Yardımcısı)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı	
3	Doç. Dr. Özlem ÖRSAL (Raportör)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir Sağlık Bilimleri Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı	
4	Prof. Dr. Setenay DİNÇER ÖNER	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	
5	Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı	
6	Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
7	Prof. Dr. Timuçin KAŞİFOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı / Romatoloji Bilim Dalı	
8	Doç. Dr. Altan EŞSİZÖĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
9	Doç. Dr. Ömer KILIÇ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/ Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı	
10	Doç. Dr. Batu Can YAMAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı	
11	Prof. Dr. Bekir YAŞAR	Genel Cerrahi Uzmanı	
12	Av. Önder CAN	Hukuk	